Ez a dokumentum kizárólag tájékoztató jellegű, az intézmények semmiféle felelősséget nem vállalnak a tartalmáért

►B

A BIZOTTSÁG 440/2008/EK RENDELETE

(2008. május 30.)

a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

(HL L 142., 2008.5.31., 1. o.)

Módosította:

		Hivatalos Lap		
		Szám	Oldal	Dátum
►M1	A Bizottság 761/2009/EK rendelete (2009. július 23.)	L 220	1	2009.8.24.
►M2	A Bizottság 1152/2010/EU rendelete (2010. december 8.)	L 324	13	2010.12.9.
►M3	A Bizottság 640/2012/EU rendelete (2012. július 6.)	L 193	1	2012.7.20.
►M4	A Bizottság 260/2014/EU rendelete (2014. január 24.)	L 81	1	2014.3.19.

▼B

A BIZOTTSÁG 440/2008/EK RENDELETE

(2008. május 30.)

a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH) szóló 1907/2006/EK európai parlamenti és a tanácsi rendelet értelmében alkalmazandó vizsgálati módszerek megállapításáról

(EGT-vonatkozású szöveg)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről szóló, 2006. december 18-i 1907/2006/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletre ([1]) és különösen annak 13. cikke (3) bekezdésére,

mivel:

(1) Az 1907/2006/EK rendelet értelmében közösségi szinten vizsgálati módszereket kell elfogadni olyan vizsgálatokat illetően, amelyek szükségesek az egyes anyagok lényegi tulajdonságaira vonatkozó információk megszerzéséhez.

(2) A veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelv ([2]) V. melléklete megállapította az anyagok és készítmények fizikai és kémiai tulajdonságainak, toxicitásának, valamint ökotoxicitásának meghatározására szolgáló módszereket. A 2006/121/EK európai parlamenti és tanácsi irányelv 2008. január 1-jei hatállyal törölte a 67/548/EGK rendelet V. mellékletét.

(3) A 67/548/EGK rendelet V. mellékletében szereplő vizsgálati módszereket bele kell foglalni ebbe a rendeletbe.

(4) E rendelet nem zárja ki más vizsgálati módszerek használatát, feltéve hogy alkalmazásuk összhangban van az 1907/2006/EK rendelet 13. cikkének (3) bekezdésével.

([1]) HL L 396., 2006.12.30., 1. o., helyesbítve: HL L 136., 2007.5.29., 3. o.

([2]) HL 196., 1967.8.16., 1. o. A legutóbb a 2006/121/EK európai parlamenti és tanácsi irányelvvel (HL L 396., 2006.12.30., 850. o., helyesbítve: HL L 136., 2007.5.29., 281. o.) módosított irányelv – *frissítésre kerül a megfelelő hivatkozásokkal, amint közzéteszik a műszaki fejlődéshez történő 30. hozzáigazításról szóló dokumentumot*.

▼B

(5) A vizsgálati eljárások során az állatok helyettesítésére, illetve a felhasználásuk csökkentésére és finomítására vonatkozó elveket teljes mértékben figyelembe kell venni a vizsgálati módszerek kidolgozásakor, különösen akkor, ha az állatkísérletek kiváltására, számának csökkentésére vagy finomítására alkalmas, hitelesített módszerek rendelkezésre állnak.

(6) E rendelet rendelkezései összhangban vannak az 1907/2006/EK rendelet 133. cikkével létrehozott bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT A RENDELETET:

1. cikk

Az 1907/2006/EK rendelet céljából alkalmazandó vizsgálati módszereket e rendelet melléklete állapítja meg.

2. cikk

A Bizottság szükség esetén felülvizsgálja az e rendeletben foglalt vizsgálati módszereket a gerinces állatokon végzett kísérletek helyettesítése, számának csökkentése és finomítása érdekében.

3. cikk

A 67/548/EGK irányelv V. mellékletére történő hivatkozásokat az e rendeletre való hivatkozásként kell értelmezni.

4. cikk

Ez a rendelet az *Európai Unió Hivatalos Lapjában* történő kihirdetését követő napon lép hatályba.

Rendelkezéseit 2008. június 1-jétől kell alkalmazni.

▼B

MELLÉKLET

A. RÉSZ: A FIZIKAI-KÉMIAI TULAJDONSÁGOK MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

TARTALOMJEGYZÉK

A.1.	OLVADÁSPONT/FAGYÁSPONT
A.2.	FORRÁSPONT
A.3.	RELATÍV SŰRŰSÉG
A.4.	GŐZNYOMÁS
A.5.	FELÜLETI FESZÜLTSÉG
A.6.	OLDHATÓSÁG VÍZBEN
A.8.	MEGOSZLÁSI HÁNYADOS
A.9.	LOBBANÁSPONT
A.10.	TŰZVESZÉLYESSÉG (SZILÁRD ANYAGOK)
A.11.	TŰZVESZÉLYESSÉG (GÁZOK)
A.12.	TŰZVESZÉLYESSÉG (ÉRINTKEZÉS VÍZZEL)
A.13.	SZILÁRD ANYAGOK ÉS FOLYADÉKOK ÖNGYULLADÁSI KÉPESSÉGE
A.14.	ROBBANÁSI TULAJDONSÁGOK
A.15.	ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLET (FOLYADÉKOK ÉS GÁZOK)
A.16.	SZILÁRD ANYAGOK RELATÍV ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLETE
A.17.	OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (SZILÁRD ANYAGOK)
A.18.	A POLIMEREK SZÁMÁTLAG SZERINTI MOLEKULATÖMEGE ÉS MOLEKULATÖMEG-ELOSZLÁSA
A.19.	POLIMEREK KIS MOLEKULATÖMEG-TARTALMA
A.20.	POLIMEREK OLDÓDÁS/EXTRAKCIÓ VISELKEDÉSE VÍZBEN
A.21.	OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (FOLYADÉKOK)
A.22.	ROSTOK HOSSZAL SÚLYOZOTT ÁTLAGOS GEOMETRIAI ÁTMÉRŐJE

▼M4

A.23.	MEGOSZLÁSI HÁNYADOS (1-OKTANOL/VÍZ): LASSÚ KEVERÉSES MÓDSZER

▼B

A.1. OLVADÁSPONT/FAGYÁSPONT

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az 1. OECD vizsgálati irányelven alapul. Az alapelveket a (2) és (3) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az anyagok olvadáspontjának meghatározásához a leírt módszereket és eszközöket kell alkalmazni az anyagok tisztasági fokára vonatkozó mindenfajta korlátozás nélkül.

A módszer kiválasztása a vizsgálni kívánt anyag természetétől függ. Ennek következtében a korlátozó tényező attól függ, hogy könnyen, nehezen vagy egyáltalán nem porítható az anyag.

Néhány anyag esetében a fagyáspont vagy dermedési pont meghatározása a megfelelőbb, és az ezek meghatározására vonatkozó szabványok is szerepelnek ebben a módszerben.

Ahol az anyag különleges tulajdonságai miatt a fenti paraméterek közül egyik sem mérhető nehézség nélkül, a dermedéspont lehet megfelelő.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az olvadáspont az a hőmérséklet, amelynél légköri nyomáson létrejön a fázisátmenet a szilárd halmazállapotból folyékony halmazállapotba, és ez a hőmérséklet ideális esetben megegyezik a fagyásponttal.

Mivel sok anyag fázisátmenete bizonyos hőmérséklet-tartományban jön létre, ezért ezt gyakran olvadási tartományként írják le.

Mértékegységek átszámítása (K-ről ^{o}C-ra)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius-skála szerinti hőmérséklet, Celsius-fok (^{o}C)

T: termodinamikai hőmérséklet, Kelvin (K)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyagot a (4) szakirodalom sorol fel.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Meghatározza a szilárd halmazállapotból folyékony halmazállapotba vagy folyékony halmazállapotból szilárd halmazállapotba történő fázisátmenet hőmérsékletét (hőmérséklettartományát). A gyakorlatban a vizsgált anyag mintájának légköri nyomáson végrehajtott melegítése/hűtése során az olvadás/fagyás kezdetének és az olvadás/-fagyás befejezésének hőmérsékletét határozzák meg. A leírás öt módszert ismertet, nevezetesen a kapilláris módszert, a fűtőasztalos módszereket, a fagyáspont-meghatározásokat, a termikus analízis módszerét és a dermedéspont meghatározását (ahogyan ezt az ásványolajokhoz kifejlesztették).

Bizonyos esetekben megfelelő lehet a fagyáspont mérése az olvadáspont mérése helyett.

1.4.1. **Kapilláris módszer**

1.4.1.1. *Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel*

Kis mennyiségű, finomra őrölt anyagot helyeznek el egy kapilláris csőben, és szorosan tömörítik. Ezután felmelegítik a csövet egy hőmérővel együtt, és a hőmérséklet-emelkedést 1 K/perc körüli értéknél kisebbre állítják be a tényleges olvasztás során. Meghatározzák az olvadás kezdő és végső hőmérsékletét.

1.4.1.2. *Olvadáspontmérő készülékek fémblokkos eszközzel*

Megegyezik az 1.4.1.1. pontban ismertetett eljárással, azzal a kivétellel, hogy melegített fémblokkban helyezik el a kapilláris csövet és a hőmérőt, és ezek a blokkban kialakított nyílásokon keresztül figyelhetők.

1.4.1.3. *Fotocellás meghatározás*

A kapilláris csőben elhelyezett mintát automatikusan melegítik egy fémhengerben. Fénysugarat irányítanak az anyagon keresztül a hengerben kialakított nyílás segítségével egy pontosan kalibrált fotocellához. A legtöbb anyag optikai tulajdonságai opálosról átlátszóra változnak a hevítés során. A fotocellát elérő fény intenzitása megnövekszik, és stop jelet küld a digitális jelzőkészüléknek, amely a fűtőkamrában elhelyezett platina ellenállás-hőmérő hőmérsékletét jelzi. Ez a módszer nem alkalmas néhány, erősen színezett anyaghoz.

1.4.2. **Fűtőasztalok**

1.4.2.1. *Kofler-féle fűtőasztal*

A Kofler-féle fűtőasztal két, különböző hővezető képességű, elektromosan melegített fémből áll, ahol a fűtőasztalt úgy tervezték, hogy a hosszúsága mentén a hőmérséklet-gradiens majdnem lineáris legyen. A fűtőasztal hőmérséklete 283-tól 573 K-ig változhat. A fűtőasztalt egy, a fűtőasztalhoz tervezett skálával és mutatót tartalmazó különleges hőmérsékletjelző készülékkel látták el. Az olvadáspont meghatározására az anyagot vékony rétegben közvetlenül a fűtőasztal felületére helyezik. Néhány másodpercen belül éles elválasztó vonal alakul ki a folyékony és szilárd fázis között. Ekkor a mutatót a vonal hátralévő részéhez állítva leolvassák az elválasztó vonalnál kapott hőmérsékletet.

▼B

1.4.2.2. *Olvadásvizsgáló mikroszkóp*

Többféle, mikroszkóppal végrehajtott fűtőasztal-vizsgálat alkalmas a kis mennyiségű anyag olvadáspontjának meghatározására. A fűtőasztalok többségében a hőmérsékletet érzékeny termoelemmel mérik, de esetenként higanyhőmérőt használnak. Egy jellegzetes mikroszkópos, fűtőasztalos olvadáspontvizsgáló-készülék olyan, fémlemezt tartalmazó hevítőkamrával rendelkezik, amelyre a mintát egy tárgylemezen helyezik el. A fémlemez közepén lévő nyílás lehetővé teszi, hogy bejusson a fény a mikroszkóp megvilágító tükréről. Használat közben üveglappal fedik le a kamrát annak érdekében, hogy a vizsgált területről kizárják a levegőt.

A minta hevítését reosztát szabályozza. Optikailag anizotróp anyagokon történő nagyon pontos mérések végrehajtásához polarizált fény használható.

1.4.2.3. *Meniszkusz-módszer*

Ezt a módszert kifejezetten poliamidokhoz használják.

Vizuálisan meghatározzák azt a hőmérsékletet, amelynél egy fűtőasztal és egy, a poliamid próbadarab által tartott üvegfedél közé zárt szilikonolaj meniszkusza elmozdul.

1.4.3. **Fagyáspont meghatározásának módszere**

A mintát speciális kémcsőbe helyezik a fagyáspont meghatározására szolgáló készülékbe. A mintát óvatosan és folyamatosan keverik a hűtés során, és megfelelő időközönként megmérik a hőmérsékletét. Amikor a hőmérséklet néhány leolvasás során állandó marad, ezt a hőmérsékletet jegyzik fel (a hőmérő hibájának figyelembevételével) fagyáspontként.

A túlhűtést a szilárd és a folyékony fázisok közötti egyensúly fenntartásával kell elkerülni.

1.4.4. **Termikus analízis**

1.4.4.1. *Differenciál-termoanalízis (DTA)*

Ez a módszer az anyag és egy referenciaanyag közötti hőmérséklet-különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérsékletprogrammal vizsgálják. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy keresztül, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

▼B

1.4.4.2. *Differenciál scanning kalorimetria (DSC)*

Ez a módszer egy anyagba és a referenciaanyagba történő energiabevitelek közötti különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanolyan irányított hőmérsékletprogrammal vizsgálják. Ez az energia az anyag és a referenciaanyag közötti nulla hőmérséklet-különbség létrehozásához szükséges energia. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy keresztül, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

1.4.5. **Dermedéspont**

Ezt a módszert ásványolajoknál történő használatra fejlesztették ki, és minden alacsony olvadáspontú, olajtartalmú anyaghoz használható.

Előzetes melegítés után a mintát meghatározott ütemben hűtik, és 3 K hőfokintervallumonként megvizsgálják a folyási jellemzőit. Dermedéspontként azt a legalacsonyabb hőmérsékletet jegyzik fel, amelynél még megfigyelhető az anyag mozgása.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A következő táblázat sorolja fel az olvadáspont/olvadási tartomány meghatározásához használt különböző módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát:

TÁBLÁZAT: A MÓDSZEREK ALKALMAZHATÓSÁGA

A. **Kapilláris módszerek**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság ([1])	Meglévő szabvány
Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel	Igen	Csak néhányhoz	273-tól 573 K-ig	± 0,3K	J1S K 0064
Olvadáspontmérő készülékek fémblokkal	Igen	Csak néhányhoz	293-tól > 573 K-ig	± 0,5K	ISO 1218 (E)
Fotocellás meghatározás	Igen	Többféle Készülékkel, eszközzel	253-tól 573 K-ig	± 0,5K	

([1]) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

▼B

B. **Fűtőasztalok és fagyasztási módszerek**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság ([1])	Meglévő szabvány
Kofler-féle fűtőasztal rúd	Igen	Nem	283-tól > 573 K-ig	± 1,0 K	ANSI/ASTMD 3451-76
Olvadást vizsgáló mikroszkóp	Igen	Csak néhányhoz	273-tól > 573 K-ig	± 0,5K	DIN 53736
Meniszkusz-módszer	Nem	Különösen poliamidokhoz	293-tól > 573 K-ig	± 0,5K	ISO 1218(E)
Fagyáspont meghatározási módszer	Igen	Igen	223-tól 573 K-ig	± 0,5 K	pl. BS 4695

([1]) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

C. **Termoanalízis**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatók	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság ([1])	Meglévő szabvány
Differenciál-termoanalízis	Igen	Igen	173-tól 1 273 K-ig	600 K-ig ± 0,5 K, 1 273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537- 76
Differenciál scanning kalorimetria	Igen	Igen	173-tól 1 273 K-ig	600 K-ig ± 0,5 K, 1 273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537-76

([1]) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

D. **Dermedéspont**

Mérési módszer	Azok az anyagok, amelyek poríthatok	Azok az anyagok, amelyek nem poríthatók könnyen	Hőmérséklet-tartomány	Becsült pontosság ([1])	Meglévő szabvány
Dermedéspont	Ásványolajokhoz és olajtartalmú anyagokhoz	Ásványolajokhoz és olajtartalmú anyagokhoz	223-tól 323K-ig	± 3,0 K	ASTM D 97-66

([1]) A készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától függ.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

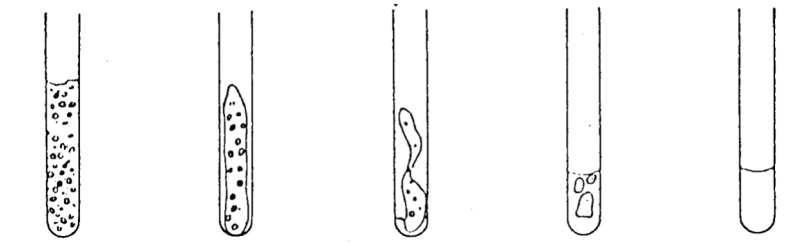
A nemzetközi és nemzeti szabványok csaknem minden vizsgálati módszert leírnak (lásd az 1. függeléket).

1.6.1. **Módszerek kapilláris csővel**

Lassú hőmérséklet-növelés esetén a finom porrá őrölt anyagok rendszerint az 1. ábrán látható olvadási szakaszokat mutatják.

▼B

1. ábra



A. szakasz (Az olvadás kezdete): finom cseppecskék egyenletesen tapadnak a kapilláris cső belső falához.

B. szakasz Térköz jelenik meg a minta és a belső fal között az olvadt anyag zsugorodása miatt.

C. szakasz Az összezsugorodott minta kezd összeesni és cseppfolyósodni.

D. szakasz Teljes meniszkusz jön létre a felületen, de a minta észlelhető mennyisége szilárd marad.

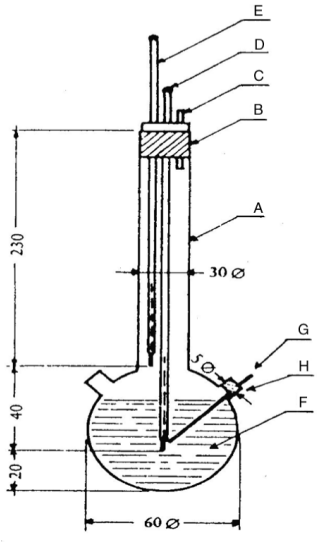
E. szakasz (Az olvadás végső szakasza): nincsenek szilárd részecskék.

Az olvadáspont meghatározása során az olvadás kezdeti és végső hőmérsékletét jegyzik fel.

1.6.1.1. *Olvadáspontmérő folyadékfürdő készülék*

A 2. ábra egy szabványosított, üvegből készített olvadáspontmérő készüléktípust (JIS K 0064) mutat; minden méret milliméterben van megadva.

2. ábra



A: Mérőedény
B: Dugó
C: Szellőzőnyílás
D: Hőmérő
E: Segédhőmérö
F: Fürdőfolyadék
G: 80–100 mm hosszúságú, 1,0 ± 0,2 mm belső átmérőjű, 0,2–0,3 mm falvastagságú, üvegből készült kapilláris cső
H: Oldalcső

▼B

Fürdőfolyadék:

Megfelelő folyadékot kell választani. A folyadék kiválasztása a meghatározni kívánt olvadásponttól függ, például 473 K-nél nem magasabb olvadáspontokhoz folyékony paraffin, 573 K-nél nem magasabb olvadáspontokhoz szilikonolaj alkalmas.

523 K feletti olvadáspontokhoz három tömegrész kénsavból és két tömegrész káliumszulfátból álló keverék használható. Ennek használata esetén megfelelő óvintézkedéseket kell tenni.

Hőmérő:

Csak azok a hőmérők használhatók, amelyek megfelelnek az alábbi, vagy ezzel egyenértékű szabványok követelményeinek:

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

Eljárás:

A száraz anyagot dörzscsészében finom porrá őrlik, és behelyezik az egyik végén leforrasztott kapilláris csőbe úgy, hogy a töltési szint körülbelül 3 mm legyen szoros összetömörítés után. Az egységes tömörített minta eléréséhez a kapilláris csövet függőlegesen, üvegcsövön keresztül óraüvegre kell ejteni körülbelül 700 mm magasságból.

A megtöltött kapilláris csövet úgy kell a fürdőbe helyezni, hogy a hőmérő higanygömbjének középső része azon a helyen érintkezzen a kapilláris csővel, ahol az anyag található. A kapilláris csövet általában az olvadási hőmérsékletnél 10 K-nel alacsonyabb hőmérséklet mellett helyezik a készülékbe.

A folyadékfürdőt úgy melegítik, hogy a hőmérséklet-növekedés mértéke körülbelül 3 K/perc legyen. A folyadékot keverni kell. Körülbelül 10 K-nel a várt olvadáspont előtt a hőmérsékletnövekedési ütemet maximum 1 K/perc értékre kell módosítani.

Számítás:

Az olvadáspont számítása a következőképpen történik:

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

Ahol:

T = korrigált olvadáspont K-ben

T_D = a D hőmérő által mutatott hőmérsékletérték K-ben

T_E = az E hőmérő által mutatott hőmérsékletérték K-ben

N = a D hőmérőn a folyadékfürdőből kiemelkedő részen a higanyoszlop fokbeosztásainak száma

1.6.1.2. *Olvadáspontmérő készülékek fémblokkal*

Készülék:

A következőkből áll:

— hengeres fémblokk, amelynek a belső része üreges és kamrát alkot (lásd a 3. ábrát),

— fémdugó, két vagy több furattal, amelynek segítségével csövek vezethetők a fémblokkba,

▼B

— egy, a fémblokkhoz létrehozott fűtőrendszer, amelyet például a fémblokkhoz csatolt, zárt elektromos ellenállás biztosít,

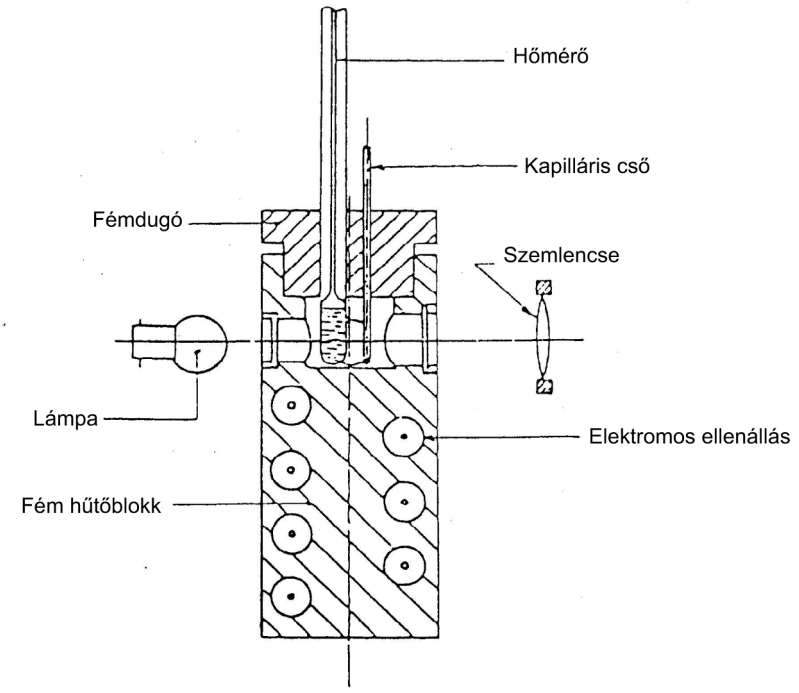
— reosztát az energiabevitel szabályozásához, elektromos fűtés használatakor,

— a kamra oldalfalain négy, hőálló üvegből készült ablak, egymással szemben, derékszögben elhelyezve. Az egyik ablak elé nézőkét szereltek fel a kapilláris cső megfigyeléséhez. A többi három ablakot lámpák segítségével a burkolat belsejének megvilágítására használják,

— egyik végén zárt, hőálló üvegből készült kapilláris cső (lásd az 1.6.1.1. pontot).

Lásd az 1.6.1.1. pontban említett szabványokat. Hasonló pontosságú termoelektromos mérőkészülékek is alkalmazhatók.

3. ábra



1.6.1.3. *Fotocellás meghatározás*

Készülék és eljárás:

A készülék egy automatikus hűtőrendszerrel ellátott fémkamrából áll. Három kapilláris csövet töltenek meg az 1.6.1.1. pontnak megfelelően, és helyeznek a kemencébe.

▼B

Különböző lineáris hőmérséklet-növelési lehetőségek állnak rendelkezésre a készülék kalibrálásához, az alkalmas hőmérséklet-növekedés beállítása elektromosan történik egy előre kiválasztott konstans és lineáris értékre. Regisztráló készülékek mutatják a kemence tényleges hőmérsékletét és a kapilláris csövekben lévő anyag hőmérsékletét.

1.6.2. **Fűtőasztalok**

1.6.2.1. *Kofler-féle fűtőasztal*

Lásd a függeléket.

1.6.2.2. *Olvadásvizsgáló mikroszkóp*

Lásd a függeléket.

1.6.2.3. *Meniszkusz-módszer (poliamidok)*

Lásd a függeléket.

Az olvadásponton a hevítés sebességének 1 K/perc értéknél kisebbnek kell lennie.

1.6.3. **A fagyáspont meghatározásának módszerei**

Lásd a függeléket.

1.6.4. **Termikus analízis**

1.6.4.1. *Differenciál-termoanalízis*

Lásd a függeléket.

1.6.4.2. *Differenciál scanning kalorimetria*

Lásd a függeléket.

1.6.5. **Dermedéspont meghatározása**

Lásd a függeléket.

2. **ADATOK**

Néhány esetben a hőmérő helyesbítése szükséges.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések), és amennyiben volt ilyen, előzetes tisztítási fokának pontos ismertetését,

— a pontosság becslését.

Legalább két, a becsült pontossági tartományban lévő mért érték (lásd a táblázatokat) középértékét adják meg olvadáspontként.

▼B

Amennyiben az olvadás kezdetén és végső szakaszában mért hőmérséklet közötti különbség a módszer pontossági határai között van, az olvadás végső szakaszában mért hőmérsékletet kell olvadáspontnak tekinteni; egyébként meg kell adni mind a két hőmérsékletet.

Amennyiben az anyag elbomlik vagy szublimál az olvadáspont elérése előtt, meg kell adni azt a hőmérsékletet, amelynél ez a hatás megfigyelhető.

A vizsgálati jelentésben közölni kell minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 102. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

(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

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújthatnak.

1. **Kapilláris módszerek**

1.1. Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel

ASTM E 324-69	Standard test method for relatíve 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. Olvadáspontmérő készülékek fémblokkal

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”

2. **Fűtőasztal**

2.1. Kofler-féle fűtőasztal

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

2.2. Olvadáspont-vizsgáló mikroszkóp

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniszkusz-módszer (poliamidok)

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	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion”. Méthode du ménisque

3. **Módszerek a fagyáspont meghatározására**

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 pétrole: détermination de la température de figeage
DIN 53175	Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren
NF T 60-114	Point de fusion des paraffines
NF T 20-051	Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)
ISO 1392	Method for the determination of the freezing point

4. **Termikus analízis**

4.1. Differenciál termoanalízis

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 thermo-analytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Differenciál scanning kalorimetria

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 thermo-analytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Dermedéspont meghatározása**

NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement 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. FORRÁSPONT

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az OECD vizsgálati irányelveken (1) alapul. Az alapelveket a (2) és (3) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt leírt módszerek és eszközök folyadékokhoz és alacsony olvadáspontú anyagokhoz alkalmazhatók, feltéve hogy azok a forráspont alatt nem mennek keresztül kémiai reakción (például autooxidáció, átrendeződés, bomlás stb.). A módszerek tiszta és szennyezett folyékony anyagokhoz alkalmazhatók.

A hangsúly a fotocellás meghatározást és a termikus analízist használó módszereken van, mivel ezek a módszerek lehetővé teszik az olvadás-, valamint a forráspontok meghatározását. Ezenkívül a mérések automatikusan hajthatók végre.

A „dinamikus módszernek” megvan az az előnye, hogy a gőznyomás meghatározásához is alkalmazható, és nincs szükség a forráspontnak a normál nyomásra (105,325 kPa) történő átszámítására, mivel a normál nyomás a mérés során manosztát segítségével beállítható.

Megjegyzések:

A szennyeződéseknek a forráspont meghatározására gyakorolt hatása nagymértékben függ a szennyezés természetétől. Amennyiben olyan illékony szennyezések vannak a mintában, amelyek befolyásolhatják az eredményt, az anyag még tisztítható lehet.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A normál forráspont az a hőmérséklet, amelynél valamely folyadék gőznyomása 101,325 kPa.

Amennyiben a forráspontot nem normál légköri nyomáson mérik, a gőznyomásnak a hőmérséklettől való függése a Clausius–Clapeyron egyenlet segítségével írható le:

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

ahol:

p = az anyag gőznyomása Pascalban

H_v = az anyag párolgási hője mol^{-1} mértékegységben

R = általános moláris gázállandó = 8,314 J mol^{-1} K^{-1}

T = termodinamikus hőmérséklet K-ben

A forráspontot a mérés során észlelhető környezeti nyomás figyelembevételével adják meg.

▼B

Átszámítások

Nyomás (mértékegysége: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(a „bar” még mindig megengedhető, de nem ajánlott)

133 Pa = 1 Hgmm = 1 Torr

(a „Hgmm” és „Torr” mértékegységek nem megengedettek)

1 atm = normál atmoszféra = 101 325 Pa

(az „atm” mértékegység nem megengedett)

Hőmérséklet (mértékegység: K)

$t = T - 273{,}15$

t: Celsius hőmérséklet, Celsius-fok (^{o}C)

T: termodinamikus hőmérséklet, Kelvin (K)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyag a függelékben felsorolt módszerek leírásában található.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A forráspont (forrásponttartomány) meghatározására szolgáló öt módszer a forráspont mérésén, míg két további módszer termikus analízisen alapul.

1.4.1. **Meghatározás ebulliométer segítségével**

Az ebulliométereket eredetileg a forráspont-növekedés alapján történő molekulasúlymeghatározáshoz fejlesztették ki, de pontos forráspontmérésekhez is alkalmasak. Az ASTM D 1120-72-es szabvány egy nagyon egyszerű készüléket ismertet (lásd a függeléket). A folyadékot ebben a készülékben egyensúlyi körülmények között, légköri nyomáson forrásig hevítik.

1.4.2. **Dinamikus módszer**

E módszerrel a gőz újrakondenzálódási hőmérsékletét mérik forráskor, megfelelő hőmérővel a refluxban. A módszerben a nyomás változtatható.

1.4.3. **Desztillációs módszer forráspont meghatározására**

Ez a módszer a folyadék desztillálását, a gőz kondenzációs hőmérsékletének mérését és a desztillátum mennyiségének meghatározását foglalja magában.

▼B

1.4.4. **Siwoloboff-módszer**

A mintát folyadékfürdőbe merített mintacsőben melegítik. A mintacsőbe bemerítenek egy, az alsó részében levegőbuborékot tartalmazó, az alján összeolvasztott hajszálcsövet.

1.4.5. **Fotocellás meghatározás**

A Siwoloboff-alapelvet követve automatikus fotoelektromos mérést hajtanak végre felszálló buborékok segítségével.

1.4.6. **Differenciál-termoanalízis**

Ez a módszer az anyag és egy referenciaanyag közötti hőmérséklet-különbséget a hőmérséklet függvényében regisztrálja, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérséklet-programmal vizsgálják. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy át, ezt a változást a regisztrált hőmérsékleti görbe alapvonalától való endoterm eltérés (forrás) jelzi.

1.4.7. **Differenciál scanning kalorimetria**

Ez a módszer az anyagba és a referenciaanyagba történő energiabevitelek közötti különbséget regisztrálja a hőmérséklet függvényében, miközben az anyagot és a referenciaanyagot ugyanazzal az irányított hőmérsékletprogrammal vizsgálják. Ez az energia az anyag és a referenciaanyag közötti nulla hőmérséklet-különbség létrehozásához szükséges energia. Amikor a minta entalpiaváltozással járó fázisátalakuláson megy át, ezt a változást a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm eltérés (forrás) jelzi.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az 1. táblázat sorolja fel a forráspont/forrástartomány meghatározásához használt különböző módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát.

1. táblázat

A módszerek összehasonlítása

Mérési módszer	Becsült pontosság	Meglévő szabvány
Ebulliométer	± 1,4 K (373 K-ig) (1) (2) ± 2,5 K (600 K-ig) (1) (2)	ASTMD 1120-72 (1)
Dinamikus módszer	± 0,5 K (600 K-ig) (2)	
Desztillációs folyamat (forrási tartomány)	± 0,5 K (600 K-ig)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboff szerint	± 2 K (600 K-ig) (2)	
Fotocellás meghatározás	± 0,3 K (373 K-ig) (2)	
Differenciál-termokalorimetria	± 0,5 K (600 K-ig) ± 2,0 K (1 273 K-ig)	ASTM E 537-76
Differenciál scanning kalorimetria	± 0,5 K (600 K-ig) ± 2,0 K (1 273 K-ig)	ASTM E 537-76

(1) Ez a pontosság csak az olyan egyszerű készülékhez érvényes, mint amelyet például az ASTM D1120-70 ír le; a pontosság növelhető korszerű ebulliométerrel.
(2) Csak tiszta anyagokra érvényes. Más körülmények közötti használatát indokolni kell.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

A nemzetközi és nemzeti szabványok (lásd a függeléket) csaknem minden vizsgálati módszert tartalmaznak.

1.6.1. **Ebulliométer**

Lásd a függeléket.

1.6.2. **Dinamikus módszer**

Lásd a gőznyomás meghatározására szolgáló A.4-es vizsgálati módszert.

Az észlelt forráspontot 101,325 kPa alkalmazott nyomás mellett adják meg.

1.6.3. **Desztillációs folyamat (forrási tartomány)**

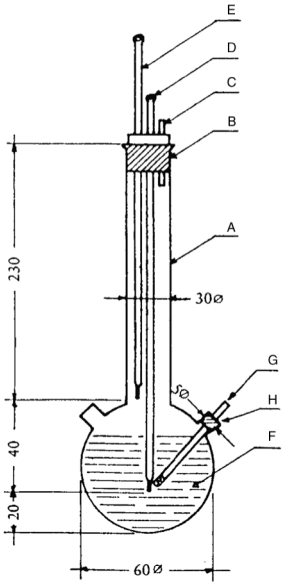
Lásd a függeléket.

1.6.4. **Siwoloboff-módszer**

A mintát egy olvadáspontmérő készülékben, egy körülbelül 5 mm átmérőjű mintacsőben melegítik (1. ábra).

Az 1. ábra a szabványosított olvadás- és forráspontmérő készülékek egyik típusát (JIS K 0064) mutatja be (üvegből készült, minden méret milliméterben van megadva).

1. ábra



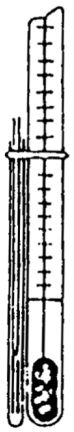
A: Mérőedény
B: Dugó
C: Szellőzőnyílás
D: Hőmérő
E: Segédhőmérő
F: Folyadékfürdő
G: Mintacső, maximum 5 mm-es külső átmérőjű; egy körülbelül 100 mm hosszú, körülbelül 1 mm belső átmérőjű és körülbelül 0,2–0,3 mm falvastagságú kapilláris csövet tartalmaz
H: Oldalcső

A mintacsőbe egy, az alsó vége fölött körülbelül 1 cm-rel leforrasztott kapilláris csövet helyeznek be (forrási kapilláris). A vizsgált anyagot addig töltik be, hogy a kapilláris leforrasztott szakasza a folyadék felszíne alatt legyen. A forrási kapillárist tartalmazó mintacsövet a hőmérőhöz rögzítik egy gumiszalaggal, vagy oldalról egy tartóval rögzítik (lásd a 2. ábrát):

▼B

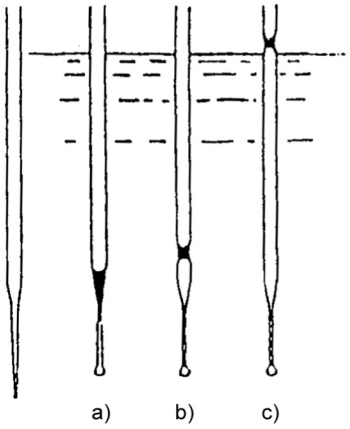
2. ábra

Müködési alapelv Siwoloboff szerint



3. ábra

Módosított alapelv



A folyadékfürdőt a forráspontnak megfelelően választják ki. 573 K hőmérsékletig szilikonolaj használható. Paraffinolaj csak legfeljebb 473 K-ig használható. A fürdőben lévő folyadék melegítését először 3 K/perc hőmérséklet-növekedésre kell beállítani. A folyadékfürdőt keverni kell. A várt forráspont alatt körülbelül 10 K-nel csökkenteni kell a melegítést úgy, hogy a hőmérséklet-növekedés üteme 1 K/perc értéknél kisebb legyen. A forráspont megközelítésekor gyors ütemben buborékok kezdenek megjelenni a forraló kapillárisból.

A forráspont az a hőmérséklet, amelynél, további hűtéskor, megáll a buboréklánc, és hirtelen növekedni kezd a folyadékszint a kapillárisban. Az ennek megfelelő, a hőmérőn látható érték az anyag forráspontja.

A módosított alapelv esetében (3. ábra) a forráspontot egy olvadáspont mérésére szolgáló kapillárisban határozzák meg. Ezt a kapillárist megnyújtották hegyes csúcsúra körülbelül 2 cm hosszúságban (a), és ezzel kis mennyiségű mintát szívnak fel. A hegyes kapilláris cső nyitott végét összeolvasztással lezárják úgy, hogy a végén legyen egy kis légbuborék. Az olvadáspont meghatározására szolgáló készülék melegítésekor (b) kitágul a légbuborék. A forráspont annak a hőmérsékletnek felel meg, amelynél az anyagból álló dugó eléri a folyadékfürdő felületének szintjét (c).

1.6.5. **Fotocellás meghatározás**

A mintát egy fűtött fémblokkba helyezett kapilláris csőben melegítik.

A blokkban lévő alkalmas nyílásokon keresztül egy fénysugarat irányítanak az anyagon át egy pontosan kalibrált fotocellára.

A minta hőmérséklet-növekedése során egyenként légbuborékok jelennek meg a forrásban lévő anyagot tartalmazó kapillárisból. A forráspont elérésekor nagymértékben megnövekszik a buborékok száma. Ez változást hoz létre a fényerőben, amelyet egy fotocella regisztrál, és stopjelet ad a blokkban elhelyezett platina ellenállás-hőmérő hőmérsékletét jelző készüléknek.

A módszer különösen hasznos, mivel lehetővé teszi a szobahőmérséklet alatti meghatározásokat egészen 253,15 K-ig (–20 °C) anélkül, hogy bármilyen változtatást kellene végrehajtani a készülékben. A készüléket egyszerűen el kell helyezni egy hűtőfürdőben.

▼B

1.6.6. **Termikus analízis**

1.6.6.1. *Differenciál-termoanalízis*

Lásd a függeléket.

1.6.6.2. *Differenciál scanning kalorimetria*

Lásd a függeléket.

2. **ADATOK**

A normál nyomástól való kis eltéréseknél (max. ± 5 kPa) a forráspontokat T_n-re normalizálják az alábbi, Sidney Young-féle számértékegyenlet segítségével:

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

ahol:

Δp = $(101{,}325 - p)$ [figyeljen az előjelre]

P = mért nyomás kPa mértékegységben

f_T = forráspontváltozás üteme a nyomás függvényében, K/kPa mértékegységben

T = mért forráspont K-ben

T_n = normál nyomásra korrigált forráspont K-ben

Számos anyagra a hőmérséklet-korrekciós tényezőket, az f_T-t, és a közelítő meghatározásokra szolgáló egyenleteket a fent említett nemzetközi és nemzeti szabványok tartalmazzák.

Például a DIN 53171-es módszer a festékekben lévő oldószerekhez a következő közelítő korrekciókat említi meg:

2. táblázat

Hőmerseklet-korrekcios tényezők, F_T

Hőmérséklet, T (K)	Korrekciós tényező, 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. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyezések), és amennyiben van ilyen, az előzetes tisztítási fok pontos ismertetését,

— a pontosság becslését.

Legalább két, a becsült pontossági tartományban lévő mért érték (lásd az 1. táblázatot) középértékét adják meg olvadáspontként.

Meg kell adni a mért forráspontokat és azok középértékét, továbbá kPa-ban azt (azokat) a nyomást (nyomásokat), amelyeknél a méréseket végrehajtották. A nyomásnak lehetőleg a normál légköri nyomáshoz kell közel lennie.

Meg kell adni az eredmények értelmezéséhez lényeges valamennyi információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, a 103. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

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

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

▼B

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújthatnak:

1. **Ebulliométer**

1.1. Olvadáspontmérő készülékek folyadékfürdővel

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

2. **Desztillációs folyamat (forrási tartomány)**

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	Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Differenciál-termoanalízis és differenciál scanning kalorimetria**

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. RELATÍV SŰRŰSÉG

1. MÓDSZER

A leírt módszerek az OECD vizsgálati irányelveken (1) alapulnak. Az alapelveket a (2) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt leírt, a relatív sűrűség meghatározására szolgáló módszerek szilárd és folyékony anyagokhoz alkalmazhatók, a tisztasági fokukra vonatkozó korlátozás nélkül. Az 1. táblázat sorolja fel a különböző alkalmazandó módszereket.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A szilárd anyagok vagy folyadékok D^{20}_4 relatív sűrűsége a vizsgált anyag 20 °C hőmérsékleten meghatározott térfogatának tömege és a 4 °C hőmérsékleten meghatározott ugyanolyan térfogatú víz tömege közötti arány.

A relatív sűrűség dimenzió nélküli szám.

Valamely anyag ρ sűrűsége az m tömegének és v térfogatának a hányadosa. A ρ sűrűség Sí-mértékegységben kg/m^3 -ben van megadva.

1.3. REFERENCIAANYAGOK (1) (3)

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A MÓDSZEREK ALAPELVE

Négy különböző osztályba sorolt módszer használatos.

1.4.1. **Felhajtóerőn alapuló módszer**

1.4.1.1. *Hidrométer (folyékony anyagokhoz)*

Megfelelően pontos és gyors sűrűségmeghatározások érhetők el úszó hidrométerekkel, amelyek lehetővé teszik valamely folyadék sűrűségének meghatározását a merülési mélysége alapján, egy skála leolvasásával.

1.4.1.2. *Hidrosztatikus mérleg (folyékony és szilárd anyagokhoz)*

A levegőben és egy alkalmas folyadékban (például vízben) mért vizsgálati minta tömege közötti különbség használható a minta sűrűségének meghatározására.

Szilárd anyagok esetében a mért sűrűség csak az adott, méréshez használt minta sűrűségét reprezentálja. Folyadékok sűrűségének meghatározásához megmérik egy ismert v térfogatú test tömegét levegőben, majd a folyadékban.

1.4.1.3. *Merülőtest-módszer (folyékony anyagokhoz) (4)*

E módszerben valamely folyadék sűrűségét a vizsgált folyadékba ismert térfogatú test bemerítése előtt és után a folyadék tömegéből határozzák meg.

▼B

1.4.2. **Piknométeres módszerek**

Szilárd anyagokhoz vagy folyadékokhoz különböző alakú és ismert térfogatú piknométerek használhatók. A sűrűséget a megtöltött és üres piknométer tömege közötti különbségből és annak ismert térfogatából számítják ki.

1.4.3. **Levegő-összehasonlítású piknométer (szilárd anyagokhoz)**

A szilárd test sűrűsége, alakjától függetlenül, szobahőmérsékleten, gáz-összehasonlítású piknométerrel mérhető meg. Ehhez az anyag térfogatát levegőben vagy inert gázban egy állítható, kalibrált térfogatú hengerben mérik meg. A sűrűség számításához a térfogatmérés befejezését követően tömegmérést végeznek.

1.4.4. **Oszcillációs sűrűségmérő (5) (6) (7)**

Valamely folyadék sűrűsége megmérhető oszcillációs sűrűségmérővel. Egy U-cső alakban gyártott mechanikus oszcillátort rezegtetnek az oszcillátor tömegétől függő oszcillátor rezonanciafrekvenciáján, amely ennek tömegétől függ. A minta bevitele megváltoztatja az oszcillátor rezonanciafrekvenciáját. A készüléket két, ismert sűrűségű folyékony anyag segítségével kell kalibrálni. Ezeket az anyagokat lehetőleg úgy kell kiválasztani, hogy a sűrűségük lefedje a mérni kívánt tartományt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A relatív sűrűség meghatározására használt különböző módszerek alkalmazhatóságát a táblázat sorolja fel.

1.6. A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

A függelék ismerteti azokat a példaként megadott szabványokat, amelyeket a további technikai részletek megismeréséhez tanulmányozni kell.

A vizsgálatokat 20 °C hőmérsékleten kell végrehajtani, és legalább két mérést kell elvégezni.

2. **ADATOK**

Lásd a szabványokat.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések) és előzetes tisztítási foka, amennyiben van ilyen.

A D_4^{20} relatív sűrűséget az 1.2. pontban meghatározott módon kell megadni a mért anyag fizikai állapotával együtt.

Meg kell adni az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

▼B

Táblázat

A módszerek alkalmazhatósága

Mérési módszer	Sűrűséget		A leginkább lehetséges dinamikus viszkozitás	Meglévő szabványok
	Szilárd anyag	Folyadék		
1.4.1.1. Hidrométer		igen	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050
1.4.1.2 Hidrosztatikus mérleg				
a) szilárd anyagok	igen			ISO 1183 (A)
b) folyadékok		igen	5 Pa s	ISO 901 és 758
1.4.1.3. Merűlőtest-módszer		igen	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknométer				ISO 3507
a) szilárd anyagok	igen			ISO 1183(B) NF T 20-053
b) folyadékok		igen	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. levegő összehasonlítós piknométer	igen			DIN 55990 Teil 3. DIN 53243
1.4.4. Oszcillációs sűrűségmérő		igen	5 Pa s	

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 109. vizsgálati irányelv, a Tanács C(81) 30. határozata, végleges.

(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. 11, 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 digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼B

Függelék

További technikai információt például a következő szabványok nyújtanak:

1. **Felhajtóerőn alapuló módszer**

1.1. Hidrométer

DIN 12790, ISO 387	Hydrometer; general instructions
DIN 12791	Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation 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. Hidrosztatikus mérleg

Szilárd anyagokhoz

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

Folyékony anyagokhoz

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 és 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. Merülőtest-módszer

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

2. **Piknométeres módszerek**

2.1. Folyékony anyagokhoz

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 x $l0^{-6}$ 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 x 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 – Pycnometric method

▼B

2.2. Szilárd anyagokhoz

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 – Pycnometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Levegő-összehasonlítású piknométer**

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

▼M1

A.4. GŐZNYOMÁS

1. MÓDSZER

Ez a módszer megfelel az OECD TG 104 (2004) jelű módszernek.

1.1. BEVEZETÉS

Az A.4. (1) módszer jelen átdolgozott változata tartalmaz egy újabb módszert: „Effúziós módszer: izoterm termogravimetria”, amit nagyon kis gőznyomású (10^{-10} Pa-ig) anyagokra dolgoztak ki. Az eljárásokra vonatkozó igények, különösen a kis gőznyomású anyagok gőznyomásának mérése iránti igények alapján a módszer más eljárásai is átértékelésre kerültek további alkalmazási tartományokat illetően.

Termodinamikailag egyensúlyban lévő tiszta anyagok gőznyomása csak a hőmérséklet függvénye. Az alapelvek ismertetése megtalálható az irodalomban (2)(3).

Nincs egyetlen mérési eljárás a gőznyomás mérésére a 10^{-10} Pa alattitól a 10^5 Pa-ig terjedő tartomány egészére. Ez a módszer nyolc különböző gőznyomásmérési módszert foglal magában, melyek különböző gőznyomás-tartományokra alkalmazhatóak. Az 1. táblázat a különböző módszereket hasonlítja össze az alkalmazásuk és a mérési tartományok szerint. A módszereket csak olyan anyagok esetén lehet alkalmazni, amelyek nem bomlanak a mérés körülményei között. Azokban az esetekben, amikor kísérleti módszerek eljárástechnikai okok miatt nem alkalmazhatók, a gőznyomás becsléssel is megállapítható, és a függelék tartalmaz egy ajánlott becslési módszert.

1.2. DEFINÍCIÓK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Egy anyag gőznyomása definíció szerint a szilárd vagy folyékony anyag felett kialakult, telített gőz nyomása.

A nyomás SI mértékegységét, a pascalt (Pa) kell használni. Korábban alkalmazott más mértékegységek, és átváltási tényezőik:

1 torr	= 1 Hgmm	= $1{,}333 \times 10^2$ Pa
1 atmoszféra	= $1{,}013 \times 10^5$ Pa	
1 bar	= 10^5 Pa	

Az SI szerinti hőmérséklet-mértékegység a kelvin (K). A Celsius fok átváltása kelvin fokra a következő egyenlet alapján történik:

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

ahol T a kelvinben mért, más néven termodinamikai hőmérséklet, t pedig a hőmérséklet Celsius fokban.

▼**M1**

1. táblázat

Mérési módszer	Anyag		becsült ismételhetőség	becsült reprodukálhatóság	ajánlott tartomány
	szilárd	folyékony			
Dinamikus módszer	kis olvadáspont	Igen	25 %-ig 1–5 %	25 %-ig 1–5 %	10^3 Pa–2×10^3 Pa 2×10^3 Pa–10^5 Pa
Statikus eljárás	Igen	Igen	5–10 %	5–10 %	10 Pa–10^5 Pa 10^{-2} Pa–10^5 Pa (1)
Izoteniszkópos módszer	Igen	Igen	5–10 %	5–10 %	10^2 Pa–10^5 Pa
Effúziós módszer: gőznyomás-egyensúly	Igen	Igen	5–20 %	50 %-ig	10^{-3}–1 Pa
Effúziós módszer: Knudsen-cella	Igen	Igen	10–30 %	—	10^{-10}–1 P
Effúziós módszer: izoterm termogravimetria	Igen	Igen	5–30 %	50 %-ig	10^{-10}–1 Pa
Gáztelítéses eljárás	Igen	Igen	10–30 %	50 %-ig	10^{-10}–10^3 Pa
Rotoros eljárás	Igen	Igen	10–20 %	—	10^{-4}–0,5 Pa

(1) Kapacitív manometer használatakor.

1.3. A MÉRÉS ELVE

A gőznyomás meghatározása általában különböző hőmérsékleteken történik. Véges hőmérséklettartományban a tiszta anyag gőznyomásának logaritmusa lineáris függvénye a termodinamikai hőmérséklet reciprokának, az egyszerűsített Clapeyron-Clausius egyenlet szerint:

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

ahol:

p = gőznyomás, pascal (Pa)

ΔHv = párolgási entalpia, J $mól^{-1}$

R = egyetemes gázállandó, 8,314 J $mól^{-1}$ K^{-1}

T = hőmérséklet, kelvin fok (K)

▼**M1**

1.4. REFERENCIAANYAGOK

Referenciaanyagokat nem szükséges használni. Ezek elsődlegesen a módszer alkalmasságának rendszeres ellenőrzésére szolgálnak, illetve lehetővé teszik a különböző módszerekkel kapott eredmények összehasonlítását.

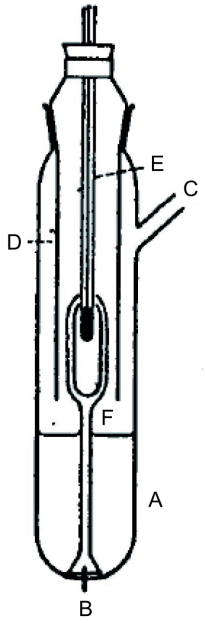
1.5. AZ ELJÁRÁS LEÍRÁSA

1.5.1. **Dinamikus eljárás (Cottrell-módszer)**

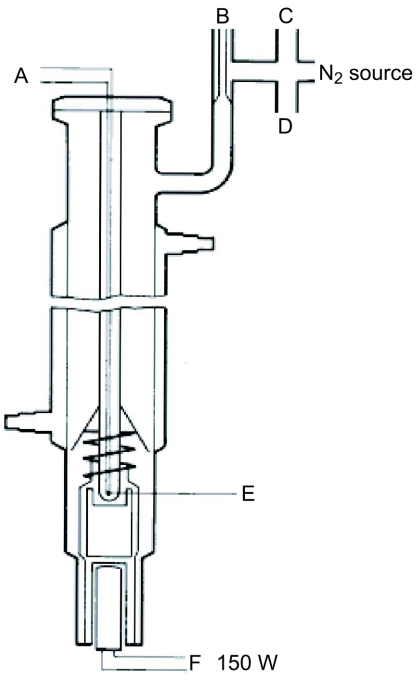
1.5.1.1. *Elv*

Az anyag gőznyomását a forráspontnak különböző meghatározott nyomásokon (kb. 10^3 és 10^5 Pa közötti tartományban) történő mérésével határozzuk meg. Ez az eljárás ajánlott a forráspont meghatározására is. Erre a célra egészen 600 K-ig használható. A folyadékok forráspontja 3–4 cm-rel a folyadék felszíne alatt közelítőleg 0,1 °C-kal nagyobb, mint a felszínén, a folyadékoszlop hidrosztatikai nyomása miatt. A Cottrell-módszernél (4) a hőmérő a folyadék felszíne fölötti gőztérben van, és a forrásban lévő folyadék a forrás szivattyúzó hatásának köszönhetően folyamatosan elborítja a hőmérő érzékelőjét. Ekkor egy vékony folyadékréteg fedi be a hőmérő érzékelőgömbjét, amely egyensúlyt tart a gőzzel a környezeti nyomáson. A hőmérő így a valódi forráspontot mutatja, a túlhevítés, vagy a hidrosztatikai nyomásból eredő hiba nélkül. Az eredeti Cottrell-szivattyú az 1. ábrán látható. Az A jelű lombik tartalmazza a forrásban lévő folyadékot. Egy platinaszál (B) van a lombik fenekébe forrasztva, biztosítva az egyenletes forrást. A C jelű csonk egy kondenzátorral van összekötve, a D jelű köpeny pedig megakadályozza, hogy a hideg kondenzátum elérje a hőmérőt (E). Amikor a folyadék forr a lombikban, a tölcsér által felfogott buborékok és folyadék a szivattyú két ágán (F) keresztül ráfolyik a hőmérő gömbjére.

1. ábra



2 ábra



▼**M1**

Cottrell-szivattyú (4)

A: Hőelem

B: Vákuumpuffer

C: Nyomásmérő

D: Vákuum

E: Mérőpont

F: Fűtőelem, körülbelül 150 W-os

1.5.1.2. *Készülék*

A Cottrell-elv alapján működő, nagyon pontos készülék látható a 2. ábrán. Ez egy lombikból áll, amelynek az alsó részén történik a forralás, a középső részén van egy hűtő, és a felső részén van egy kivezetés és egy zárófedél. A Cottrell-szivattyú a forrástérben van elhelyezve, amit egy elektromos fűtőbetét hevít. A hőmérsékletet a zárófedélen keresztül bevezetett tokozott hőelem, vagy pedig ellenállás-hőmérő méri. A kivezetés a nyomásszabályozó rendszerbe van bekötve. Az utóbbi egy vákuumszivattyúból, egy puffertérből, egy nitrogénadagolással működő nyomásszabályozóból, és egy nyomásmérőből áll.

1.5.1.3. *Eljárás*

Az anyagot a forrástérbe helyezzük. Nem porszerű szilárd anyagok problémát jelenthetnek, de ezek néha kiküszöbölhetőek a hűtőköpeny fűtésével. A készüléket a fedéllel lezárjuk, és az anyagot gáztalanítjuk. Habzó anyag nem mérhető ezzel a módszerrel.

Ezután beállítjuk a legkisebb kívánt nyomást és bekapcsoljuk a fűtést. Ugyanekkor a hőmérsékletérzékelőt rákötjük egy regisztrálóműszerre.

Az egyensúlyt akkor értük el, amikor állandó nyomás mellett a regisztrálóműszer állandó forrási hőmérsékletet mutat. Külön figyelmet kell fordítani arra, hogy elkerüljük a megfutást a forralás alatt. Fontos továbbá, hogy teljes kondenzáció történjen a hűtőben. Amikor kis olvadáspontú szilárd anyag gőznyomását határozzuk meg, figyelmet kell fordítani a hűtő esetleges eltömődésének elkerülésére is.

Az egyensúlyi pont regisztrálása után állítsuk be a következő kívánt nyomást. A folyamatot egészen a 10^5 Pa eléréséig folytatjuk (összesen kb. 5–10 mérési pont). Ellenőrzésként ismételjük meg az eljárást visszafelé, úgy, hogy a nyomásértékek csökkennek.

1.5.2. **Statikus eljárás**

1.5.2.1. *Elv*

A statikus eljárásban (5), a gőznyomást egy adott hőmérsékleten termodinamikai egyensúlyban határozzuk meg. Ez az eljárás olyan anyagokhoz, többkomponensű folyadékokhoz és szilárd anyagokhoz használható, melyek gőznyomástartománya 10^{-1}–10^5 Pa tartományban van, valamint, megfelelő gondossággal, használható az 1–10 Pa tartományban is.

▼**M1**

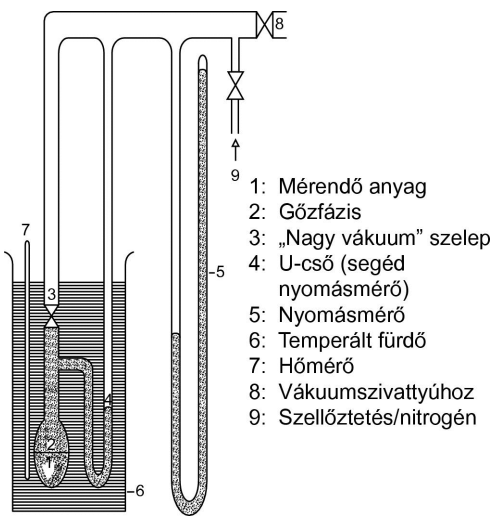
1.5.2.2. *Készülék*

A készülék egy állandó hőmérsékletű (pontosság: ± 0,2 K) fürdőből, egy vákuumvezetékhez kapcsolt mintatartályból, egy nyomásmérőből, és egy nyomásszabályozó rendszerből áll. A mintatartály (3a. ábra) egy szelepen és egy nyomáskülönbség-mérőn (U-csöves manométer alkalmas folyadékkal) keresztül kapcsolódik a vákuumvezetékhez, ez utóbbi a nulla nyomáskülönbség jelzésére szolgál. A nyomástartománytól és a mérendő anyag kémiai viselkedésétől függően higany, szilikonok és ftalátok használhatók az U-csöves manométerben. Környezetvédelmi szempontok miatt azonban a higany használata lehetőség szerint kerülendő. A mérendő anyag nem oldódhat észlelhető mértékben az U-csöves manométerben lévő folyadékban, és nem léphet vele reakcióba. Az U-csöves manométer helyett használható nyomásmérő (3b. ábra). Az U-csöves manométerben higany a légköri nyomástól a 10^2 Pa-ig terjedő tartományban használható, míg a szilikonfolyadékok és ftalátok 10^2 Pa alatt is használhatók, egészen 10 Pa nyomásig. Léteznek más nyomásmérők is, amelyeket lehet 10^2 Pa alatt használni, és a fűthető membránós kapacitív nyomásmérők használhatók még 10^{-1} Pa alatt is. A hőmérséklet mérése a mintát tartalmazó edény külső falán vagy magában az edényben történik.

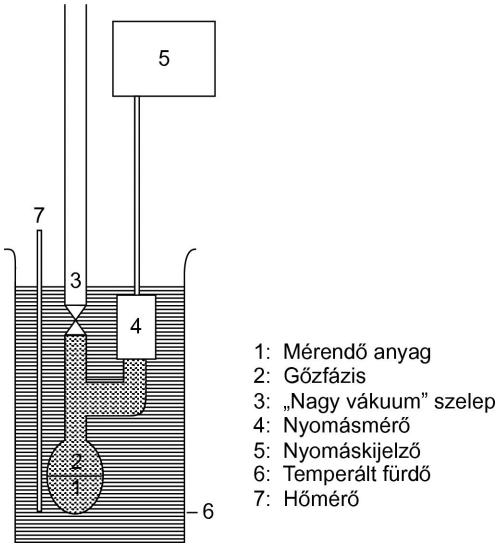
1.5.2.3. *Eljárás*

A 3a. ábrán látható készülék használata esetén a mérés megkezdése előtt az U-csöves manométert megtöltjük a kiválasztott folyadékkal, amelyet a mérések megkezdése előtt melegítéssel gáztalanítani kell. Helyezzük be a mérendő anyagot a készülékbe és gáztalanítsuk csökkentett hőmérsékleten. Többkomponensű minta esetében olyan kis hőmérsékletet kell alkalmazni, amelyen a mérendő anyag összetétele még nem változik meg. Az egyensúly beállását keveréssel gyorsíthatjuk. A minta folyékony nitrogénnel vagy szárazjéggel hűthető, de vigyázni kell, hogy elkerüljük a levegőben lévő pára, vagy a szivattyúfolyadék lecsapódását A mintatartó edény fölött lévő szelepet kinyitva néhány perces szivattyúzással eltávolítjuk a levegőt. Ha szükséges, a gáztalanítási műveltet néhányszor megismételjük.

3a. ábra



3b. ábra



▼M1

Amikor a szelep zárva van és hevítjük az anyagot, a gőznyomás nő. Ez megváltoztatja a folyadék egyensúlyát az U-csőben. Ellensúlyozandó ezt a hatást, nitrogént vagy levegőt engedünk a rendszerbe addig, amíg a nyomáskülönbség-mérő ismét nullát nem mutat. A kiegyenlítéshez szükséges nyomás értéke leolvasható a manométerről, vagy egy nagyobb pontosságú műszerről. Ez a nyomás felel meg az anyag gőznyomásának az adott hőmérsékleten. Ha a 3b. ábrán látható készüléket használjuk, akkor a gőznyomás közvetlenül leolvasható.

A gőznyomás meghatározása megfelelő kis hőmérsékletintervallumonként történik (összesen kb. 5–10 mérési pont) egészen a kívánt legnagyobb hőmérsékletig.

A kis hőmérsékletértékeket eredményező méréseket ellenőrzés céljából meg kell ismételni. Ha a megismételt mérés eredménye nem esik egybe a növekvő hőmérsékletre kapott görbével, az a következő két eset valamelyikére vezethető vissza:

i. a minta még mindig tartalmaz levegőt (pl. nagy viszkozitású anyagok esetében) vagy kis forráspontú anyagokat, melyek felszabadulnak a melegítés alatt;

ii. az anyagnál kémiai reakció lép fel a vizsgált hőmérséklettartományban (pl. bomlás, polimerizáció).

1.5.3. **Izoteniszkópos eljárás**

1.5.3.1. *Elv*

Az izoteniszkóp (6) a statikus eljárás elvén alapul. A módszernél az anyagot egy állandó hőmérsékleten tartott gömbbe helyezzük, és csatlakoztatunk egy manométert és egy vákuumszivattyút. Az anyagnál illékonyabb szennyeződések csökkentett nyomás mellett gáztalanítással eltávolíthatók. A minta gőznyomását adott hőmérsékleteken ismert nyomású semleges gázzal egyensúlyba hozzuk. Az izoteniszkópot egyes folyékony szénhidrogének mérésére fejlesztették ki, de alkalmas szilárd anyagok vizsgálatára is. A módszer általában nem alkalmazható többkomponensű rendszerek esetében. Nem illékony szennyeződéseket tartalmazó minták esetében az eredményekben csak kisebb hibák jelentkeznek. Az ajánlott tartomány 10^2–10^5 Pa.

1.5.3.2. *Készülék*

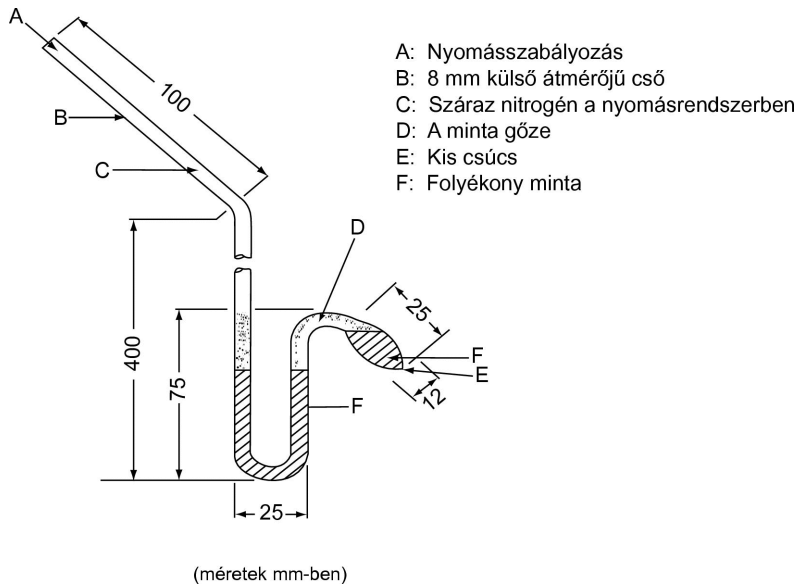
A mérőkészülékre a 4. ábrán látható példa. Teljes leírás az ASTM D 2879–86 szabványban (6) található.

▼**M1**

1.5.3.3. *Eljárás*

Folyadékok esetén magát az anyagot használjuk töltőfolyadékként az U-csöves manométerben. Az izoteniszkópba elegendő folyadékot töltünk ahhoz, hogy a gömb és a manométer rövidebb szára feltöltődjön. Az izoteniszkópot csatlakoztatjuk egy vákuumrendszerhez, kiszivattyúzzuk a levegőt majd megtöltjük nitrogénnel. A kiszivatytyúzást és a rendszer átöblítését kétszer megismételjük, hogy eltávolítsuk a maradék oxigént. A megtöltött izoteniszkópot vízszintes helyzetbe állítjuk, hogy a minta vékony rétegben szétterüljön a mintatartó gömbben és a manométerben. A rendszer nyomását 133 Pa-ra csökkentjük, és a mintát óvatosan melegítjük, amíg éppen forrni nem kezd (az oldott gázok eltávolítása). Ezután az izoteniszkópot úgy helyezzük el, hogy a minta visszatérjen a gömbbe és feltöltse a manométer rövid szárát. A nyomást 133 Pa-on kell tartani. A mintatartó gömb elnyújtott csúcsát kis lánggal hevítjük úgy, hogy a mintából felszabaduló gőz elegendően kiterjedjen ahhoz, hogy kiszorítsa a minta egy részét a mintatartó gömb felső részéből és a manométer szárából a manométerbe, előállítva így egy gőzzel töltött, nitrogénmentes teret. Ezután az izoteniszkópot állandó hőmérsékletű fürdőbe merítjük, és a nitrogén nyomását beállítjuk úgy, hogy egyenlő legyen a mintáéval. Egyensúlyban a nitrogén nyomása megegyezik az anyag gőznyomásával.

4. ábra



(méretek mm-ben)

Szilárd anyag esetén a hőmérséklet- és nyomástartománytól függően a manométer töltőfolyadékaként szilikonfolyadékok, vagy ftalátok használhatók. A gáztalanított manométerfolyadékot az izoteniszkóp hosszú szárán kialakított öblösebb részbe töltjük be. Ezután a vizsgálandó szilárd anyagot behelyezzük a mintatartó gömbbe, és melegítéssel gáztalanítjuk. Ezt követően az izoteniszkópot megdöntjük, hogy a manométerfolyadék befolyjon az U-csőbe.

▼M1

1.5.4. **Effúziós eljárás: gőznyomás-egyensúly** (7)

1.5.4.1. *Elv*

A vizsgálati anyagból vett mintát légüres búra alatt egy kis kemencében hevítjük. A kemence fedelén ismert átmérőjű kis lyukak vannak. Az anyag gőze kilép az egyik lyukon és egy nagyon érzékeny mérleg serpenyőjébe jut, ami szintén a légüres búra alatt van. Néhány konstrukcióban a mérleg serpenyője egy hűtődobozban van, ami hővezetéssel kivonja a hőt a kültérbe, és a serpenyőt hősugárzás révén hűti, hogy a gőz kondenzálódjon rajta. A kilépő gőz nyomatéka erőként hat a mérlegre. A gőznyomást kétféleképpen kaphatjuk meg: közvetlenül a mérleg serpenyőjére ható erőből, vagy pedig a párolgási sebességből, a Hertz-Knudsen egyenlet segítségével (2):

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

ahol:

G = párolgási sebesség (kg s^{-1} m^{-2})

M = moláris tömeg (g mol^{-1})

T = hőmérséklet (K)

R = egyetemes gázállandó (J mol^{-1} K^{-1})

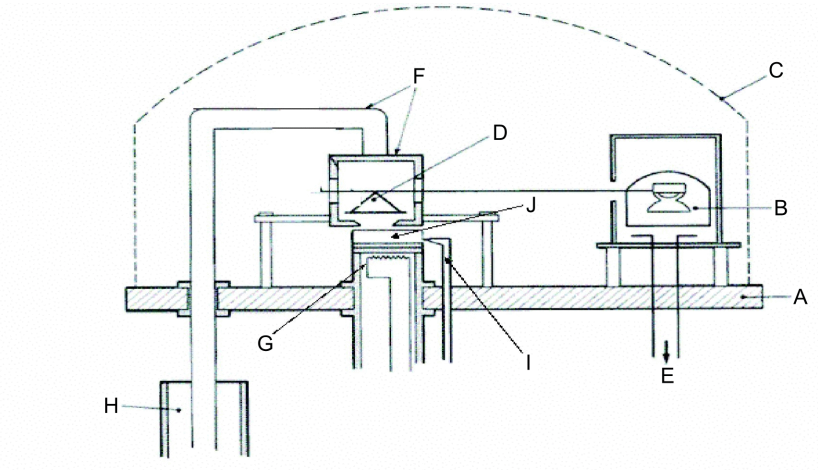
p = gőznyomás (Pa)

Az ajánlott tartomány 10^{-3}–1 Pa.

1.5.4.2. *Készülék*

A készülék működési elve az 5. ábrán látható.

5. ábra



A: Alaplemez

B: Mozgó tekercses berendezés

C: Búra

D: Mérleg serpenyővel

E: Vákuummérő műszer

F: Hűtődoboz és hűtőrúd

G: Párologtató kemence

H: Dewar-edény folyékony nitrogénnel

I: Minta hőmérsékletének mérése

J: Mérendő anyag

▼M1

1.5.5. **Effúziós eljárás: Knudsen-cella**

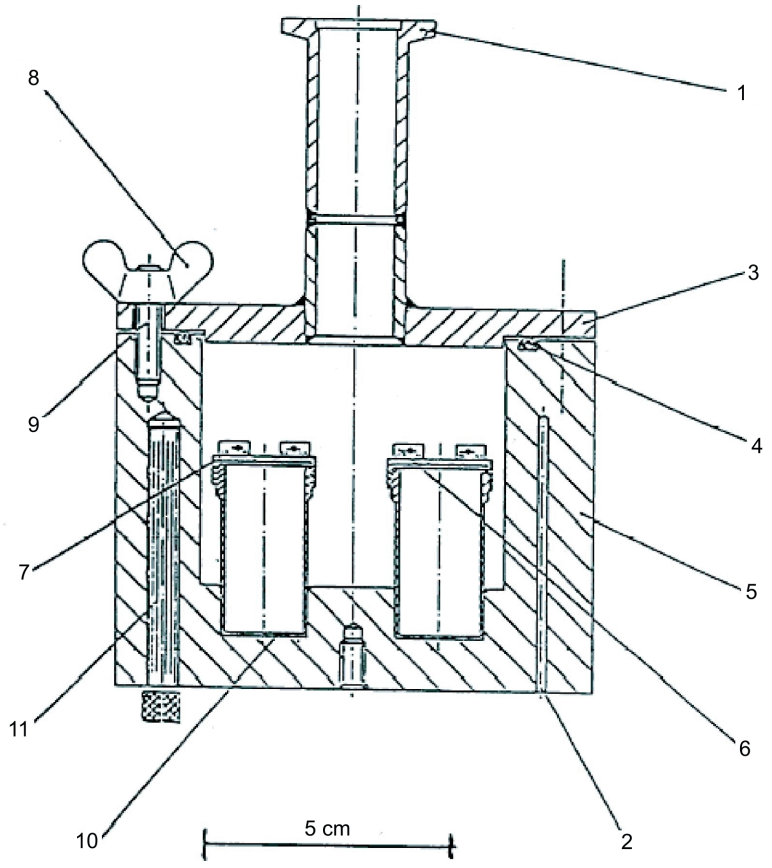
1.5.5.1. *Elv*

Az eljárás a vizsgált anyag Knudsen-cellából (8) mikronyíláson ultravákuumban egységnyi idő alatt gőz formában kilépő tömegének becslésén alapul. A kilépő gőz tömegét meghatározhatjuk a cella tömegvesztéséből, vagy úgy, hogy a gőzt kis hőmérsékleten kondenzáltatjuk, és az elpárolgott anyag mennyiségét kromatográfiásan meghatározzuk. A gőznyomást a Hertz-Knudsen összefüggésből számolhatjuk ki (lásd 1.5.4.1.), a készülék paramétereitől függő korrekciós tényezőkkel (9). Az ajánlott tartomány 10^{-10}–1 Pa (10)-(11)(12)(13)(14).

1.5.5.2. *Készülék*

A készülék működési elve a 6.ábrán látható.

6. ábra



1: Vákuumcsatlakozás

2: Platina ellenállás-hőmérő számára, vagy hőmérsékletmérésre és -szabályozásra szolgáló furatok

3: Vákuumtartály fedele

4: O-gyűrű

5: Alumínium vákuumtartály

6: Eszköz az effúziós cellák be- és kihelyezéséhez

7: Menetes fedél

8: Szárnyas anyák

9: Csavarok

10: Effúziós cella saválló acélból

11: Fűtőbetét

▼M1

1.5.6. **Effúziós eljárás: izoterm termogravimetria**

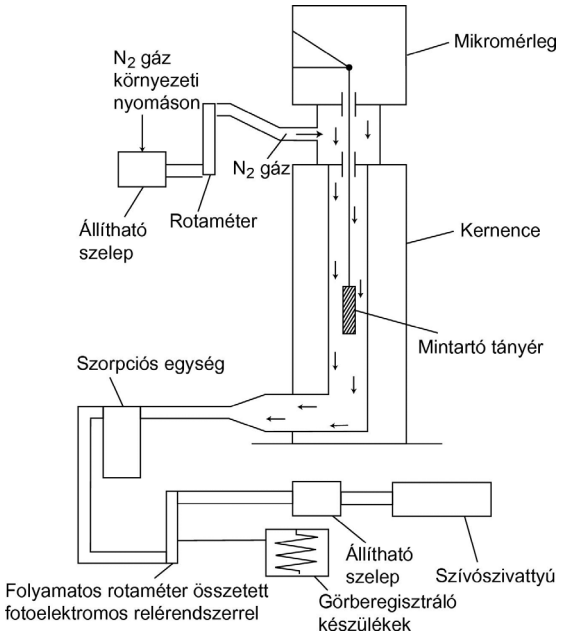
1.5.6.1. *Elv*

A módszer a vizsgált anyag nagyobb hőmérsékleten és környezeti nyomáson fellépő megnövelt párolgási sebességeinek termogravimetriás módszerrel történő meghatározásán alapul (10)(15)(16)(17)(18)-(19)(20). A párolgási sebességeket (v_T) úgy kapjuk, hogy a kiválasztott anyagot lassan áramló inert gáznak tesszük ki, és megfigyeljük az adott T izoterm hőmérsékleten (kelvin) megfelelő időegységek alatt bekövetkező tömegveszteséget. A gőznyomást (p_T) a v_T értékekből számítjuk ki, a gőznyomás logaritmusa és a párolgási sebesség logaritmusa közötti lineáris összefüggés segítségével. Ha szükséges, a (log p_T)-(1/T) görbét regressziós analízissel extrapolálhatjuk 20 °C-ra és 25 °C-ra. Az eljárás alkalmas nagyon kicsi, 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) gőznyomású anyagok méréséhez is, de csak nagyon nagy tisztaságú (majdnem 100 %-os) anyagok esetén, elkerülendő a mért tömegvesztés hibás értelmezését.

1.5.6.2. *Készülék*

Az kísérleti készülék működési elve a 7. ábrán látható.

7. ábra



A mintatartó tányér szabályozott hőmérsékletű kamrában függ egy mikromérlegen, és száraz nitrogén gáz áramlik át rajta, amely elszállítja a mérendő anyagból elpárolgó molekulákat. A kamrából kilépő gázáramot egy abszorpciós egység tisztítja.

1.5.6.3. *Eljárás*

A mérendő anyagot homogén rétegben szétterítjük egy érdesített felületű üvegtányéron. Szilárd anyagok esetén a tányért egyenletesen benedvesítjük az anyag megfelelő oldószerben képzett oldatával, és inert gázzal megszárítjuk. A méréshez a tányért, rajta a mintával, felfüggesztjük a termogravimetriás analizátorban, és folyamatosan mérjük a tömegvesztését az idő függvényében.

▼M1

Az adott hőmérséklethez tartozó párolgási sebességet (v_T) a mintatartó tányér Δm tömegvesztéséből számítjuk a következő képlettel:

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} \left(gcm^{-2}h^{-1} \right)$$

Ahol az F a mérendő anyag felszíne, szokásosan a mintatányér felszíne, a t pedig a Δm tömegvesztéshez tartozó időtartam.

A gőznyomás (p_T) a v_T párolgási sebesség függvényeként számolható:

$$\text{Log } p_T = C + D \log v_T,$$

ahol a C és D állandók, melyek az adott kísérleti elrendezésre jellemzőek és a használt mérőkamra átmérőjétől és a gáz áramlási sebességétől függenek. Ezeket az állandókat egyszer kell meghatározni, ismert gőznyomású vegyületek mérésével és a kapott (log p_T)-(log v) függvények regresszióelemzésével (11)(21)(22).

A gőznyomás (p_T)és a hőmérséklet T (kelvin) közötti összefüggést a következő egyenlet adja meg:

$$\text{Log } p_T = A + B\ 1/T$$

ahol A és B a (log p_T)-(1/T) függvény regresszióelemzésével kapott állandók. Az egyenlet segítségével a gőznyomás extrapolációval átszámolható bármely más hőmérsékletre.

1.5.7. **Gáztelítéses eljárás** (23)

1.5.7.1. *Elv*

Semleges gáz ismert sebességgel, szobahőmérsékleten áramlik a mintaanyag felett vagy azon keresztül, elég lassan ahhoz, hogy megtörténjen a telítődés. A gázfázis telítettségének elérése kritikus fontosságú. A gáz által szállított anyagot felfogjuk, általában abszorbenssel, és ezt a felfogott anyagmennyiséget határozzuk meg. A gőz felfogása és az azt követő analízis alternatívájaként a szállított anyag mennyiségi meghatározására folyamatos analitikai technikák is használhatók, mint például gázkromatográfia. A gőznyomás annak a feltételezésnek az alapján számítható ki, hogy érvényes az ideálisgáz-törvény, és hogy a gázkeverék össznyomása megegyezik az azt alkotó gázok parciális nyomásának összegével. A mintaanyag parciális nyomása, azaz a gőznyomás az ismert össz-gáztérfogatból és a gáz által szállított anyag tömegéből számítható ki.

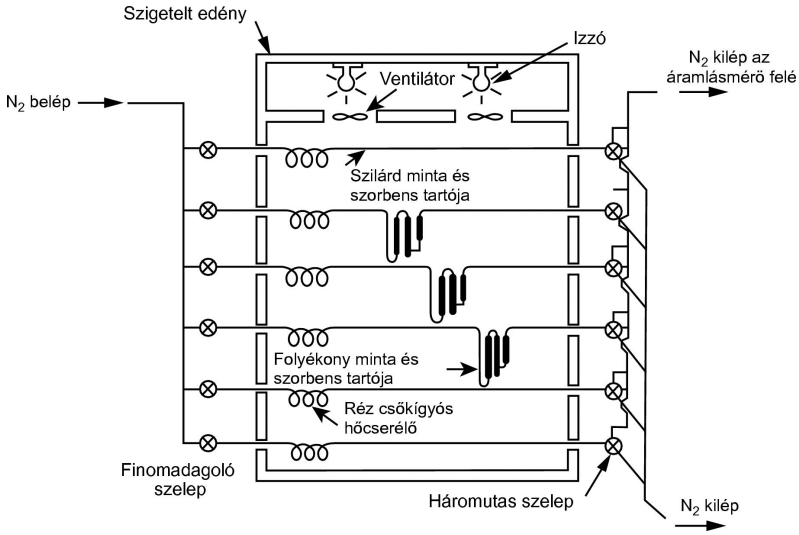
A gáztelítéses eljárás szilárd, vagy folyékony anyagok mérésére használható. Egészen 10^{-10} Pa gőznyomásig alkalmazható (10)(11)-(12)(13)(14). Az eljárás 10^3 Pa gőznyomás alatt a legmegbízhatóbb. Általában 10^3 Pa felett a gőznyomás értéke túlbecsült, valószínűleg aeroszol-képződés miatt. Mivel a gőznyomás-mérés szobahőmérsékleten történik, nincs szükség nagy hőmérsékletről történő extrapolálásra – amely gyakran komoly hibákat okoz – és így az elkerülhető.

1.5.7.2. *Készülék*

Az eljárás állandó hőmérsékletű készülék használatát igényli. A 8. ábrán lévő rajzon látható készülékben három-három mintatartó van folyékony, illetve szilárd mintákhoz, ami lehetővé teszi egy szilárd vagy folyékony minta hármas elemzését. A hőmérsékletszabályozás pontossága ± 0,5 °C, vagy jobb.

▼**M1**

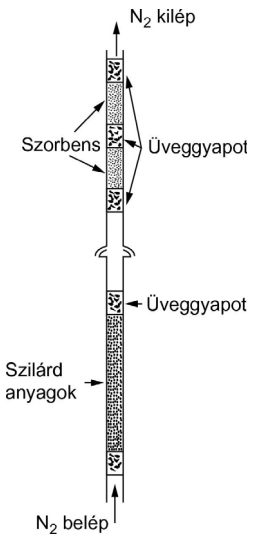
8. ábra



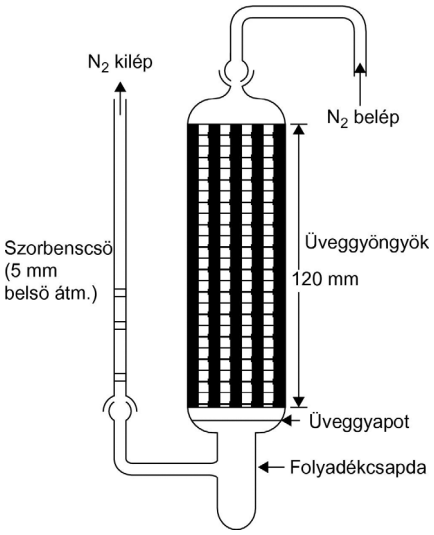
Inert vivőgázként általában nitrogént használunk, de esetenként más gáz lehet szükséges (24). A vivőgáznak száraznak kell lennie. A gázáram 6 részáramra van osztva, amelyeket tűszelep szabályoz (kb. 0,79 mm-es szelepnyílás), és 3,8 mm belső átmérőjű rézcsöveken keresztül jut be az edénybe. A hőmérséklet kiegyenlítődése után a gáz átáramlik a mintán és az abszorbensen, majd kilép a készülékből.

Szilárd mintákat 5 mm-es belső átmérőjű üvegcsőbe, üveggyapotdugók közé töltünk (9. ábra). A 10. ábrán egy folyadékminta-tartó és abszorpciós rendszer látható. Folyadékok gőznyomás-mérésének legjobban reprodukálható módszere az, hogy a folyadékot üveggyöngyre vagy inert abszorbens anyagra (pl. szilika) visszük fel, és a mintatartót ezekkel a gyöngyökkel töltjük meg. Más megoldásként a vivőgáz durva üvegszemcséken áramlik keresztül, és átbuborékol a vizsgált anyag folyadékoszlopán.

9. ábra



10. ábra



▼M1

Az abszorbensrendszer egy elülső és egy hátsó abszorbensszakaszból áll. Nagyon kis gőznyomáson az abszorbens csak csekély mennyiséget tart vissza és a minta és az abszorbens között lévő üveggyapoton és üvegcsövön lejátszódó abszorpció komoly probléma lehet.

Egy másik hatékony módja az elpárolgott anyag felfogásának a szárazjéggel hűtött folyadékcsapda. Nem okoz ellennyomást a telítő oszlopon, és a felfogott anyag teljes mennyisége is könnyen visszanyerhető.

1.5.7.3. *Eljárás*

A kilépő vivőgáz áramlási sebességét szobahőmérsékleten határozzuk meg. Az áramlási sebességet gyakran kell ellenőrizni a kísérlet folyamán, biztosítandó, hogy pontos érték álljon rendelkezésre a vivőgáz össztérfogatára vonatkozóan. Célszerű folyamatos ellenőrzést végezni tömegáram-mérővel. A gázfázis telítése meglehetősen hosszú tartózkodási időt igényel, így a gázáramlási sebességek meglehetősen kicsik lesznek (25).

A kísérlet végén mind az elülső, mind a hátsó abszorbensszakaszt külön-külön elemezzük. A vegyületet mindegyik szakaszban oldószer hozzáadással deszorbeáljuk. A kapott oldatokat kvantitatív elemzésnek vetjük alá az egyes szakaszokból deszorbeált mennyiségek meghatározására. A vizsgált anyag jellege szabja meg az analitikai módszer kiválasztását (illetve az abszorbens és a deszorpcióhoz használt oldószer kiválasztását is). A deszorpció hatékonyságát úgy határozzuk meg, hogy ismert mennyiségű mintát juttatunk az abszorbensre, majd deszorbeáljuk és meghatározzuk a visszanyert anyagmennyiséget. Fontos ellenőrizni a deszorpció hatékonyságát a kísérletben használt, vagy ahhoz közeli mintakoncentrációkkal.

Három különböző gázáramlási sebességet kell használni, biztosítandó, hogy a vivőgáz telítődjön a minta gőzével. Ha a számított gőznyomás-értékek azt mutatják, hogy függetlenek az áramlási sebességtől, akkor a gázt telítettnek tételezzük fel.

A gőznyomás a következő egyenletből számítható ki:

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

ahol:

p = gőznyomás (Pa)

W = elpárolgott minta tömege (g)

V = a telített gáz térfogata (m^3)

R = egyetemes gázállandó, 8,314 (J mol^{-1} K^{-1})

T = hőmérséklet (K)

M = a vizsgált anyag moláris tömege (g mol^{-1})

A mért térfogatot korrigálni kell az áramlásmérő és a telítő közötti nyomás- és hőmérsékletkülönbségekkel.

▼M1

1.5.8. **Rotoros eljárás**

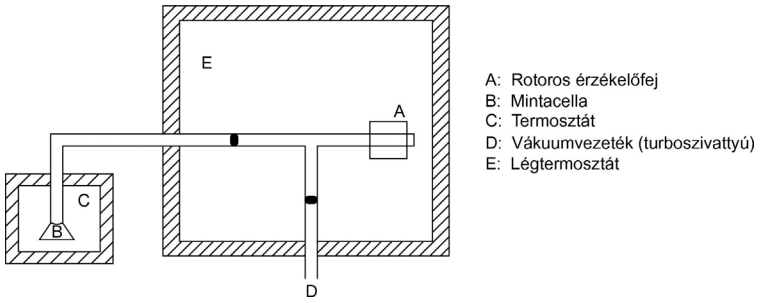
1.5.8.1. *Elv*

Ez az eljárás rotoros viszkozitásmérőt használ, amelyben a mérőelem egy mágneses térben lebegő, kis acélgolyó, amelyet forgó mágneses mező forgat (26)(27)(28). A forgási sebességét felvevőtekercsek mérik. Amikor a golyó elért egy adott fordulatszámot (rendszerint kb. 400 fordulat/sec), kikapcsoljuk a forgatómágneseket és a gázban fellépő súrlódás következtében a golyó lassulni kezd. A forgási sebesség csökkenését az idő függvényében mérjük. A gőznyomást az acélgolyó nyomásfüggő lassulásából számíthatjuk. Az ajánlott tartomány 10^{-4}–0,5 Pa.

1.5.8.2. *Készülék*

A kísérleti készülék sematikus ábrája a 11. ábrán látható. A mérőfej egy 0,1 °C pontossággal szabályozott állandó hőmérsékletű szekrényben van. A mintatartó egy külön szekrényben van, és ennek is 0,1 °C-on belül szabályozzuk a hőmérsékletét. A készülék minden más részén a hőmérsékletnek ennél nagyobbnak kell lennie, hogy elkerüljük a kondenzációt. Az egész készülék egy nagy vákuumot biztosító rendszerrel van összekapcsolva.

11. ábra



2. **ADATOK ÉS DOKUMENTÁCIÓ**

2.1. ADATOK

A fenti ELJÁRÁSOK bármelyikével kapott gőznyomást legalább két hőmérsékleten kell meghatározni. Három, vagy ennél több pont ajánlott 0–50 °C tartományban, hogy ellenőrizzük a gőznyomás-görbe linearitását. Az effúziós módszer (Knudsen-cella és izoterm termogravimetria) és a gáztelítéses módszer esetén a 0–50 °C mérési hőmérséklettartomány helyett 120–150 °C tartomány ajánlott.

2.2. MÉRÉSI JEGYZŐKÖNYV

A mérési jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a következő információkat:

— alkalmazott módszer,

▼**M1**

— a minta pontos leírása (megnevezés és szennyezők), és adott esetben az előzetes tisztítási műveletek,

— legalább két gőznyomás- és hőmérsékletérték (de három vagy több ajánlott) a 0–50 °C (vagy 120–150 °C) tartományban,

— legalább egy mérésnek 25 °C-on vagy az alatt kell történnie, ha a választott módszerrel ez technikailag lehetséges,

— minden eredeti adat,

— a (log p)–(1/T) görbe,

— a gőznyomás becslése 20 vagy 25 °C-ra.

Ha átalakulás lép fel (halmazállapot-változás, bomlás), a következő információkat fel kell tüntetni jegyzőkönyvben:

— a változás jellege,

— az a hőmérséklet, ahol a változás bekövetkezett légköri nyomáson,

— gőznyomás 10 és 20c°C-kal az átalakulási hőmérséklet alatt és 10 és 20 °C-kal e hőmérséklet felett (kivéve, ha az átalakulás szilárd állapotból gáz állapotba történik).

Minden, az eredmények értelmezése szempontjából fontos információt és észrevételt fel kell tüntetni a jegyzőkönyvben, különösen a minta szennyeződéseire és az anyag fizikai állapotára vonatkozókat.

3. **IRODALOM**

(1) Official Journal of the European Communities 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

Függelék

Becslési eljárás

BEVEZETÉS

A gőznyomásra becsült értéket használhatunk a következő esetekben:

— annak eldöntésére, hogy melyik kísérleti módszer a megfelelő,

— becsült érték vagy határérték megadására, amikor a kísérleti módszer technikai okok miatt nem kivitelezhető.

BECSLÉSI MÓDSZER

Folyadékok és szilárd anyagok gőznyomása megbecsülhető a módosított Watson-korrelációval (a). Az egyetlen szükséges kísérleti adat a normál forráspont. Az eljárás a 10^{-5} Pa–10^{5} Pa tartományban alkalmazható.

Részletes információk találhatók a „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” című kézikönyvben (b). Lásd még: OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

SZÁMÍTÁSI ELJÁRÁS

A gőznyomás a következők szerint számolható:

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

ahol:

T = a kérdéses hőmérséklet

T_b = a normál forráspont

P_{vp} = gőznyomás a T hőmérsékleten

ΔH_{vb} = párolgási entalpia

ΔZ_b = kompresszibilitási tényező (becsült: 0,97)

m = tapasztalati tényező, a vizsgált hőmérsékleten fennálló fizikai állapottól függ

Továbbá,

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

ahol K_F egy tapasztalati tényező az anyag polaritásának figyelembevétele céljából. Néhány vegyülettípus K_F tényezője megtalálható az irodalomban (b).

▼**M1**

Elég gyakran olyan adatok állnak rendelkezésre, ahol a forráspont kisebb nyomásra van megadva. Ebben az esetben a gőznyomást a következők szerint számítjuk:

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

ahol T_1 a kisebb P_1 nyomáson mért forráspont.

DOKUMENTÁCIÓ

A becslési módszer használata esetén a jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a számítás átfogó dokumentációját.

IRODALOM

(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. FELÜLETI FESZÜLTSÉG

1. MÓDSZER

Az itt leírt módszerek az OECD vizsgálati irányelvén alapulnak. Az alapelveket a (2) szakirodalom ismerteti.

1.1. BEVEZETÉS

A leírt módszerek vizes oldatok felületi feszültségének méréséhez alkalmazhatók.

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag vízben való oldhatóságáról, szerkezetéről, hidralizáló tulajdonságairól és a micellák képződése szempontjából kritikus koncentrációjáról.

A következő módszerek a legtöbb vegyi anyaghoz alkalmazhatók, tisztasági fokuktól függetlenül mindenfajta korlátozás nélkül.

A gyűrűs felületifeszültség-mérő módszerrel végrehajtott felületifeszültség-mérés körülbelül 200 mPa s-nél kisebb, dinamikus viszkozitású vizes oldatokra korlátozódik.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az egységnyi területre vonatkoztatott szabad felületi entalpiát felületi feszültségnek nevezzük.

A felületi feszültséget a következőképpen adják meg:

N/m (SI-mértékegység); vagy

mN/m (SI-almértékegység);

1 N/m = 10^3 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm az elavult CGS-rendszerben.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

Az 1. és 3. szakirodalom a felületi feszültségek széles tartományát felölelő referenciaanyagokat ismertet.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A módszerek annak a maximális erőnek a mérésén alapulnak, amelyet függőlegesen kell kifejteni egy mérőcsészébe elhelyezett vizsgálandó folyadék felületével érintkező mérőkengyelre vagy gyűrűre, annak e felülettől történő elválasztása érdekében, vagy egy lemezre, amelynek egyik széle érintkezik a felülettel, a kialakult film kiemelése érdekében.

Azokat az anyagokat, amelyek legalább 1 mg/l koncentrációban oldhatók vízben, vizes oldatban vizsgálják egyetlen koncentráció mellett.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

E módszerek nagyobb pontosságra képesek, mint amelyre a környezeti értékeléshez valószínűleg szükség van.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát desztillált vízben. Az oldat koncentrációjának az anyag telített vizes oldatához tartozó koncentrációérték 90 %-ának kell lennie; ha ez a koncentráció meghaladja az 1 g/l értéket, 1 g/l koncentrációt használnak a vizsgálathoz. Nem kell megvizsgálni azokat az anyagokat, amelyek oldhatósága a vízben 1 mg/l-nél kisebb.

1.6.1. **Lemezes módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Kengyeles módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Gyűrűs módszer**

Lásd az ISO 304 és NF T 73-060 szabványokat (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **Az OECD által harmonizált gyűrűs módszer**

1.6.4.1. *Készülék*

E méréshez megfelelőek a kereskedelemben kapható felületifeszültség-mérők. Ezek a következő részekből állnak:

— mobil mintaasztal,

— erőmérő rendszer,

— mérőtest (gyűrű),

— mérőtartály.

1.6.4.1.1. Mobil mintaasztal

A mobil mintaasztalt a vizsgálandó folyadékot tartalmazó, szabályozott hőmérsékletű mérőtartály tartójaként használják. Az erőmérő rendszerrel együtt egy talpazatra kell felszerelni.

1.6.4.1.2. Erőmérő rendszer

Az erőmérő rendszer (lásd az ábrát) a mintaasztal fölött helyezkedik el. Az erőmérés hibájának nem szabad ± 10^{-6} N-nál nagyobbnak lennie, a tömegmérés ± 0,1 mg hibahatárának megfelelően. A kereskedelemben kapható felületifeszültség-mérő mérőskálája legtöbbször mN/m-ben lett kalibrálva azért, hogy a felületi feszültség közvetlenül mN/m-ben legyen leolvasható, 0,1 mN/m pontossággal.

▼B

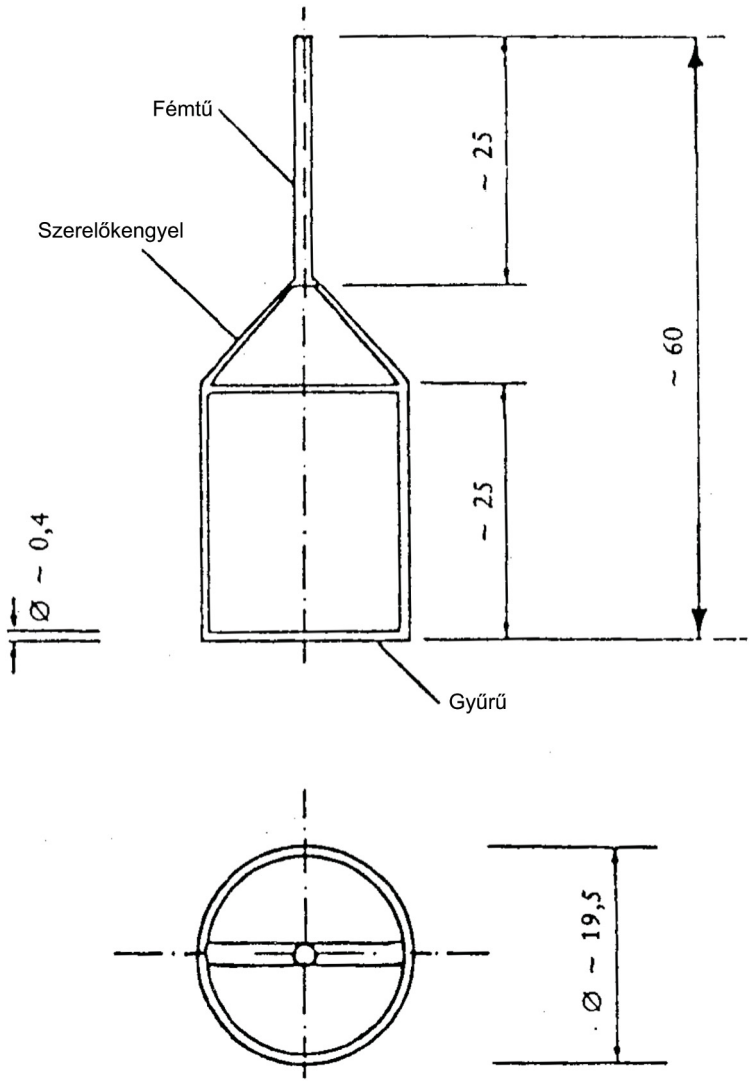
1.6.4.1.3. Mérőtest (gyűrű)

A gyűrű rendszerint körülbelül 0,4 mm vastagságú és 60 mm átlagos átmérőjű, platinairídium huzalból készül. A huzalgyűrűt vízszintesen függesztik le egy fémtűről és egy huzalszerelő kengyelről az erőmérő rendszerhez történő csatlakozás létrehozása érdekében (lásd az ábrát).

Ábra

Mérőtest

(Minden méret mm-ben van megadva)



1.6.4.1.4. Mérőtartály

A vizsgált oldatot tartalmazó mérőtartálynak szabályozott hőmérsékletű üvegtartálynak kell lennie. Úgy kell tervezni, hogy a mérés során a vizsgálandó oldat folyadékfázisának és a felszín feletti gázfázisnak a hőmérséklete állandó maradjon, és a minta ne párologhasson el. 45 mm-nél nem kisebb belső átmérőjű hengeres üvegtartályok elfogadhatók.

▼B

1.6.4.2. *A készülék előkészítése*

1.6.4.2.1. Tisztítás

Az üvegtartályokat gondosan meg kell tisztítani. Amennyiben szükséges, azokat forró króm-kénsavval és ezt követően tömény (83–98 tömegszázalékos H_3PO_4) foszforsavval kell mosni, alaposan le kell öblíteni csapvízben, és végül kétszer desztillált vízben kell mosni mindaddig, amíg semleges nem lesz, majd meg kell szárítani, és ki kell öblíteni a vizsgált folyadék egy részével.

A gyűrűt először minden vízben oldható anyag eltávolítása érdekében alaposan le kell öblíteni vízben, rövid időre be kell meríteni króm-kénsavba, le kell mosni kétszer desztillált vízzel, amíg semleges nem lesz, és végül rövid ideig melegíteni kell metanol láng fölött.

Megjegyzés:

Az olyan anyagokkal történő szennyezést, amelyek a króm-kénsavban vagy a foszforsavban nem oldódnak fel vagy nem bomlanak el – ilyenek például a szilikonok – alkalmas szerves oldószer segítségével kell eltávolítani.

1.6.4.2.2. A készülék kalibrálása

A készülék hitelesítése a nullapont ellenőrzéséből és ennek beállításából áll úgy, hogy a műszer jelzése mindig megbízható legyen mN/m-ben.

Összeszerelés:

A készüléket vízszintbe kell állítani, például a felületifeszültség-mérő alaptestére elhelyezett vízszintező segítségével, az alaplapon elhelyezett vízszintező csavarok állításával.

A nullapont beállítása:

A gyűrűnek a készülékre történő felszerelése után és a folyadékba bemerítés előtt a felületifeszültség-mérő által jelzett értéket nullára kell állítani, és ellenőrizni kell, hogy a gyűrű párhuzamos-e a folyadékfelülettel. Ehhez a folyadékfelszín tükörként használható.

Kalibráció:

A tényleges vizsgálati kalibrálás a következő két eljárás valamelyikének a segítségével hajtható végre:

a) Egy tömeg segítségével: ehhez az eljáráshoz 0,1 és 1,0 gramm közötti, ismert tömegű súlyokat helyeznek a gyűrűre. Ezt a Φ_a kalibrálási tényezőt, amellyel minden, a műszer által megadott értéket meg kell szorozni, a következő egyenletnek (1) megfelelően kell meghatározni:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a}$$

ahol:

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

m = a súly tömege (g)

g = gravitációs gyorsulás (981 cm s^{-2} tengerszinten)

b = a gyűrű átlagos kerülete (cm)

σ_a = a felületifeszültség-mérő által mutatott érték a gyűrűn a súly elhelyezése után (mN/m).

▼B

b) Víz segítségével: az eljárásnál tiszta vizet használnak, amelynek a felületi feszültsége, például 23 °C hőmérsékleten 72,3 mN/m. Az eljárás gyorsabb a súllyal történő kalibrációnál, de mindig fennáll az a veszély, hogy a víz felületi feszültségét meghamisítják a felületaktív anyagokkal történő szennyeződési nyomok.

A Φ_b kalibrálási tényezőt, amellyel a műszer által mutatott minden értéket meg kell szorozni, a következő egyenletnek (2) megfelelően kell meghatározni:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

ahol:

σ_o = a szakirodalomban a víz felületi feszültségére megadott érték (mN/m)

σ_g = a víz felületi feszültségének mért értéke (mN/m), mindkettő ugyanazon a hőmérsékleten.

1.6.4.3. *Minták előkészítése*

A vizsgált anyagokból vizes oldatot kell készíteni a szükséges koncentrációk használatával, és ezeknek nem szabad tartalmazniuk nem oldott anyagot.

Az oldatot állandó hőmérsékleten (± 0,5 °C) kell tartani. Mivel a mérőtartályban lévő oldat felületi feszültsége változik idővel, több mérést kell végrehajtani különböző időpontokban, és fel kell rajzolni egy görbét, amely a felületi feszültséget mutatja az idő függvényében. Amennyiben további változás nem jön létre, beáll az egyensúlyi állapot.

A mérést zavarják más anyagok por és gáznemű szennyeződései. Ezért a munkát védőburkolat alatt kell végrehajtani.

1.6.5. **Vizsgálati körülmények**

A mérést körülbelül 20 °C hőmérsékleten kell végrehajtani, és a hőmérsékletet ± 0,5 °C-on belül kell szabályozni.

1.6.6. **A vizsgálat végrehajtása**

A mérendő oldatokat be kell vinni a gondosan megtisztított mérőtartályba, ügyelve a habosodás elkerülésére, és ezután a mérőtartályt rá kell helyezni a vizsgálókészülék asztalára. Az asztallapot a mérőtartállyal együtt meg kell emelni, amíg a gyűrű bele nem merül az oldatba. Ezután az asztallapot fokozatosan és egyenletesen süllyeszteni kell (körülbelül 0,5 cm/perc sebességgel) a gyűrűnek a felülettől történő elválasztása érdekében, egészen a maximális erő eléréséig. A gyűrűhöz tapadt folyadékrétegnek nem szabad leválnia a gyűrűről. A mérések elvégzése után a gyűrűt újra az oldatba kell meríteni, és a mérést meg kell ismételni, amíg a kapott felületi feszültség értéke állandó nem lesz. Az oldatnak a mérőtartályba helyezéséig eltelt időt fel kell jegyezni minden egyes meghatározáshoz. Az értékek leolvasását annál a maximális erőnél kell végrehajtani, amely ahhoz szükséges, hogy elválassza a gyűrűt a folyadékfelülettől.

▼B

2. **ADATOK**

A felületi feszültség kiszámításához a készüléken mN/m-ben leolvasott értéket először meg kell szorozni (az alkalmazott kalibrálási eljárástól függően) Φ_a vagy Φ_b kalibrálási tényezővel. Az így kapott érték csak közelítőleg érvényes, és ezért helyesbíteni kell.

Harkins és Jordan (4) kísérletileg helyesbítési tényezőket határoztak meg a gyűrű méreteitől, a folyadék sűrűségétől és ennek felületi feszültségétől függő gyűrűs módszer által mért felületifeszültség-értékekhez.

Mivel munkaigényes feladat a Harkins- és Jordan-táblázatokból minden egyes méréshez a helyesbítési tényező meghatározása, vizes oldatok felületi feszültségének kiszámításához használható az egyszerűsített eljárás, nevezetesen a helyesbített felületifeszültség-értékek közvetlen kiolvasása a táblázatból (interpolálni kell a táblázatban közölt értékek közé eső értékekhez).

Táblázat:

A mért felületi feszültség helyesbítése

Csak vizes oldatokhoz, $\rho = 1\ g/cm^3$

r	= 9,55 mm (gyűrű átlagos sugara)
r	= 0,185 mm (gyűrű huzalának sugara)

Kisérleti érték (mN/m)	Helyesbített érték (mN/m)	
	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont a) alpontja alatt)	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont b) alpontja alatt)
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

Kisérleti érték (mN/m)	Helyesbített érték (mN/m)	
	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont a) alpontja alatt)	Kalibráció vízre (lásd az 1.6.4.2.2. pont b) alpontja alatt)
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	—

Ezt a táblázatot a Harkins–Jordan-helyesbítés alapján állították össze. Hasonlít a DIN-szabványban (DIN 53914) lévő, vízre és vizes oldatokra (sűrűség, $\rho = 1\ g/cm^3$) vonatkozó táblázathoz, és az R = 9,55 mm (gyűrű átlagos sugara) és r = 0,185 mm (gyűrű huzalának sugara) méretekkel rendelkező, kereskedelmi forgalomban kapható gyűrűre érvényes. A táblázat tömeggel vagy vízzel végrehajtott kalibrálás után mért felületi feszültség értékek helyesbített értékeit adja meg.

Más lehetőségként, az előző kalibrálás nélkül, a felületi feszültség a következő képletnek megfelelően számítható ki:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

ahol:

F = a film elszakadásakor a dinamométeren mért erő

R = a gyűrű sugara

f = a helyesbítési tényező (1)

3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az alkalmazott módszert,

— a vizsgálathoz használt víz vagy oldat típusát,

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a mérési eredményeket: felületi feszültség (leolvasott érték), megadva mind az egyes leolvasott értékeket, mind az adott számbeli középértéket, valamint a helyesbített középértéket (a berendezés tényezőjének és a helyesbítési táblázat figyelembevételével),

▼B

— az oldat koncentrációját,

— a vizsgálati hőmérsékletet,

— a felhasznált oldat életkorát; különösen az oldat elkészítése és mérése közötti időt,

— az oldatnak a mérőtartályba helyezése után a felületi feszültség időfüggésének leírását,

— az eredmények értelmezéséhez szükséges minden információt és megjegyzést közölni kell, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Figyelembe véve, hogy a desztillált víz felületi feszültsége 72,75 mN/m 20 °C hőmérsékleten, azokat az anyagokat, amelyek 60 mN/m-nél kisebb felületi feszültséget mutatnak e módszer feltételei mellett, felületaktív anyagoknak kell tekinteni.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 115. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

(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. OLDHATÓSÁG VÍZBEN

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 105. vizsgálati iránymutatásában (1995) leírt módszerrel. A vizsgálati módszer az eredeti, 1981-ben elfogadott 105. vizsgálati iránymutatás átdolgozott változata. A jelenlegi és az 1981. évi változat között tartalmi különbség nincs. A módosítások elsősorban formai jellegűek. Az átdolgozás alapjául az „Oldhatóság vízben” elnevezésű európai uniós vizsgálati módszer szolgált ([1]).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

2. Egy anyag vízoldékonyságát jelentősen befolyásolhatja a szennyeződések jelenléte. Ez a vizsgálati módszer a lényegében tiszta, vízben stabil, nem illékony anyagok vízoldékonyságának megállapítására szolgál. A vízoldékonyság megállapítása előtt érdemes előzetes információkat szerezni a vizsgált anyagról, például annak szerkezeti képletéről, gőznyomásáról, disszociációs állandójáról és a pH függvényében kifejezett hidrolíziséről.

3. Ez a vizsgálati módszer két, a 10^{-2} g/l alatti, illetve feletti oldhatóságra kiterjedő módszer – az oszlopelúciós és a lombikmódszer – leírását foglalja magában. Tartalmazza emellett egy egyszerű előzetes vizsgálat leírását is. Ez utóbbi lehetővé teszi a végleges vizsgálathoz használandó minta megfelelő mennyiségének hozzávetőleges meghatározását, valamint a telítettség eléréséhez szükséges idő megállapítását.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

4. Valamely anyag vízoldékonysága az anyag adott hőmérsékleten vízben fennálló telítettségi tömegkoncentrációját jelenti.

5. A vízoldékonyságot oldott anyag tömege/oldattérfogat egységekben fejezik ki. Az SI-mértékegység a kg/m^3, azonban a g/l is használható.

REFERENCIAANYAGOK

6. Az anyagok vizsgálata során nem szükséges referenciaanyagokat alkalmazni.

A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Vizsgálati körülmények

7. A vizsgálatot lehetőleg 20 ± 0,5 ° C hőmérsékleten kell végrehajtani. A kiválasztott hőmérsékletet állandó értéken kell tartani a berendezés minden lényeges részében.

Előzetes vizsgálat

8. Körülbelül 0,1 g, csiszolt üvegdugójú, 10 ml-es mérőhengerben lévő mintához (ha a vizsgált anyag szilárd, porítani kell) adjunk hozzá fokozatosan egyre nagyobb térfogatú, szobahőmérsékletű vizet. Minden egyes vízmennyiség hozzáadása után a keveréket 10 percig rázzuk, és szemrevételezéssel ellenőrizzük, hogy vannak-e a mintának fel nem oldott részei. Amennyiben 10 ml víz hozzáadása után a minta vagy annak egyes részei nem oldódtak fel, a kísérletet 100 ml-es mérőhengerben kell folytatni. A

▼M4

lenti 1. táblázatban látható az oldhatóság közelítőleges értéke azon vízmennyiség alatt, amelyben a minta teljesen feloldódik. Alacsony oldhatóság esetében a vizsgált anyag feloldása hosszú időt vehet igénybe, és ez esetben legalább 24 órát kell várni. Ha a vizsgált anyag 24 óra elteltével sem oldódott fel, hosszabb ideig (akár 96 óráig) kell várni, vagy további hígítással próbálkozva meg kell állapítani, hogy az oszlopelúciós vagy a lombik-módszer alkalmazandó-e.

1. táblázat

ml víz 0,1 g oldott anyaghoz	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
közelítőleges oldhatóság (g/l)	> 1 000	1 000–2-00	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Oszlopelúciós módszer

Elv

9. Ez a módszer a vizsgált anyag vízzel, mikrooszlopból végrehajtott elúcióján alapul; az oszlop a vizsgált anyag feleslegével előzetesen bevont inert hordozóanyaggal van megtöltve (2). A vízoldékonyságot az eluátum tömegkoncentrációja határozza meg, amikor az koncentrációplatót ér el az idő függvényében.

Készülék

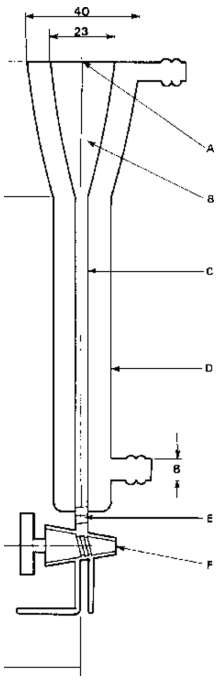
10. A készülék egy állandó hőmérsékleten tartott mikrooszlopból áll (1. ábra). A mikrooszlop vagy egy újrakeringtető szivattyúhoz (2. ábra), vagy egy kiegyenlítő tartályhoz (3. ábra) csatlakozik. A mikrooszlop inert hordozóanyagot tartalmaz, amelyet egy, a részecskék kiszűrésére is szolgáló, kisméretű üveggyapotdugó rögzít. Hordozóanyagként üveggyöngy, kovaföld vagy egyéb inert anyagok alkalmazhatók.

11. Az 1. ábrán egy, az újrakeringtető szivattyúhoz való csatlakoztatásra alkalmas mikrooszlop látható. A mikrooszlop öt (a kísérlet elején kiöntött) tartálytérfogat és öt (a kísérlet során elemzési célból eltávolított) minta tárolására alkalmas töltőtérrel rendelkezik. Más megoldásként kisebb méret is alkalmazható, ha a kísérlet során víz tölthető a rendszerbe a szennyeződésekkel eltávolított öt kezdeti tartálytérfogat pótlására. Az oszlop inert anyagból készült csövön keresztül csatlakozik a körülbelül 25 ml/h áramlási sebesség elérésére képes újrakeringtető szivattyúhoz. Az újrakeringtető szivattyú például perisztaltikus szivattyú vagy membránszivattyú lehet. Gondoskodni kell arról, hogy a cső anyaga ne okozzon semmilyen szennyeződést és/vagy adszorpciót.

12. A 3. ábrán egy kiegyenlítő tartályt alkalmazó megoldás vázlatos elrendezése látható. Ebben az elrendezésben a mikrooszlop egyirányú üvegcsappal van ellátva. A kiegyenlítő tartállyal való összeköttetést egy csiszolt üvegből készült csatlakozó és inert anyagból készült csővezeték biztosítja. A kiegyenlítő tartályból való áramlás sebessége körülbelül 25 ml/óra kell, hogy legyen.

▼**M4**

1. ábra



A méretek mm-ben értendők.

A. Csiszolt üveg csatlakozó csatlakoztatási helye

B. Felső tér

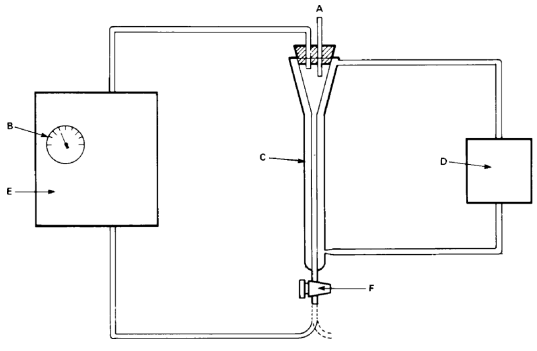
C. Belső rész (5)

D. Külső rész (19)

E. Üveggyapot dugó

F. Üvegcsap

2. ábra



A. Atmoszférikus egyensúlyba hozatal

B. Áramlásmérő

C. Mikrooszlop

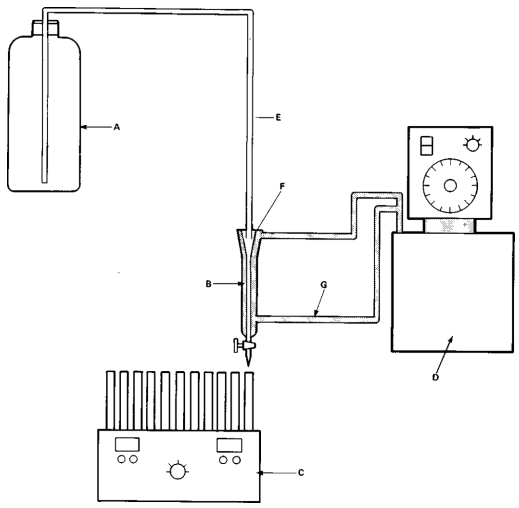
D. Szabályozott hőmérsékletű keringtető szivattyú

E. Újrakeringtető szivattyú

F. Kétállású szelep mintavételhez

▼M4

3. ábra



A. Kiegyenlítő tartály (például 2,5 literes lombik)

B. Oszlop

C. Frakciógyűjtő

D. Termosztát

E. Tefloncső

F. Csiszolt üveg csatlakozó

G. Vízvezeték (a termosztát és az oszlop között, belső átmérője körülbelül 8 mm)

13. Töltsünk körülbelül 600 mg hordozóanyagot egy 50 ml-es gömblombikba. Oldjunk fel kellő mennyiségű vizsgált anyagot analitikai tisztaságú illékony oldószerben, és ebből az oldatból megfelelő mennyiséget adjunk hozzá a hordozóanyaghoz. Az oldószert teljesen párologtassuk el, például forgó párologtatóval, mivel egyébként az elúciós lépés során a felületen jelentkező megoszlás miatt nem érhető el a hordozóanyag vízzel történő telítése. A megtöltött hordozóanyagot két órán át áztassuk körülbelül 5 ml vízben, és ezután a szuszpenziót töltsük a mikrooszlopba. Más megoldásként száraz megtöltött hordozóanyag önthető a vízzel teli mikrooszlopba, és körülbelül két óra alatt hozható egyensúlyba.

14. A hordozóanyag megtöltése problémákat, és következésképpen hibás eredményeket okozhat, például ha a vizsgált anyag olajos fázisként leülepszik. Ezeket a problémákat ki kell vizsgálni, és a részleteket jegyzőkönyvbe kell venni.

Eljárás újrakeringtető szivattyú használata esetén

15. Indítsuk el az áramlást az oszlopon keresztül. Az ajánlott áramlási sebesség körülbelül 25 ml/óra, ami az itt leírt oszlop esetében 10 tartálytérfogat/óra sebességnek felel meg. Legalább az első öt tartálytérfogatot öntsük ki, hogy eltávolítsuk a vízben oldható szennyeződéseket. Ezt követően a szivattyút az egyensúlyi állapot létrejöttéig hagyjuk működni öt olyan, egymást követő, véletlenszerűen választott minta felhasználásával, amelyek koncentrációja nem tér el egymástól ± 30 %-nál nagyobb mértékben. E minták levétele között legalább tíz tartálytérfogat áthaladásának megfelelő időnek kell eltelnie. Az alkalmazott analitikai módszertől függően ajánlatos lehet az egyensúlyi állapot létrejöttét koncentráció/idő görbével ábrázolni.

▼M4

Eljárás kiegyenlítő tartály használata esetén

16. Az egymást követő eluátumfrakciókat össze kell gyűjteni, és elemezni kell a kiválasztott módszerrel. Az oldhatóság meghatározására abból a középső eluátumtartományból származó frakciókat használjuk, ahol a koncentrációk legalább öt egymást követő frakcióban ± 30 %-on belül állandóak.

17. Az ajánlott eluáló anyag a kétszer desztillált víz. 10 megohm/cm feletti ellenállású és 0,01 % alatti összes szerves széntartalmú deionizált víz is használható.

18. Mindkét eljárás esetében egy második méréssorozatot is végre kell hajtani az első méréssorozat áramlási sebességének felét alkalmazva. Amennyiben a két méréssorozat eredményei megegyeznek egymással, a vizsgálat kielégítő. Ha a kisebb áramlási sebesség mellett nagyobb a mért oldhatóság, az áramlási sebesség felezését folytatni kell, amíg két egymást követő méréssorozat azonos oldhatóságot nem ad.

19. Mindkét eljárás során a Tyndall-jelenség előfordulásának vizsgálatával ellenőrizni kell, hogy a frakciókban nincs-e jelen kolloidanyag. Részecskék jelenléte esetén a vizsgálat érvénytelennek tekintendő, és az oszlop szűrési hatásának javítását követően megismétlendő.

20. Meg kell mérni minden egyes minta pH-ját, lehetőleg különleges indikátorpapírral.

Lombikmódszer

Elv

21. A vizsgált anyagot (a szilárd anyagokat porítani kell) oldjuk fel a vizsgálati hőmérsékletnél némileg magasabb hőmérsékletű vízben. A telítés elérésekor hűtsük le a keveréket, és tartsuk a vizsgálati hőmérsékleten. Más megoldásként – ha megfelelő mintavételezéssel meggyőződtünk a telítettségi egyensúly létrejöttéről – a mérés közvetlenül a vizsgálati hőmérsékleten is végrehajtható. Ezt követően alkalmas analitikai módszerrel határozzuk meg a vizsgált anyag tömegkoncentrációját a vizes oldatban, amely nem tartalmazhat fel nem oldott részecskét (3).

Készülék

22. A következő felszerelések szükségesek:

— szokásos laboratóriumi üvegeszközök és műszerek,

— oldatok szabályozott, állandó hőmérséklet melletti keverésére alkalmas készülék,

— centrifuga (lehetőleg szabályozott hőmérsékletű), ha emulziókhoz szükséges, és

— analitikai felszerelés.

Eljárás

23. Az előzetes vizsgálat alapján becsléssel határozzuk meg a vizsgált anyag kívánt vízmennyiség telítéséhez szükséges mennyiségét. E mennyiségnek körülbelül ötszörösét mérjük be a három, becsiszolt üvegdugóval felszerelt üvegedénybe (például centrifuga-kémcsőbe, lombikba). Az analitikai módszer és az oldhatósági tartomány függvényében kiválasztott vízmennyiséget töltsük be az egyes edényekbe. Az edényeket szorosan dugózzuk le, majd 30 ° C hőmérsékleten rázzuk össze. Állandó hőmérsékleten való működésre képes rázó- vagy keverőkészüléket, például szabályozott hőmérsékletű vízfürdőben elhelyezett mágneses keverőberendezést kell használni. Egy nap eltelte után az egyik edényt vizsgálati hőmérsékleten 24 óráig hagyjuk egyensúlyi állapotba állni, és időnkénti rázzuk fel. Az edény tartalmát ezután vizsgálati hőmérsékleten centrifugáljuk, és alkalmas analitikai módszerrel határozzuk meg a vizsgált anyag koncentrációját a tiszta,

▼M4

átlátszó vizes fázisban. A másik két lombikot hasonlóan kezeljük a kezdeti, 30 °C hőmérsékleten két, illetve három napon át végrehajtott egyensúlyba hozatal után. Amennyiben legalább az utolsó két edény vizsgálata során mért koncentrációk legfeljebb 15 %-kal térnek el egymástól, a vizsgálat kielégítő. Ha az 1., 2. és 3. edényből kapott eredmények növekvő tendenciájúak, a teljes vizsgálatot meg kell ismételni hosszabb egyensúlyba hozatali idő alkalmazásával.

24. A vizsgálat 30 °C-on végrehajtott előzetes inkubáció nélkül is végrehajtható. A telítési egyensúly beállítása sebességének becsléséhez vegyünk mintákat mindaddig, amíg a keverési idő már nincs hatással a mért koncentrációra.

25. Meg kell mérni minden egyes minta pH-ját, lehetőleg különleges indikátorpapírral.

Analitikai meghatározások

26. Előnyben részesítendő az anyagspecifikus módszer, mivel a kis mennyiségekben jelen lévő oldható szennyeződések jelentős hibákat okozhatnak a mért oldhatóságban. Ilyen módszer például a gáz- vagy folyadékkromatográfia, a titrálás, a fotometria, a voltametria.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

Oszlopelúciós módszer

27. Minden egyes méréssorozatból ki kell számítani a telítési plató legalább öt egymást követő mintájának középértékét, valamint a szórást. A különböző áramlási sebességgel végrehajtott két vizsgálatban kapott középértékek legfeljebb 30 %-kal térhetnek el egymástól.

Lombikmódszer

28. A három lombiknál kapott egyes eredményeket, amelyek legfeljebb 15 %-kal térhetnek el egymástól, átlagoljuk.

Vizsgálati jegyzőkönyv

Oszlopelúciós módszer

29. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

— az előzetes vizsgálat eredményei,

— kémiai azonosság és szennyeződések (adott esetben az előzetes tisztítási művelet),

— minden egyes minta koncentrációja, áramlási sebessége és pH-ja,

— minden egyes méréssorozat telítettségi platója legalább öt mintájának középértékei és szórása,

— legalább két egymást követő méréssorozat átlaga,

— a víz hőmérséklete a telítési folyamat során,

— az elemzési módszer,

— a hordozóanyag jellege

— a hordozóanyag betöltése,

— a felhasznált oldószer,

— az anyag vizsgálat során észlelt bármilyen kémiai instabilitásának bizonyítéka,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információ, különösen a vizsgált anyag szennyeződéseivel és halmazállapotával kapcsolatban.

▼**M4**

Lombikmódszer

30. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

— az előzetes vizsgálat eredményei,

— kémiai azonosság és szennyeződések (adott esetben az előzetes tisztítási művelet),

— az egyes analitikai meghatározások és azok átlagai, ha egynél több értéket határoztunk meg az egyes lombikokhoz,

— minden minta pH-ja,

— az egymással egyező, különböző lombikokból kapott értékek átlaga,

— a vizsgálati hőmérséklet,

— az analitikai módszer,

— az anyag vizsgálat során észlelt bármilyen kémiai instabilitásának bizonyítéka,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden információ, különösen a vizsgált anyag szennyeződéseivel és halmazállapotával kapcsolatban.

SZAKIRODALOM

(1) A Bizottság 1992. július 31-i 92/69/EGK irányelve a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő tizenhetedik hozzáigazításáról, HL L 383., 1992.12.29., 113. o.

(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. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS

1. MÓDSZER

Az itt leírt „lombikrázásos” módszer az OECD vizsgálati irányelven (1) alapul.

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag szerkezeti képletéről, disszociációs állandójáról, vízben oldhatóságáról, hidrolíziséről, n-oktanol oldhatóságáról és felületi feszültségéről.

Ionizálható anyagokon a méréseket csak nem ionos formájukban (szabad sav vagy szabad bázis) szabad végrehajtani, amelyet legalább egy pH-egységgel a pK alatti (szabad sav) vagy feletti (szabad bázis) pH-jú, megfelelő puffer használatával hoznak létre.

Ez a vizsgálati módszer két különálló eljárást foglal magában: a lombikrázásos módszert és a nagynyomású folyadékkromatográfiát („high performance liquid chromatography”, HPLC). Az előbbi akkor alkalmazható, amikor a P-érték (a meghatározásokat lásd lejjebb) a –2 és + 4 közötti tartományba, és az utóbbi a 0 és 6 közötti tartományba esik. A kísérleti eljárások közül bármelyik végrehajtása előtt először a megoszlási hányados előzetesen becsült értékét kell megállapítani.

A lombikrázásos módszer csak vízben és n-oktanolban oldható, lényegében tiszta anyagokhoz alkalmazható. Nem alkalmazható felületaktív anyagok esetében (amelyekhez biztosítani kell az egyedi n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló becsült vagy számított értéket).

A HLPC-módszer nem alkalmazható erős savak és lúgok, komplex fémvegyületek, felületaktív anyagok és olyan anyagok esetében, amelyek az eluáló anyagokkal reakcióba lépnek. Ezen anyagok esetében egyedi n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló, becsült vagy számított értéket kell biztosítani.

A HPLC-módszer kevésbé érzékeny a vizsgálandó vegyületben lévő szennyeződések jelenlétére, mint a lombikrázásos módszer. Ennek ellenére bizonyos esetekben a szennyeződések megnehezíthetik az eredmények értelmezését, mivel bizonytalanná válik a csúcs kijelölése. Olyan keverékek esetében, amelyek határozatlan sávot eredményeznek, meg kell adni a log P felső és alsó határát.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A megoszlási hányados (P) két, egymással nem elegyedő oldószerből álló, kétfázisú rendszerben feloldott anyag egyensúlyi koncentrációinak (c_i) aránya. N-oktanol és víz esetében:

$$p_{ow} = \frac{c_{n-oktanol}}{c_{víz}}$$

A megoszlási hányados (P) két koncentráció hányadosa, és rendszerint 10-es alapú logaritmus (log P) alakjában adják meg.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A lombikrázásos módszer

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

A HPLC-módszer

Valamely vegyület mért HPLC-adata és annak P-értéke korrelációba állításához létre kell hozni a kromatográfiai adatok függvényében a log P kalibrációs görbéjét legalább 6 referenciapontot használva. A felhasználó feladata a megfelelő referenciaanyagok kiválasztása. Amikor csak lehetséges, legalább egy referenciavegyületnek a vizsgált anyag P_{ow}-je fölötti, és egy másiknak a vizsgált anyag P_{ow}-je alatti P_{ow}-vel kell rendelkeznie. Négynél kisebb log P-értékek esetében a kalibráció a lombikrázásos módszerrel kapott adatokon alapulhat. Négynél nagyobb log P-értékekhez a kalibráció szakirodalmi értékeken alapulhat, amennyiben ezek összhangban vannak a számított értékekkel. Nagyobb pontosság elérésére előnyben kell részesíteni az olyan referenciavegyületeket, amelyek szerkezetileg kapcsolatban vannak a vizsgált anyaggal.

Sok vegyi anyagcsoport esetében a log P_{ow}-értékek terjedelmes jegyzékei állnak rendelkezésre (2) (3). Amennyiben a szerkezetileg egymással összefüggésben lévő vegyületek megoszlási hányadosairól nem állnak rendelkezésre adatok, más referenciavegyületekkel végrehajtott általánosabb kalibrálás használható.

A javasolt referenciaanyagok és azok P_{ow}-értékeinek jegyzékét a 2. függelék tartalmazza.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

1.4.1. **A lombikrázásos módszer**

A megoszlási hányados meghatározásához egyensúlyt kell teremteni a rendszer valamennyi, egymással kölcsönhatásban lévő komponense között, és meg kell határozni a két fázisban feloldott anyagok koncentrációit. Az ezzel a témakörrel foglalkozó szakirodalom vizsgálata azt jelzi, hogy többféle különböző módszer használható ennek a problémának a megoldására, azaz a két fázis alapos keverésére, amelyet a szétválasztásuk követ a vizsgált anyag egyensúlyi koncentrációjának meghatározására.

1.4.2. **A HPLC-módszer**

A HPLC-t olyan, a kereskedelemben kapható szilárd fázissal megtöltött analitikai oszlopokon hajtják végre, amely kémiailag kovasavhoz kötött hosszú szénhidrogénláncokat (például C_8, C_{18}) tartalmaz. Az oszlopba befecskendezett vegyi anyagok különböző sebességekkel mozognak az oszlop mentén a mozgó fázis és az álló szénhidrogénfázis közötti, különböző mértékű megoszlásuk miatt. A vegyi anyagok keverékei a víztaszító képességük sorrendjében eluálódnak, úgy, hogy először a vízben oldható vegyi anyagok eluálódnak, és utoljára az olajban oldható vegyi anyagok, a szénhidrogén-víz megoszlási hányadosukkal arányosan. Ez lehetővé teszi az ilyen (fordított fázisú) oszlopon a retenciós idő és az n-oktanol/víz megoszlási hányados közötti összefüggés meghatározását. A megoszlási hányados a következő kifejezés által megadott „k”*kapacitási faktor* segítségével határozható meg.

▼B

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

amelyben t_r = a vizsgált anyag retenciós ideje, és t_0 = az az átlagos idő, amelyre egy oldószer-molekulának szüksége van ahhoz, hogy keresztülhaladjon az oszlopon (holtidő).

Kvantitatív analitikai módszerek nem szükségesek, és csak az elúciós időket kell meghatározni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.5.1. **Ismételhetőség**

A lombikrázásos módszer

A megoszlási hányados pontosságának biztosítása érdekében két meghatározást kell végrehajtani három különböző vizsgálati körülmény között, amelyek során változtatható az előírt anyagmennyiség, valamint az oldószertérfogatok aránya. A megoszlási hányados 10-es alapú logaritmusban kifejezett értékeinek ± 0,3 logegység-tartományon belül kell lennie.

A HPLC-módszer

A mérés megbízhatóságának növelésére két meghatározást kell végrehajtani. Az egyes mérésekből meghatározott log P értékeknek ± 0,1 logegység-tartományon belül kell lenniük.

1.5.2. **Érzékenység**

A lombikrázásos módszer

A módszer mérési tartományát az analitikai eljárás detektálási határa határozza meg. Ennek lehetővé kell tennie a –2 és + 4 (esetenként, amikor teljesülnek ennek a feltételei, ez a tartomány egészen 5-ös log P_{ow}-re is kibővíthető) közötti tartományban lévő log P_{ow} értékek kiértékelését, amennyiben az oldatban lévő anyag koncentrációja egyik fázisban sem több 0,01 mol/liternél.

A HPLC-módszer

A HPLC-módszer 0 és 6 közötti log P_{ow} tartományban teszi lehetővé a megoszlási hányadosok becslését.

Általában valamely vegyület megoszlási hányadosa a lombikrázásos értéktől számított ± 1 logegységen belül becsülhető meg. A jellegzetes korrelációk megtalálhatók a szakirodalomban (4) (5) (6) (7) (8). Nagyobb pontosság rendszerint akkor érhető el, amikor a korrelációs görbék egymással szerkezetileg kapcsolatban lévő referenciavegyületeken alapulnak (9).

▼B

1.5.3. **Alkalmazhatóság**

A lombikrázásos módszer

A Nernst-féle megoszlási törvény csak állandó hőmérsékleten, nyomáson és pH mellett érvényes híg oldatokra. Szigorúan két tiszta oldószer között diszpergálódott tiszta anyagra érvényes. Amennyiben egyidejűleg több különböző oldott anyag van jelen egy vagy több fázisban, ez hatással lesz az eredményekre.

Az oldott molekulák disszociációja vagy asszociációja eltéréseket eredményez a Nernst-féle megoszlási törvénytől. Az ilyen eltéréseket az a tény jelzi, hogy a megoszlási hányados függővé válik az oldat koncentrációjától.

Mivel többszörös egyensúlyról van szó, ezt a módszert nem szabad alkalmazni ionizálható vegyületekre helyesbítés alkalmazása nélkül. Ilyen vegyületek esetében meg kell fontolni pufferoldatok használatát víz helyett; a puffer pH-jának legalább 1 pH-egységgel el kell térnie az anyag pKa-értékétől, és figyelembe kell venni ennek a pH-nak az összefüggését a környezettel.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **A megoszlási hányados előzetes becslése**

A megoszlási hányados becslését lehetőleg számítási módszer (lásd az 1. függeléket) segítségével, vagy adott esetben a tiszta oldószerekben lévő vizsgált anyag oldhatóságainak arányából (10) kell végrehajtani.

1.6.2. **A lombikrázásos módszer**

1.6.2.1. *Előkészület*

n-oktanol: a megoszlási hányados meghatározását nagy tisztaságú, analitikai minőségű reagenssel kell végrehajtani.

Víz: üveg- vagy kvarckészülékben lévő desztillált vagy kétszer desztillált vizet kell használni. Ionizálható vegyületekhez víz helyett pufferoldatokat kell használni, amennyiben indokolt.

Megjegyzés:

Nem szabad közvetlenül valamilyen ioncserélőből vett vizet használni.

1.6.2.1.1. Az oldószerek előzetes telítése

Valamely megoszlási hányados meghatározása előtt kölcsönösen telítik az oldószerrendszer fázisait a kísérleti hőmérsékleten végrehajtott rázással. Ennek végrehajtásához célszerű 24 órán át egy mechanikus rázókészülékben nagy tisztaságú, analitikai minőségű n-oktanolt vagy vizet tartalmazó két olyan, nagy tárolópalackot rázni, amelyek közül mindkettő elegendő mennyiséget tartalmaz a másik oldószerből, és ezután ezeket addig kell alkalmazni, amíg a fázisok szétválnak, és bekövetkezik a telítettségi állapot.

▼B

1.6.2.1.2. Előkészület a vizsgálathoz

A kétfázisú rendszer teljes mennyiségének majdnem meg kell töltenie a vizsgálati tartályt. Ez segíteni fog az elillanás miatti anyagveszteség megakadályozásában. Az alkalmazandó térfogatarányt és anyagmennyiségeket a következők határozzák meg:

— a megoszlási hányados előzetes értékelése (lásd fent),

— az analitikai eljáráshoz szükséges vizsgált anyag minimális mennyisége, és

— a mindkét fázisban 0,01 mol/literes maximáliskoncentráció-korlátozás.

Három vizsgálatot kell végezni. Az elsőben az n-oktanol és víz számított térfogatarányát használják; a másodikban ezt az arányt kettővel elosztják; és a harmadikban ezt az arányt kettővel megszorozzák (például, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Vizsgált anyag

Törzsoldatot készítenek vízzel előre telített n-oktanolban. Ennek a törzsoldatnak a koncentrációját pontosan meg kell határozni, mielőtt a megoszlási hányados meghatározásához használnánk. Ezt az oldatot olyan körülmények között kell tárolni, amely biztosítja annak stabilitását.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálati hőmérsékletet állandó értéken (± 1 °C) kell tartani, és ennek a 20 és 25 °C közötti tartományban kell lennie.

1.6.2.3. *Mérési eljárás*

1.6.2.3.1. A megoszlási egyensúly létrehozása

Minden vizsgálati körülményhez elő kell készíteni a pontosan megmért két oldószermennyiséget, valamint a szükséges törzsoldatmennyiséget tartalmazó vizsgálati tartályt.

Az n-oktanol-fázisokat térfogat alapján kell mérni. A vizsgálati tartályokat vagy alkalmas rázókészülékbe kell helyezni, vagy kézzel kell keverni. Centrifugakémcső használatakor javasolt módszer a kémcső gyors forgatása 180 fokban a főtengelye mentén úgy, hogy minden oldott levegő távozzék a két fázisból. A tapasztalat azt mutatja, hogy 50 ilyen forgatás rendszerint elegendő a megoszlási egyensúly létrehozásához. Azért, hogy bizonyosan létrejöjjön az egyensúly, öt perc alatt 100 forgatás ajánlott.

1.6.2.3.2. Fáziselkülönítés

Adott esetben a fázisok elkülönítéséhez a keveréket centrifugálni kell. Ezt a műveletet szobahőmérsékleten, laboratóriumi centrifugában kell elvégezni, vagy ha nem szabályozott hőmérsékletű centrifugát használnak, a centrifugakémcsöveket az elemzés előtt legalább egy óra hosszat egyensúlyban kell tartani a vizsgálati hőmérsékleten.

▼B

1.6.2.4. *Elemzés*

A megoszlási hányados meghatározásához meg kell határozni a vizsgált anyag koncentrációját mindkét fázisban. Ez úgy tehető meg, hogy ki kell venni minden egyes vizsgálati körülményhez tartozó minden egyes kémcsőből mindkét fázis aliquot részét, és elemezni kell azokat a kiválasztott eljárással. Ezután ki kell számítani a mindkét fázisban jelen lévő teljes anyagmennyiséget, és ezt össze kell hasonlítani az eredetileg bevitt anyagmennyiséggel.

A vizes fázisból olyan eljárással kell mintát venni, amely minimálissá teszi az n-oktanol maradéka bevitelének veszélyét: a vizes fázisból a mintavételhez egy eltávolítható tűvel ellátott üvegfecskendő használható. A fecskendőt kiinduláskor részben meg kell tölteni levegővel. A levegőt óvatosan ki kell tolni, miközben a tűt behelyezik az n-oktanol-rétegen keresztül. Ezután megfelelő mennyiségű vizes fázist kell beszívni a fecskendőbe. A fecskendőt gyorsan el kell távolítani az oldatból, és le kell venni a tűt. A fecskendő tartalma ezután vizes mintaként használható. A két elkülönített fázisban a koncentrációt lehetőleg valamilyen, anyagra jellemző módszerrel kell meghatározni. A következő felsorolás példákat ad azokra az analitikai módszerekre, amelyek megfelelőnek bizonyulhatnak:

— fotometrikus módszerek,

— gázkromatográfia,

— nagy nyomású folyadékkromatográfia.

1.6.3. **A HPLC-módszer**

1.6.3.1. *Előkészület*

Készülék

Impulzusmentes szivattyúval és alkalmas detektáló készülékkel felszerelt folyadékkromatográf szükséges. Injektáló hurokkal rendelkező injektor használata ajánlatos. Álló fázisban poláros csoportok jelenléte nagymértékben károsíthatja a HPLC-oszlop megfelelő működését. Ezért az álló fázisnak minimális százalékban szabad csak tartalmaznia poláros csoportokat (11). A kereskedelemben kapható mikroszemcsés, reverz fázisú töltetek vagy előretöltött oszlopok is használhatók. Az injektáló rendszer és az analitikai oszlop közé védőoszlop helyezhető el.

Mobil fázis

Eluáló oldószer elkészítésére HPLC-minőségű metanolt és HPLC-minőségű vizet használnak, amelyet gáztalanítanak használat előtt. Izokratikus eluálást kell alkalmazni. Minimum 25 % víztartalmú metanol/víz arányt kell használni. Általában 3:1 (térfogat/térfogat) metanol-víz keverék megfelelő log P = 6 vegyületek 1 órán belüli eluálásához 1 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Ha a vegyület log P-je nagy, szükségessé válik az elúciós idő lerövidítése (referenciavegyületeknél is) a mobil fázis polaritásának vagy az oszlop hosszúságának csökkentésével.

A n-oktanolban nagyon kis mértékben oldható anyagok hajlamosak arra, hogy rendkívül alacsony log P_{ow}-értékeket adjanak a HPLC-módszerrel; az ilyen vegyületek csúcsai esetenként az oldószerfronttal együtt jelentkeznek. Ez valószínűleg annak tulajdonítható, hogy túl lassú a megoszlási folyamat ahhoz, hogy létrejöhessen az egyensúly az alatt az idő alatt, amíg általában egy HPLC-elválasztás tart. Az áramlási sebesség csökkentése vagy a metanol/víz arány csökkentése hatásos lehet abban, hogy reális értéket kapjanak.

▼B

A vizsgált, és a referenciavegyületeknek elegendő koncentrációkban oldhatóaknak kell lenniük a mobil fázisban ahhoz, hogy kimutathatók legyenek. Csak kivételes esetekben használhatók adalékanyagok a metanol/víz keverékhez, mivel az adalékanyagok megváltoztatják az oszlop tulajdonságait. Adalékanyagokkal rendelkező kromatogramokhoz kötelező az ugyanolyan típusú, külön oszlop használata. Amennyiben nem megfelelő a metanol-víz, más szerves oldószer-víz keverékek használhatók, például etanol-víz vagy acetonitril-víz.

Az eluáló folyadék pH-ja döntő fontosságú ionizálható vegyületek esetében. Ennek belül kell lennie az oszlop üzemi pH-tartományán, ami rendszerint 2 és 8 között van. Ajánlatos a pufferolás. El kell kerülni a só kicsapódását és az oszlop minőségromlását, amely bizonyos szerves fázis/puffer keverékek esetében megvalósulhat. Nem ajánlatos kovasav alapú, álló fázisú HPLC-berendezéssel pH 8 felett méréseket végrehajtani, mivel a lúgos mobil fázis használata gyors romlást okozhat az oszlop teljesítőképességében.

Oldott anyagok

A referenciavegyületeknek a lehető legtisztább vegyületeknek kell lenniük. A vizsgálatra vagy kalibrálásra szánt vegyületeket, amennyiben lehetséges, feloldják a mobil fázisban.

Vizsgálati körülmények

A mérések során a hőmérsékletnek nem szabad ± 2 K-nél nagyobb értékkel változnia.

1.6.3.2. ***Mérés***

A t_0 holtidő számítása

A t_0 holtidő valamely homológ sor (például n-alkil-metil-ketonok) vagy kromatográffal nem késleltetett szerves vegyületek (például tiokarbamid vagy formamid) segítségével határozható meg. A t_0 holtidőnek homológ sor segítségével végrehajtott számításához valamely homológ sornak legalább hét tagját fecskendezik be, és meghatározzák a megfelelő holtidőt. Felrajzolják a $t_{r\ (n\ c\ +\ 1)}$ alapretenciós időt a $t_{r(n\ c)}$ függvényében, és meghatározzák a következő regressziós egyenletet:

$$t_{r(nc\ +\ 1)} = a + b\ t_{r(nc)}$$

„a” metszéspontját és „b” meredekségét (n = szénatomok száma). A t_0 holtidőt ekkor a következő összefüggés adja meg:

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

▼B

Kalibrációs görbe

A következő lépés a log P függvényében a log k-értékek korrelációjának megállapítása megfelelő referenciaanyagok esetében. A gyakorlatban egyidejűleg fecskendeznek be 5–10 tagból álló standard referenciavegyületet, amelyek log P-értéke a várt tartomány körül van, és lehetőleg a detektáló rendszerhez kapcsolt regisztráló integrátoron meghatározzák a retenciós időket. Kiszámítják a kapacitástényezők megfelelő – k – logaritmusait, és felrajzolják a lombikrázásos módszerrel meghatározott log P függvényében. A kalibrálást rendszeres időközönként, naponta legalább egyszer elvégzik azért, hogy felismerjék az esetleges változásokat az oszlop viselkedésében.

A vizsgált anyag kapacitási tényezőjének meghatározása

A vizsgált anyagot a mobil fázis lehető legkisebb mennyiségében fecskendezik be. Meghatározzák (kétszer) a retenciós időt, amely lehetővé teszi a k kapacitástényező kiszámítását. A referenciavegyületek korrelációs görbéjéből interpolálható a vizsgált anyag megoszlási hányadosa. Nagyon kicsi és nagyon nagy megoszlási hányadosok esetében extrapoláció szükséges. Ilyen esetekben gondosan kell figyelembe venni a regressziós egyenes konfidenciahatárait.

2. **ADATOK**

Lombikrázásos módszer

A P meghatározott értékeinek megbízhatósága a párhuzamos meghatározások középértékeinek az általános középértékkel való összehasonlításával vizsgálható.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosság és szennyeződések),

— amikor a módszerek nem alkalmazhatók (például felületaktív anyag), az egyes n-oktanol- és vízoldékonyságon alapuló valamilyen számított értéket vagy becslést kell megadni,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges valamennyi információt és megjegyzést, különösen azokat, amelyek az anyag szennyeződéseivel és fizikai állapotával kapcsolatosak.

Lombikrázásos módszer esetében:

— adott esetben az előzetes becslés eredményeit,

— azt a hőmérsékletet, amelyen a meghatározást mérték,

— a koncentrációk meghatározásához használt analitikai eljárások adatait,

— adott esetben a centrifugálás idejét és sebességét,

▼B

— mindkét fázisban a mért koncentrációkat, minden egyes meghatározáshoz (ez azt jelenti, hogy összesen 12 koncentrációnak kell szerepelnie a jelentésben),

— a vizsgált anyag súlyát, az egyes vizsgálati tartályokban alkalmazott minden egyes fázis térfogatát és egyensúlyba hozás után az egyes fázisokban jelen lévő vizsgált anyag teljes, számított mennyiségét,

— a megoszlási hányados (P) számított értékeit, és minden vizsgálati körülmény esetében meg kell adni a középértéket, vagyis minden meghatározáshoz meg kell adni a középértéket. Amennyiben létezik javaslat a megoszlási hányados koncentrációfüggőségére, ezt is szerepeltetni kell a jelentésben,

— meg kell adni az egyes P értékeknek a középérték körüli standard deviációját,

— az összes meghatározásból megállapított átlagos P értéket 10-es alapú logaritmusaként is ki kell kifejezni,

— a számított elméleti P_{ow}-t, amikor ilyen értéket meghatároznak, vagy amikor a mért érték > 10^4,

— a kísérlet során felhasznált víz és vizes fázis pH-ját,

— víz helyett puffer használata esetén a pufferek használatának indoklását, a pufferek összetételét, koncentrációját és pH-ját, és a vizes fázis pH-ját a kísérlet előtt és után.

A HPLC-módszer esetében:

— adott esetben az előzetes becslés eredményét,

— a vizsgált és referenciaanyagokat és azok tisztaságát,

— azt a hőmérséklet-tartományt, amelyben a meghatározások történtek,

— azt a pH-t, amelyben a meghatározások történtek,

— az analitikai és védőoszlop, a mobil fázis és a detektálásra szolgáló eszközök adatait,

— a kalibrálás során használt referenciaanyagok regressziós adatait és a szakirodalomban közölt log P-értékeit,

— az illesztett regressziós egyenes részleteit (log k a log P függvényében),

— a vizsgált vegyület átlagos retenciós adatait és interpolált log P értékét,

— a berendezés és a működési állapot leírását,

— az elúciós profilokat,

— az oszlopba bevitt vizsgált és referenciaanyagok mennyiségét,

— a holtidőt, és mérésének módját.

▼B

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 107. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

(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.) – A Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, Kalifornia, 91711. címről szerezhető be.

(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. (1981).

(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. Müller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band 1/1, 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., 971, 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, Basel, 1978.

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

▼B

1. Függelék

Számítási/becslési módszerek

BEVEZETÉS

A Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a) című mű ismerteti a számítási módszerek, adatok és példák általános bevezetését.

A P_{ow} számított értékei használhatók:

— annak eldöntésére, hogy a kísérleti módszerek közül melyik megfelelő (lombikrázási tartomány: log P_{ow}: –2-től 4-ig, HPLC-tartomány: log P_{ow}: 0-tól 6-ig),

— a megfelelő vizsgálati körülmények kiválasztásához (például referenciaanyagok HPLC-eljárásokhoz, n-oktanol/víz térfogatarány lombikrázásos módszerhez),

— a lehetséges kísérleti hibák belső laboratóriumi ellenőrzéséhez,

— P_{ow} becslés biztosítására, ahol a kísérleti módszerek technikai okok miatt nem alkalmazhatók.

BECSLÉSI MÓDSZER

A megoszlási hányados előzetes becslése

A megoszlási hányados értéke a tiszta oldószerekben a vizsgálati anyag oldhatóságának segítségével becsülhető meg. Ehhez:

$$P_{\text{telítési}} = \frac{\text{telítésic}_{\text{n – oktanol}}}{\text{telítésic}_{\text{víz}}}$$

SZÁMÍTÁSI MÓDSZEREK

A számítási módszerek alapelve

Minden számítási módszer a molekulának olyan elemekre való formális lebomlásán alapul, amelyekhez ismertek megbízható log P_{ow} értékek. Ekkor a teljes molekula log P_{ow} értékét a megfelelő fragmentum összege plusz az intermolekuláris kölcsönhatásokhoz tartozó korrekciós kifejezések összege adja.

A fragmentumkonstansok és korrekciós kifejezések jegyzékei rendelkezésre állnak (b) (c) (d) (e). Néhányat közülük rendszeresen frissítenek (b).

Minőségi követelmények

Általában a számítási módszer megbízhatósága csökken a vizsgált vegyület növekvő bonyolultságával. Kis molekulasúlyú és egy- vagy kétfunkciós csoportú, egyszerű molekulák esetében a különböző fragmentálási módszerek eredményei és a mért érték között 0,1–0,3 log P_{ow} eltérés várható. Összetettebb molekulák esetében a hibahatár nagyobb lehet. Ez a fragmentumkonstansok megbízhatóságától és rendelkezésre állásától, valamint az intramolekuláris kölcsönhatások (például hidrogénkötések) felismerhetőségétől és a korrekciós kifejezések pontos használatától függ (kisebb a probléma a CLOGP-3-as szoftverrel) (b). Ionizálható vegyületek esetében fontos a töltés vagy az ionizáció mértékének megfelelő figyelembevétele.

▼B

Számítási eljárások

Hansch-féle π-módszer

A Fujita és munkatársai (f) által bevezetett eredeti π hidrofób helyettesítő konstanst a következőképpen definiálták:

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

ahol P_{ow} (PhX) egy aromás származék megoszlási hányadosa és P_{ow} (PhH) a kiindulási vegyület megoszlási hányadosa.

(például $\pi_{Cl} = \log P_{ow}$ (C_6H_5C1) -log P_{ow}(C_6H_6) = 2,84 – 2,13 = 0,71)

A definíció alapján a π-módszer általában aromás szubsztitúcióra alkalmazható. Nagy számú szubstituens π-értékeit (b) (c) (d) már táblázatba foglalták. Ezeket aromás molekulák vagy szubstruktúrák log P_{ow} értékének kiszámításához használják.

A Rekker-féle módszer

Rekker szerint (g) a log P_{ow} érték kiszámítása a következőképpen történik:

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

ahol f_j a különböző molekuláris fragmentumkonstansok és a_i ezeknek a vizsgált molekulában való előfordulási gyakorisága. A korrekciós kifejezések egyetlen C_m konstans (egy úgynevezett „magic constant”) egész számú többszöröseként fejezhetők ki. Az f_j és C_m fragmentumkonstansokat egy 1 054 kísérleti P_{ow} értéket (825 vegyület) tartalmazó jegyzékből határozták meg többszörös regresszióanalízis (c) (h) segítségével. A interakciós kifejezések meghatározását az (e) (h) (i) szakirodalomban leírt szabályoknak megfelelően hajtották végre.

A Hansch–Leo-féle módszer

Hansch és Leo (c) szerint a log P_{ow} érték a következő összefüggésből számítható ki:

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

ahol f_i a különböző molekularész állandói, F_j a korrekciós kifejezések és a_i, b_j a megfelelő előfordulási gyakoriság. Kísérleti P_{ow} értékekből atomos és csoportfragmentálási értékek jegyzékét és F_j korrekciós kifejezések (úgynevezett „tényezők”) jegyzékét határozták meg a fokozatos megközelítés módszerével. A korrekciós kifejezéseket több különböző osztályba sorolták be (a) (c). Viszonylag bonyolult és időigényes minden szabály és korrekciós kifejezés figyelembevétele. Szoftvercsomagokat fejlesztettek ki (b).

Összetett módszer

Összetett molekulák log P_{ow} értékének számítása lényegesen javítható, ha a molekula nagyobb szerkezeti elemekre bontható, amelyekhez rendelkezésre állnak megbízható log P_{ow} értékek táblázatokból (b) (c), vagy saját mérésekből. Az ilyen részek (például heterociklusok, antrakinon, azobenzol) ezután kombinálhatók a Hansch-féle π-értékekkel, vagy a Rekker-vagy Leo-féle részállandókkal.

Megjegyzések

i. A számítási módszerek csak akkor alkalmazhatók részben vagy teljesen ionizált vegyületekhez, amikor lehetőség van a szükséges korrekciós tényező figyelembevételére.

▼B

ii. Amennyiben intramolekuláris hidrogénkötések feltételezhetők, hozzá kell adni a megfelelő korrekciós tagot (körülbelül + 0,6 és + 1,0 közötti log P_{ow} egységek) (a). Az ilyen kötések jelenlétét a molekula sztereomodelljei vagy spektroszkópikus adatai jelezhetik.

iii. Amennyiben több tautomeralak lehetséges, a legvalószínűbb alakot kell használni számítási alapként.

iv. A részkonstansok jegyzékeinek módosítását körültekintően kell végrehajtani.

Vizsgálati jelentés

A számítási/becslési módszerek használatakor a vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag leírását (keverék, szennyeződések stb.),

— minden lehetséges intramolekuláris hidrogénkötés, disszociáció, töltés és minden egyéb szokatlan hatás (például tautoméria) jelzését,

— a számítási módszer leírását,

— az adatbázis azonosítását vagy a készlet ismertetését,

— a részek kiválasztásának sajátosságait,

— a számítás átfogó dokumentálását.

SZAKIRODALOM

(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, Kalifornia 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. – Chim. 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, 225.

▼B

2. Függelék

HPLC-Módszerhez Javasolt Referenciaanyagok

Szena	Referenciaanyag	log P_{ow}	pKa
1	2-butanon	0,3	
2	4-Acetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Benzilalkohol	1,1	
6	p-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxiecetsav	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenilacetonitril	1,6	
12	4-Metilbenzil-alkohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoesav	1,8	pKa = 3,47
16	4-Klóranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Nitrobenzol	1,9	
18	Fahéj alkohol	1,9	
19	Benzoesav	1,9	pKa = 4,19
20	p-Krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Fahéjsav	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizol	2,1	
23	Metilbenzoát	2,1	
24	Benzol	2,1	
25	3-Metilbenzoesav	2,4	pKa = 4,27
26	4-Klórfenol	2,4	pKa = 9,1
27	Triklóretilén	2,4	
28	Atrazin	2,6	
29	Etilbenzoát	2,6	
30	2,6-Diklórbenzonitril	2,6	
31	3-Klórbenzoesav	2,7	pKa = 3,82
32	Toluol	2,7	
33	1-Naftol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3-Diklóranilin	2,8	
35	Klórbenzol	2,8	
36	Allil-feniléter	2,9	
37	Brómbenzol	3,0	

▼B

Szena	Referenciaanyag	log P_{ow}	pKa
38	Etilbenzol	3,2	
39	Benzofenon	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,2	pKa = 9,54
41	Timol	3,3	
42	1,4-Diklórbenzol	3,4	
43	Difenilamin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftalin	3,6	
45	Fenilbenzoát	3,6	
46	Izopropilbenzol	3,7	
47	2,4,6-Triklórfenol	3,7	pKa = 6
48	Bifenil	4,0	
49	Benzil-benzoát	4,0	
50	2,4-Dinitro-6-szekunder butilfenol	4,1	
51	1,2,4-Triklórbenzol	4,2	
52	Dedekánsav	4,2	
53	Difeniléter	4,2	
54	n-Butilbenzol	4,5	
55	Fenantrin	4,5	
56	Fluorantén	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-Difenilpiridin	4,9	
59	Trifenil-amin	5,7	
60	DDT	6,2	
	Egyéb, alacsony log P_{ow} értékű referenciaanyagok		
1	Nikotinsav	- 0,07	

▼B

A.9. **LOBBANÁSPONT**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag lobbanékonyságáról. A vizsgálati eljárás olyan folyékony anyagokhoz alkalmazható, amelyek gőzeit meggyújthatják gyújtóforrások. A leírásban felsorolt vizsgálati módszerek csak az egyes módszereknél megadott lobbanáspont-tartományoknál megbízhatóak.

A használni kívánt módszer kiválasztásakor vizsgálni kell az anyag és a mintatartó közötti kémiai reakciók lehetőségét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A lobbanáspont az a 101,325 kPa nyomásra korrigált legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a vizsgálati módszerben meghatározott feltételek mellett valamely folyadék olyan mennyiségben fejleszt gőzt, hogy a vizsgálati tartályban meggyújtható gőz/levegő keverék jön létre.

Mértékegységek: °C

$t = T - 273{,}15$

(t °C-ban és T K-ben)

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagot használni. Ezeknek elsősorban arra kell szolgálniuk, hogy időnként ellenőrizzék a módszer megfelelőségét, és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel nyert eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot vizsgálati tartályban helyezik el, és felmelegítik vagy lehűtik az egyes vizsgálati módszerekben leírt eljárásnak megfelelő vizsgálati hőmérsékletre. Gyújtási kísérleteket végeznek azért, hogy meggyőződjenek arról, fellobban-e vagy sem a minta a vizsgálati hőmérsékleten.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.5.1. **Ismételhetőség**

Az ismételhetőség a lobbanáspont-tartománynak és az alkalmazott vizsgálati módszernek megfelelően változik; maximum 2 °C.

1.5.2. **Érzékenység**

Az érzékenység az alkalmazott vizsgálati módszertől függ.

1.5.3. **Alkalmazhatóság**

Néhány vizsgálati módszer alkalmazhatósága bizonyos lobbanáspont-tartományokra korlátozódik, és az anyaggal kapcsolatos adatoktól (például magas viszkozitás) függ.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

A vizsgált anyagból vett mintát valamilyen vizsgáló készülékben helyezik el az 1.6.3.1. és/vagy 1.6.3.2. pontnak megfelelően.

Energiadús vagy toxikus anyagokhoz biztonsági okok miatt ajánlatos kis, körülbelül 2 cm^3 mintaméretet használó módszert alkalmazni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A készüléket, amennyiben ez biztonsági szempontból megfelel, huzatmentes helyre kell helyezni.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

1.6.3.1. *Egyensúlyi módszer*

Lásd az ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679-es szabványt.

1.6.3.2. *Nem egyensúlyi módszer*

Ábel-féle készülék:

Lásd a BS 2000 170. részét, az NF M07-011, NF T66-009 szabványt.

Ábel–Pensky-féle készülék:

Lásd az EN 57, DIN 51755 1. részét (5-től 65 °C-ig terjedő hőmérsékletekhez), a DIN 51755 2. részét (5 °C alatti hőmérsékletekhez), az NF M07-036 szabványt.

Tag-féle készülék:

Lásd az ASTM D 56 szabványt.

Pensky-Martens-féle készülék:

Lásd az ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-019 szabványt.

Megjegyzések:

Amennyiben az 1.6.3.2. pontban szereplő, nem egyensúlyi módszerrel meghatározott lobbanáspontról megállapítják, hogy az értéke 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C vagy 55 ± 2 °C, ezt az eredményt meg kell erősíteni az ugyanezt a készüléket használó valamilyen egyensúlyi módszerrel.

Bejelentéshez csak azok a módszerek használhatók, amelyek megadják a lobbanáspont hőmérsékletét.

Oldószereket tartalmazó, viszkózus folyadékok (festékek, ragasztóanyagok és ehhez hasonlóak) lobbanáspontjának meghatározásához csak viszkózus folyadékok lobbanáspontjának meghatározására alkalmas készülékek és vizsgálati módszerek használhatók.

Lásd az ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 1. részét.

▼B

2. **ADATOK**

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— meg kell adni az alkalmazott módszert, valamint minden esetleges eltérést,

— az eredményeket és az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

Nincs.

▼B

A.10. **TŰZVESZÉLYESSÉG (SZILÁRD ANYAGOK)**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag lehetséges robbanási tulajdonságairól.

Ezt a vizsgálatot csak porszerű, szemcsés vagy pasztaszerű anyagokhoz szabad alkalmazni.

Ahhoz, hogy ne vizsgáljanak minden meggyújtható anyagot, hanem csak azokat, amelyek hevesen égnek, vagy égési tulajdonságai valamilyen ok miatt különösen veszélyesek, csak azok az anyagok tekinthetők tűzveszélyesnek, amelyek égési sebessége meghalad egy bizonyos határértéket.

A tűz eloltásakor jelentkező nehézségek miatt különösen veszélyes lehet, ha a fémporban izzás terjed. A fémporokat tűzveszélyesnek kell tekinteni, ha az anyagban az izzás terjedése egy előírt időtartamon belül van.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Égési idő, másodpercben kifejezve.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot megszakítás nélküli, körülbelül 250 mm hosszú csíkba vagy porsávba rendezik, és előzetes vizsgálatot hajtanak végre annak meghatározására, hogy gázlánggal meggyújtva lánggal terjed-e vagy parázslik-e. Amennyiben az előírt időtartamon belül a porcsík 200 mm-es szakasza mentén bekövetkezik a terjedés, teljes vizsgálati programot hajtanak végre az égési sebesség meghatározása érdekében.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előzetes screening vizsgálat**

Az anyagot körülbelül 250 mm hosszú, 20 mm széles és 10 mm magas, megszakítás nélküli csíkba vagy porsávba rendezik egy nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezen. Egy (legalább 5 mm átmérőjű) gázégőből forró lángot bocsátanak a porcsík egyik végére mindaddig, amíg a por meg nem gyullad, vagy maximum 2 percig (fémek vagy fémötvözetek porai esetében 5 percig). Figyelni kell, hogy az égés tovaterjed-e a csík 200 mm-es szakasza mentén a 4 perces vizsgálati időtartamon belül (vagy fémporok esetében 40 perc alatt). Amennyiben az anyag nem gyullad meg, és lángolva vagy parázzsal nem továbbítja az égést a porcsík 200 mm-es szakasza mentén a 4 perces (vagy 40 perces) vizsgálati időtartamon belül, akkor az anyagot nem szabad tűzveszélyesnek tekinteni, és további vizsgálat nem szükséges. Amennyiben az anyag kevesebb mint 4 perc alatt vagy fémporok esetében kevesebb mint 40 perc alatt továbbítja az égést a porcsík 200 mm-es szakasza mentén, az alábbiakban (az 1.6.2. pontban és azt követően) leírt eljárást végre kell hajtani.

1.6.2. **Égési sebesség vizsgálata**

1.6.2.1. *Előkészület*

Egy 250 mm hosszú, háromszög keresztmetszetű, 10 mm belső magasságú és 20 mm szélességű formába lazán betöltik a porszerű vagy szemcsés anyagokat. A forma mindkét oldalán, hosszirányban, két fémlemezt helyeznek el oldalsó határoló felületként, amelyek 2 mm-rel túlnyúlnak a háromszög keresztmetszetű alakzat felső szélén (lásd az ábrát). A formát ezután háromszor leejtik 2 cm magasságból valamilyen szilárd felületre. Amennyiben szükséges, a formát újból feltöltik vizsgálati anyaggal. Az oldalhatárolókat ezután eltávolítják, és a felesleges anyagot lekaparják. Valamilyen nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezt helyeznek a forma tetejére, a készüléket megfordítják és a formát eltávolítják.

A pasztaszerű anyagokat nem éghető, nem porózus és kis hővezető-képességű alaplemezen terítik el 250 mm hosszúságú és körülbelül 1 cm^2 keresztmetszetű kötél alakjában.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

Nedvszívó anyag esetében a vizsgálatot az anyagnak a tartályból történt eltávolítása után a lehető leggyorsabban kell végrehajtani.

1.6.2.3. *A vizsgálat végrehajtása*

A halmot az elszívószekrény huzatába kell elhelyezni.

A levegősebességnek elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megakadályozza az égéstermékeknek a laboratóriumba szökését, és ezt nem szabad változtatni a vizsgálat során. Huzaternyőt kell felszerelni a készülék köré.

Gázégőből (legalább 5 mm átmérőjű) kibocsátott forró lángot használnak az anyaghalom egyik végén történő meggyújtására. Amikor a halom már 80 mm távolságig égett, megmérik az égési sebességet a következő 100 mm mentén.

▼B

A vizsgálatot hatszor hajtják végre, minden alkalommal tiszta, hideg lemezt használva, kivéve ha korábban pozitív eredményt kaptak.

2. **ADATOK**

Az értékeléshez az előzetes szűrővizsgálat (1.6.1.) során nyert égési idő és a legfeljebb hat vizsgálatban (1.6.2.3.) nyert legrövidebb égési idő kell.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgált anyag leírását, ennek fizikai állapotát, beleértve a nedvességtartalmat,

— az előzetes screening-vizsgálat és az égési sebesség vizsgálata során nyert eredményeket, amennyiben végeztek ilyen vizsgálatokat,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A porszerű, szemcsés vagy pasztaszerű anyagokat tűzveszélyesnek kell tekinteni, amennyiben az 1.6.2. pontban leírt vizsgálati eljárásnak megfelelően végrehajtott bármely vizsgálat során az égési idő kevesebb mint 45 másodperc. Fémek vagy fémötvözetek porait tűzveszélyesnek kell tekinteni, amennyiben meggyújthatók, és a láng vagy a reakciózóna 10 perc vagy ennél rövidebb idő alatt halad keresztül a teljes mintán.

4. **FELHASZNÁLT IRODALOM**

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

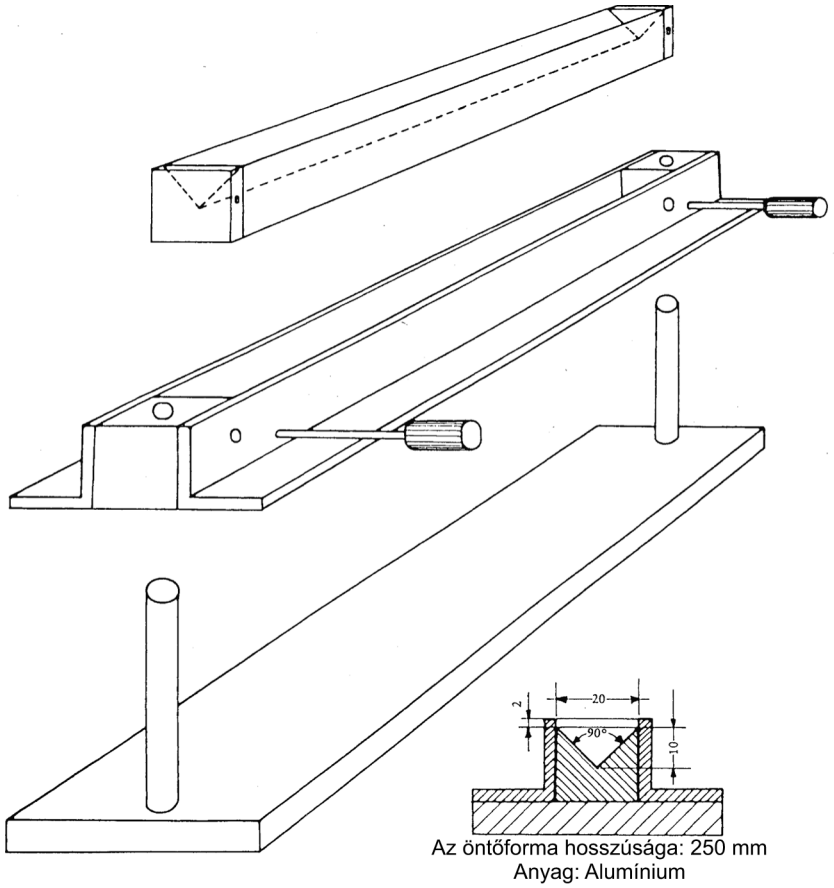
▼B

Függelék

Ábra

Forma és tartozékok a halom elkészítéséhez

(Minden métet mm-ben van megadva)



Az öntőforma hosszúsága: 250 mm
Anyag: Alumínium

▼B

A.11. TŰZVESZÉLYESSÉG (GÁZOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A módszer lehetővé teszi annak meghatározását, hogy levegővel kevert, szobahőmérsékletű (körülbelül 20 °C-os) és légköri nyomású gázok tűzveszélyesek-e, és ha igen, milyen koncentrációtartományban. A vizsgálati gáz levegővel alkotott, egyre növekvő gázkoncentrációjú keverékeit elektromos szikra hatásának teszik ki, és figyelik, hogy előfordul-e gyulladás.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A tűzveszélyességi tartomány az alsó és felső robbanási határ közötti koncentrációtartomány. Az alsó és felső robbanási határ a levegővel kevert, kismértékben tűzveszélyes gáznak azon koncentrációhatárai, amelyeknél nem jön létre lángterjedés.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Lépésenként növelik a gázkoncentrációt a levegőben, és a keveréket minden egyes szakaszban elektromos szikra hatásának teszik ki.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

A vizsgálati tartály egy függőleges, 50 mm minimális belső átmérőjű és 300 mm minimális magasságú üveghenger. A gyújtóelektródák 3–5 mm távolságra vannak egymástól, és a henger aljától 60 mm-re helyezkednek el. A hengert nyomásmentesítő nyílással szerelték fel. A készüléket védőburkolattal kell ellátni mindenféle robbanásveszély korlátozására.

Gyújtóforrásként 0,5 szekundum időtartamú, álló, indukciós szikrát használnak, amelyet 10– 15 kV kimeneti feszültségű (bemeneti teljesítmény maximum 300 W), nagyfeszültségű transzformátor hoz létre. A (2) szakirodalom az alkalmas készülék egy példáját írja le.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C) kell végrehajtani.

▼B

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

Adagoló szivattyúk segítségével ismert koncentrációjú, levegőbe kevert gázt visznek be az üveghengerbe. Szikrát vezetnek a keveréken keresztül, és megfigyelik, hogy elválik-e a láng a gyújtóforrástól és terjed-e önállóan. A gázkoncentrációt 1 térfogatszázalékos lépésekben változtatják, amíg be nem következik a gyulladás a fentieknek megfelelően.

Amennyiben a gáz kémiai szerkezete azt jelzi, hogy az valószínűleg nem tűzveszélyes, és kiszámítható a levegővel alkotott sztöchiometrikus keveréke, akkor csak a sztöchiometriai összetételnél 10 %-kal kisebb értékűtől a 10 %-kal nagyobb összetételig terjedő tartományban lévő keverékeket kell megvizsgálni 1 %-os lépésekben.

2. **ADATOK**

E tulajdonság meghatározásához a lángterjedés előfordulása az egyetlen lényeges információ.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgálathoz használt készülék leírását, a méreteivel együtt,

— azt a hőmérsékletet, amelyen a vizsgálatot végrehajtották,

— a vizsgált koncentrációkat és a kapott eredményeket,

— a vizsgálat eredményét: nem tűzveszélyes gáz vagy tűzveszélyes gáz,

— amennyiben arra a következtetésre jutottak, hogy a gáz nem tűzveszélyes, meg kell adni azt a koncentrációtartományt, amely felett 1 %-os lépésekben vizsgálták meg,

— az eredmények értelmezéséhez szükséges minden információt és megjegyzést közölni kell.

4. **SZAKIRODALOM**

(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. Crosse-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. **TŰZVESZÉLYESSÉG (ÉRINTKEZÉS VÍZZEL)**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálati módszer annak meghatározására használható, hogy valamely anyag vízzel vagy nedves levegővel létrejött reakciója olyan gáz vagy gázok fejlődéséhez vezet-e, amelyek tűzveszélyesek.

A vizsgálati módszer mind szilárd, mind folyékony anyagokhoz alkalmazható. E módszer nem alkalmazható olyan anyagoknál, amelyeknél öngyulladás lép fel, amikor levegővel érintkeznek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Tűzveszélyesek: azok az anyagok, amelyek vízzel vagy nedves levegővel érintkezve veszélyes mennyiségben, minimum 1 liter/kg/óra ütemben fejlesztenek tűzveszélyes gázokat.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az anyagot az alábbi lépések sorrendjének megfelelően vizsgálják; amennyiben valamely lépésnél gyulladás következik be, további vizsgálat nem szükséges. Amennyiben ismert, hogy az anyag nem lép erőteljes reakcióba vízzel, tovább kell haladni a 4. lépéshez (1.3.4.).

1.3.1. **1. lépés**

A vizsgált anyagot elhelyezik egy 20 °C-os hőmérsékletű desztillált vizet tartalmazó tálba, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e.

1.3.2. **2. lépés**

A vizsgált anyagot egy 20 °C-os hőmérsékletű desztillált vizet tartalmazó edény felületén lebegő szűrőpapírra helyezik, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e. A szűrőpapír arra szolgál, hogy egy helyen tartsa az anyagot a gyulladás lehetőségének növelésére.

1.3.3. **3. lépés**

A vizsgált anyagot egy körülbelül 2 cm magas és 3 cm átmérőjű halomba helyezik. Néhány csepp vizet adnak hozzá a halomhoz, és figyelik, hogy a fejlődő gáz meggyullad-e.

1.3.4. **4. lépés**

A vizsgált anyagot 20 °C-os hőmérsékletű desztillált vízzel keverik, és a gázfejlődés sebességét 7 órán keresztül mérik, 1 órás időközönként. Amennyiben a gázfejlődés sebessége egyenetlen vagy növekszik, 7 óra után a mérési időt meg kell növelni maximum 5 napra. A vizsgálat megállítható, ha a sebesség bármikor az 1 liter/kg/órát meghaladja.

▼B

1.4. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

1.6.1. **1. lépés**

1.6.1.1. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.1.2. *A vizsgálat végrehajtása*

Desztillált vizet tartalmazó tálba kismennyiségű (körülbelül 2 mm átmérőjű) vizsgált anyagot kell helyezni. Figyelni kell, hogy i) fejlődik-e gáz; és hogy ii) meggyullad-e a gáz. Amennyiben a gáz meggyullad, nincs szükség az anyag további vizsgálatára, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

1.6.2. **2. lépés**

1.6.2.1. *Készülék*

Valamilyen alkalmas tartályban, például egy 100 mm átmérőjű lepárlóedényben lévő desztillált víz felszínén szűrőpapírt lebegtetnek.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.2.3. *A vizsgálat végrehajtása*

A szűrőpapír közepére kismennyiségű (körülbelül 2 mm átmérőjű) vizsgált anyagot helyeznek. Figyelni kell, hogy i. fejlődik-e gáz; és hogy ii. meggyullad-e. Amennyiben a gáz meggyullad, nincs szükség az anyag további vizsgálatára, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

1.6.3. **3. lépés**

1.6.3.1. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) hajtják végre.

1.6.3.2. *A vizsgálat végrehajtása*

A vizsgált anyagot körülbelül 2 cm magasságú és 3 cm átmérőjű, a tetején mélyedéssel ellátott halomba helyezik. Néhány csepp vizet adnak a bemélyedt részhez, és figyelik, hogy i. fejlődik-e gáz; és hogy ii. meggyullad-e. Amennyiben a gáz meggyullad, az anyag további vizsgálatára nincs szükség, mivel az anyagot veszélyesnek kell tekinteni.

▼B

1.6.4. **4. lépés**

1.6.4.1. *Készülék*

A készülék felépítését az ábra mutatja.

1.6.4.2. *Vizsgálati körülmények*

Vizsgálni kell a vizsgált anyagot tartalmazó tartályt, hogy van-e benne 500 μm-nél kisebb (részecskeméretű) por. Amennyiben a por a teljes anyag több mint 1 tömegszázaléka, vagy ha a minta morzsálódik, akkor a teljes anyagot porrá kell őrölni vizsgálat előtt a tárolás és kezelés alatti részecskeméret csökkenésének figyelembevétele érdekében; egyébként az anyagot olyan állapotban kell megvizsgálni, ahogyan átvették. A vizsgálatot szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) és légköri nyomáson kell végrehajtani.

1.6.4.3. *A vizsgálat végrehajtása*

10–20 ml vizet öntenek a készülék csepegtetőtölcsérébe, és 10 gramm anyagot helyeznek a kúp alakú lombikba. A fejlődő gáz térfogata bármilyen, erre alkalmas eszközzel mérhető. Kinyitják a csepegtetőtölcsér elzárócsapját, hogy beengedjék a vizet a kúp alakú lombikba, és elindítanak egy stopperórát. A gázfejlődést óránként mérik a 7 órás időtartam során. Amennyiben ez alatt az időtartam alatt a gázfejlődés egyenetlen, vagy ha az időtartam végén növekszik a gázfejlődés sebessége, a méréseket folytatni kell, legfeljebb öt napig. Amennyiben a mérés során bármikor a gázfejlődés sebessége meghaladja az 1 liter/kg/órát, a vizsgálat megszakítható. Ezt a vizsgálatot háromszor kell elvégezni.

Amennyiben ismeretlen a gáz kémiai összetétele, elemezni kell a gázt. Amennyiben a gáz tűzveszélyes komponenseket tartalmaz, és nem ismert, hogy a teljes keverék tűzveszélyes-e, vagy sem, ugyanolyan összetételű keveréket kell készíteni, és megvizsgálni az A. 11. módszernek megfelelően.

2. **ADATOK**

Az anyagot veszélyesnek kell tekinteni, ha:

— öngyulladás jön létre a vizsgálati eljárás bármelyik lépésében,

vagy

— 1 liter/kg anyag/óránál nagyobb sebességgel fejlődik kismértékben tűzveszélyes gáz.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgált anyag minden előkészítésének részleteit,

▼B

— a vizsgálatok eredményeit (1., 2., 3. és 4. lépés),

— a fejlődő gáz kémiai összetételét,

— a gázfejlődés sebességét, ha a 4. lépést (1.6.4.) végrehajtják,

— az eredmények értelmezéséhez lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Recommendation on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.

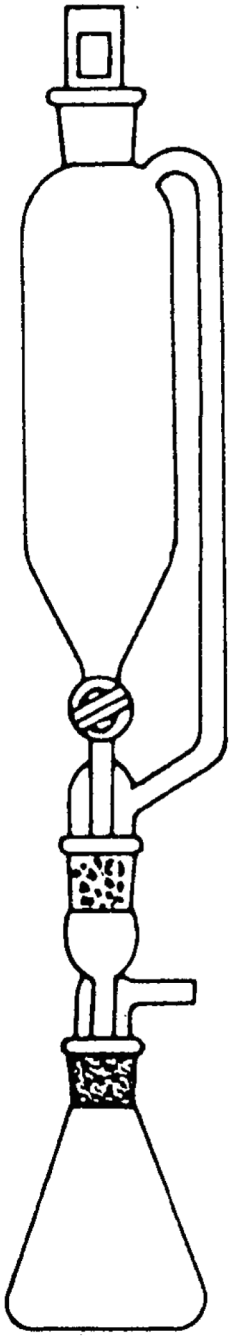
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Függelék

Ábra

Készülék



▼B

A.13. SZILÁRD ANYAGOK ÉS FOLYADÉKOK ÖNGYULLADÁSI KÉPESSÉGE

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A vizsgálati eljárás olyan szilárd vagy folyékony anyagoknál alkalmazható, amelyek kis mennyiségekben öngyulladással meggyulladnak rövid idővel azután, hogy érintkezésbe lépnek a szobahőmérsékletű (körülbelül 20 °C-os) levegővel.

Azokra az anyagokra, amelyeket a gyulladás bekövetkezése előtt órákon vagy napokon át szobahőmérséklet vagy magas hőmérséklet hatásának kell kitenni, e vizsgálati módszer nem vonatkozik.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Azok az anyagok tekinthetők pirofórosnak, amelyek meggyulladnak, vagy az 1.6. pontban leírt feltételek mellett szenesedést okoznak.

Folyadékoknál lehet, hogy az öngyulladást is meg kell vizsgálni az öngyulladási hőmérséklet (folyadékok és gázok) című A.15. módszer segítségével.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs megadva.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A szilárd vagy folyékony anyagot hozzáadják egy inert hordozóanyaghoz, és környezeti hőmérsékleten érintkezésbe hozzák a levegővel 5 perces időtartamig. Amennyiben a folyékony anyagok nem gyulladnak meg ilyen körülmények között, azokat szűrőpapírral felitatják, és környezeti hőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) levegő hatásának teszik ki 5 percre. Amennyiben a szilárd vagy folyékony anyag meggyullad, vagy a folyékony anyag meggyújtja vagy elszenesíti a szűrőpapírt, akkor az anyagot pirofórosnak tekintik.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Ismételhetőség: a biztonsággal kapcsolatos jelentősége miatt egyetlen pozitív eredmény elegendő ahhoz, hogy az anyagot pirofórosnak tekintsék.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

Egy körülbelül 10 cm átmérőjű porceláncsészét szobahőmérsékleten (körülbelül 20 °C-on) megtöltenek kovafölddel körülbelül 5 mm magasságig.

Megjegyzés:

A kovaföldet vagy bármilyen más, ehhez hasonló inert anyagot, amely könnyen beszerezhető, úgy kell kiválasztani, hogy olyan talajra legyen reprezentatív, amelyre a vizsgált anyag baleset esetén kifolyhat.

Száraz szűrőpapír szükséges olyan folyadékok vizsgálatához, amelyek levegővel érintkezve nem gyulladnak meg inert hordozóanyaggal történő érintkezéskor.

▼B

1.6.2. **A vizsgálat végrehajtása**

a) *Porszerű szilárd anyagok*

A vizsgálandó porszerű anyagból 1–2 cm^3-t kiöntenek körülbelül 1 méter magasságról egy nem éghető felületre, és figyelik, hogy meggyullad-e az anyag a leejtés során vagy az öntéstől számított 5 percen belül.

A vizsgálatot hat alkalommal hajtják végre, kivéve ha meggyullad az anyag.

b) *Folyadékok*

Körülbelül 5 cm^3 vizsgált folyadékot öntenek az előkészített porceláncsészébe, és figyelik, hogy 5 percen belül meggyullad-e az anyag.

Amennyiben nem gyullad meg a hatszor elvégzett vizsgálat során, a következő vizsgálatokat hajtják végre:

Fecskendőből 0,5 ml vizsgált anyagot helyeznek egy bevagdosott szűrőpapírra, és figyelik, hogy megyullad-e, illetve elszenesedik-e a szűrőpapír a folyadék hozzáadásától számított 5 percen belül. A vizsgálatot háromszor hajtják végre, kivéve ha meggyullad vagy elszenesedik a szűrőpapír.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgálat abbahagyható, amennyiben valamelyik vizsgálat eredménye pozitív.

2.2. ÉRTÉKELÉS

Amennyiben valamely inert hordozóanyaghoz való hozzáadás és levegő hatásának való expozíció után az anyag 5 percen belül meggyullad, vagy valamely folyékony anyag a levegő hatásának való expozíció után 5 percen belül elszenesít vagy meggyújt egy szűrőpapírt, az anyagot pirofórosnak tekintik.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a vizsgálatok eredményeit,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

(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. ROBBANÁSI TULAJDONSÁGOK

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A módszer egy vizsgálatvázlatot ismertet annak meghatározására, hogy robbanásveszélyes-e valamely szilárd vagy pépes anyag, amikor láng (hőérzékenység), illetve ütés vagy súrlódás (mechanikai hatással szembeni érzékenység) hatásának van kitéve, és hogy robbanásveszélyes-e valamely folyékony anyag, amikor láng vagy ütés hatásának van kitéve.

A módszer három részből áll:

a) hőérzékenység vizsgálata (1);

b) ütéssel kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálata (1);

c) súrlódással kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenység vizsgálata (1).

A módszer bizonyos általános határ segítségével adatokat ad meg a robbanás bekövetkezése valószínűségének meghatározására. A módszert nem annak megállapítására tervezték, hogy bizonyos körülmények között képes-e az anyag robbanásra.

A módszer alkalmas annak meghatározására, hogy az anyag robbanásveszélyes-e (hő- és mechanikai hatással szembeni érzékenység) az irányelvben előírt különleges körülmények között. A módszer alapja számos, nemzetközileg széles körben használt készüléktípus (1), amelyek rendszerint kielégítő eredményeket adnak. Ismert, hogy a módszer nem ad végleges eredményt. A megadott készülék helyett használható más készülék, feltéve hogy az nemzetközileg elismert, és hogy az eredmények összeegyeztethetők a megadott készülékkel kapott eredményekkel.

A vizsgálatokat nem kell végrehajtani, amikor a rendelkezésre álló termodinamikai információk (például képződéshő, bomláshő) és/vagy a szerkezeti képletben egyes reakcióképes csoportok hiánya (2) vitathatatlanul bizonyossá teszi, hogy az anyag nem képes gázképződéssel vagy hőfelszabadulással járó gyors bomlásra (vagyis az anyag nem jelent semmilyen robbanásveszélyt). Folyadékoknál nincs szükség súrlódással kapcsolatos mechanikai hatással szembeni érzékenységvizsgálatra.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Robbanásveszélyes:

Azok az anyagok, amelyek láng hatására robbanhatnak, vagy amelyek a megadott készülékben az ütésre vagy rázásra érzékenyek (vagy mechanikai hatással szemben érzékenyebbek, mint az 1,3-dinitro-benzol az alternatív készülékben).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

1,3-dinitro-benzol, 0,5 mm-es szitán átszitált, rostált, kristályos technikai termék, a súrlódást és ütést vizsgáló módszerekhez.

Vizes ciklohexánonból átkristályosított, nedvesen szitált, 250 μm nyíláson átmenő és 150 μm nyílásméretű szitán visszamaradó, 103 ± 2 ºC hőmérsékleten (4 órán át) szárított Perhidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX, hexogén, ciklonit – CAS 121-82-4) a második súrlódás- és ütésvizsgálat-sorozathoz.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Előzetes vizsgálatok szükségesek a három érzékenységvizsgálat végrehajtása érdekében a biztonságos körülmények létrehozásához.

1.4.1. **Biztonság a kezelés során – vizsgálatok (3)**

Biztonsági okok miatt a fő vizsgálatok végrehajtása előtt kismennyiségű (körülbelül 10 mg) anyagmintát – anélkül, hogy gázlángba beleérne – hevítenek, alkalmas formájú készülékben ütéssel, és egy üllőn fakalapács használatával vagy súrlódást létrehozó géppel súrlódás hatásának teszik ki. E vizsgálat célja meggyőződni arról, hogy érzékeny-e és robbanásveszélyes-e annyira az anyag, hogy az előírt érzékenységi vizsgálatokat, különösen a hőhatással szembeni érzékenységvizsgálatot, különleges óvintézkedések mellett kell-e végrehajtani a vizsgálatot végző személy sérülésének elkerülésére.

1.4.2. **Hőérzékenység**

A módszer magában foglalja az anyagnak a különböző nyílásátmérőjű mérőperemek által lezárt acélcsőben történő melegítését annak meghatározására, hogy hajlamos-e robbanásra az anyag erős hevítés és meghatározott mértékű fojtás mellett.

1.4.3. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (ütés)**

A módszer magában foglalja az anyag expozícióját olyan ütés hatásának, amelyet egy megadott magasságról leejtett, megadott tömeg hoz létre.

1.4.4. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (súrlódás)**

A módszer magában foglalja a szilárd vagy pépes anyagok expozícióját súrlódás hatásának, szabványosított felületek között, előírt terheléssel és relatív elmozdulással.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs megadva.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Hőérzékenység (láng hatása)**

1.6.1.1. *Készülék*

A készülék egy fűtő- és védőkészülékbe szerelt, újra fel nem használható acélcsőből, valamint annak újrahasználható zárószerkezetéből áll (1. ábra). Valamennyi cső acéllemezből, mélyhúzással készült (lásd a függeléket), 24 mm belső átmérőjű, 75 mm hosszúságú és 0,5 mm falvastagságú. A csövek a nyitott végükön peremmel vannak ellátva azért, hogy lezárhatók legyenek a zárólemez-szerkezettel. Ez egy központi furattal rendelkező, a csőhöz kétrészes csatlakozással (anya és menetes gyűrű) szorosan rögzített, nyomásálló zárólemezből áll. Az anya és a menetes gyűrű króm-mangán acélból készült (lásd a függeléket), amely egészen 800 °C hőmérsékletig szikramentes. A zárólemezek 6 mm vastagságú, hőálló acélból készültek (lásd a függeléket), és különböző nyílásátmérővel rendelkeznek.

▼B

1.6.1.2. *Vizsgálati körülmények*

Az anyagot az átvételkor rendszerint megvizsgálják, bizonyos esetekben, például préselt, öntött, vagy más módon tömörített anyagok esetében, szükség lehet az anyag aprítás utáni vizsgálatára.

Szilárd anyagok esetében az egyes vizsgálatok során használandó anyag mennyiségét kétszakaszos száraz futtatási eljárás segítségével határozzák meg. Egy kitáralt csövet, amelynek előzőleg megmérték az önsúlyát, megtöltenek 9 cm^3 anyaggal, és az anyagot tömörítik a cső teljes keresztmetszetére ható 80 N erővel. Biztonsági okokból vagy olyan esetekben, ahol összenyomással változtatható a minta fizikai alakja, más töltési eljárások is használhatók; például ha az anyag nagyon érzékeny a súrlódásra, a tömörítés nem megfelelő. Amennyiben az anyag összenyomható, addig folytatják a további anyagbevitelt és tömörítést, amíg a cső felső vége alatt 55 mm-re van feltöltve. Meghatározzák a cső 55 mm-es szintjéig a feltöltéshez használt össztömeget, és hozzáadnak két további adagot, mindkettőt 80 N erővel tömörítve. Ezután szükség szerint, tömörítéssel hozzáadnak vagy kivesznek anyagot úgy, hogy a töltési szint a cső felső végétől 15 mm-re legyen. A második száraz futtatást, az első száraz futtatásban megállapított teljes tömeg egyharmadának tömörített mennyiségével kezdik el. Hozzáadnak két további ilyen adagot 80 N tömörítéssel, és a csőben az anyagszintet a cső felső végétől 15 mm-re állítják be, szükség szerint anyag hozzáadásával vagy elvételével. A második száraz futtatásban meghatározott anyagmennyiséget használják minden egyes vizsgálathoz; a megtöltést három egyenlő mennyiségben hajtják végre, mindegyiket 9 cm^3-re sűrítik össze olyan erővel, amely ehhez szükséges. (Ez megkönnyíthető menetes gyűrűk segítségével.)

Folyadékokat és géleket 60 mm-es magasságig töltenek be a csőbe, a gélek esetében különös gondossággal kell eljárni annak megakadályozása érdekében, hogy üregek alakuljanak ki. A menetes gyűrűt alulról a csőre csúsztatják, behelyezik a megfelelő zárólemezt, és meghúzzák az anyát valamennyi molibdén-diszulfid bázisú kenőanyag felvitele után. Lényeges annak ellenőrzése, hogy nem került anyag a karima és a lemez közé vagy a menetekbe.

A hevítést nyomásszabályozóval (60–70 mbar) felszerelt ipari palackból egy áramlásmérőn átvezetett és a négy égőhöz elosztócsövön keresztül egyenletesen elosztott (amelyet az égőkből a lángok vizuális megfigyelése jelez) propán biztosítja. Az égőket az 1. ábrának megfelelően a vizsgálati kamra köré helyezték el. A négy gázégő együttes fogyasztása körülbelül 3,2 liter propán/perc. Használhatók más éghető gázok és égők, de a hevítési sebességnek a 3. ábrán megadottnak kell lennie. Minden készülék esetében a hevítési sebességet rendszeres időközönként ellenőrizni kell dibutil-ftaláttal megtöltött csövek segítségével a 3. ábrának megfelelően.

1.6.1.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

Minden egyes vizsgálatot addig kell végezni, amíg a cső szét nem esik, vagy már 5 percig nem hevítették. Amennyiben a cső három vagy több darabra törik szét, amelyek néhány esetben a 2. ábrának megfelelően keskeny fémcsíkokkal összekapcsolhatók, ezt úgy értékelik, hogy robbanás történt. Az olyan vizsgálatokat, amelyeknél kevesebb töredék jön létre, vagy egyáltalán nem törik szét a cső, úgy tekintik, hogy nem eredményeznek robbanást.

▼B

Először egy három vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre 6,0 mm átmérőjű zárólemezzel, és ha nem történik robbanás, egy második, három vizsgálatból álló vizsgálatsorozat hajtanak végre 2,0 mm átmérőjű mérőperemmel. Amennyiben a két vizsgálatsorozat végrehajtása során valamelyiknél robbanás történik, nincs szükség további vizsgálatokra.

1.6.1.4. *Kiértékelés*

A vizsgálat eredményét pozitívnak tekintik, ha a fenti vizsgálatsorozatok valamelyikében robbanás történt.

1.6.2. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (ütés)**

1.6.2.1. *Készülék (4. ábra)*

Egy jellegzetes ejtőkalapácsos készülék lényeges részei egy alaplappal ellátott öntöttacél tömb, üllő, oszlop, vezetők, ejtősúlyok, kioldó készülék és egy mintatartó. A 100 mm (átmérőjű) × 70 mm (magasságú) acélüllőt a 450 mm (hosszúságú) × 450 mm (szélességű) × 60 mm (magasságú) öntött alaplappal ellátott, 230 mm (hosszúságú) × 250 mm (szélességű) × 200 mm (magasságú) acéltömb tetejéhez csavarozzák. Egy varratmentes húzott acélcsőből készült oszlopot rögzítettek az acéltömb hátsó részéhez csavarozott tartóba. Négy csavar rögzíti a készüléket egy tömör, 60 × 60 × 60 cm-es betontömbhöz úgy, hogy a vezető sínek tökéletesen függőlegesek, és az ejtősúly szabadon esik. A vizsgálathoz 5 és 10 kg-os, tömör acélból készült súlyokat alkalmaznak. Minden egyes súly ütőfeje HRC 60–63 keménységű és 25 mm-es minimális átmérőjű edzett acél.

A vizsgált mintát két koaxiális, egymás fölött elhelyezett, tömör acélhengerből álló ütőkészülékbe zárják egy hengeres acél vezetőgyűrű bemélyedésében. A tömör acélhengerek 10 (- 0,003, - 0,005) mm átmérőjűek és 10 mm magasságúak, és felületük csiszolt, szélük lekerekített (0,5 mm-es görbületi sugár), és HRC 58–65 keménységűek. A hengermélyedés külső átmérője 16 mm, magassága 13 mm, és egy 10 (+ 0,005, + 0,010) mm-es csiszolt furattal kell rendelkeznie. Az ütőkészüléket acélból készült (26 mm átmérőjű és 26 mm magasságú), közbeeső üllőre szerelték, és egy, a füstgázok távozását lehetővé tevő, perforált gyűrűvel állítják középpontba.

1.6.2.2. *Vizsgálati körülmények*

A minta térfogata 40 mm^3 vagy valamilyen alternatív készülékhez megfelelő térfogatú legyen. A szilárd anyagokat száraz állapotban kell vizsgálni, és a következőképpen kell előkészíteni:

a) a por alakú anyagokat szitálják (0,5 mm-es szitaméret); a szitán átjutó anyagot használják a vizsgálathoz;

b) a préselt, öntött vagy más módon tömörített anyagokat kis darabokra törik és szitálják; a 0,5 és 1 mm közötti átmérőjű szitált frakciót használják a vizsgálathoz, a szitált frakciónak az eredeti anyagra reprezentatívnak kell lennie.

Az általában pép formájában szállított anyagokat, amennyiben lehetséges, száraz állapotban, vagy minden esetben a lehető legnagyobb mennyiségű oldószer eltávolítását követően kell vizsgálni. A folyékony anyagokat a felső és alsó acélhengerek között 1 mm-es réssel vizsgálják.

▼B

1.6.2.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

Hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre, a 10 kg-os tömeget 0,40 méterről (40 J) ejtik le. Amennyiben robbanás következik be a 40 J-lal végrehajtott hat vizsgálat valamelyike során, további hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot kell végrehajtani, ahol 5 kg-os tömeget kell leejteni 0,15 méterről (7,5 J). Más készülékekben a mintát összehasonlítják a kiválasztott referenciaanyaggal egy meghatározott eljárás (például fel-le módszer stb.) segítségével.

1.6.2.4. *Értékelés*

A vizsgálat eredményét pozitívnak tekintik, ha az előírt ütőkészülékkel végrehajtott vizsgálatok bármelyikében legalább egyszer robbanás következik be (ezzel egyenértékű a lángba borulás és/vagy durranás), vagy a minta érzékenyebbnek bizonyul, mint az 1,3-dinitro-benzol vagy az RDX valamelyik alternatív ütésvizsgálatban.

1.6.3. **Mechanikai hatással szembeni érzékenység (súrlódás)**

1.6.3.1. *Készülék (5. ábra)*

A súrlódásérzékenységet vizsgáló berendezés egy öntöttacél alaplemezből áll, amelyre a súrlódási érzékenységet vizsgáló készüléket felszerelték. Ez a készülék egy rögzített porcelánhengerből és egy mozgó porcelánlapból áll. A porcelánlapot egy kocsin tartják, amely két csúszópályán fut. A kocsit hajtórúd, hüvelyvonó karom és alkalmas hajtómű csatlakoztatja a villamos motorhoz úgy, hogy a porcelánlap csak egyszer mozdul előre és hátra 10 mm-t a porcelánhenger alatt. A porcelánhenger terhelhető, például 120 vagy 360 newtonnal.

A porcelánlapok fehér ipari porcelánból (9–32 μm érdesség) készültek, és 25 mm (hosszúság) × 25 mm (szélesség) × 5 mm (magasság) méretűek. A porcelánhenger ugyancsak fehér ipari porcelánból készült, és ez 15 mm hosszú, 10 mm átmérőjű és 10 mm görbületi sugarú, érdesített gömbszeletekkel rendelkezik.

1.6.3.2. *Vizsgálati körülmények*

A minta térfogata 10 mm^3 vagy az adott alternatív berendezésnek megfelelő térfogatú legyen.

A szilárd anyagokat száraz állapotban vizsgálják, és a következőképpen készítik elő:

a) a por alakú anyagokat szitálják (0,5 mm-es szitaméret); a szitán átjutó anyagot használják a vizsgálathoz;

b) a préselt, öntött vagy más módon tömörített anyagokat darabokra törik és szitálják; a < 0,5 mm átmérőjű szitált frakciót használják vizsgálathoz.

Az általában pép formában szállított anyagokat, amennyiben lehetséges, száraz állapotban kell megvizsgálni. Amennyiben az anyag száraz állapotban nem készíthető el, a pépet (a lehető legnagyobb oldószermennyiség eltávolítása után) egy formával készített, 0,5 mm vastag, 2 mm széles, 10 mm hosszú filmként vizsgálják.

▼B

1.6.3.3. *A vizsgálatok végrehajtása*

A porcelánhengert a vizsgált mintára helyezik, és ráadják a terhelést. A vizsgálat végrehajtásakor a porcelánlap porozitási jelzésének harántirányban kell állnia a mozgás irányával. Ügyelni kell arra, hogy amikor a hengert a mintára helyezik, elegendő vizsgált anyag legyen a henger alatt, és a lap megfelelően mozogjon a henger alatt. Pépes anyagokhoz egy 2 × 10 mm-es nyílású, 0,5 mm vastag mérőeszközt használnak az anyag lapra történő felvitelére. A porcelánlapnak 10 mm-t kell előre és visszafelé mozognia a porcelánhenger alatt 0,44 másodpercen belül. A lap és henger felületének minden részét csak egyszer szabad használni; a henger két vége két vizsgálathoz, a lap két felülete felületenként három vizsgálathoz használható.

Hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot hajtanak végre 360 N terheléssel. Amennyiben pozitív eredményt kapnak ez alatt a hat vizsgálat alatt, további hat vizsgálatból álló vizsgálatsorozatot kell végrehajtani 120 N terheléssel. Egy másik készülékben a mintát összehasonlítják a kiválasztott referenciaanyaggal egy erre meghatározott eljárás (például fel-le módszer) segítségével.

1.6.3.4. *Értékelés*

A vizsgálati eredmény akkor tekinthető pozitívnak, ha az előírt súrlódási érzékenységet vizsgáló berendezéssel végrehajtott vizsgálatok valamelyikében legalább egyszer robbanás jön létre (a robbanással egyenértékű a sercegés és/vagy a csattanás vagy lángba borulás), vagy egy alternatív súrlódásvizsgálat során teljesül az ezzel egyenértékű követelmény.

2. **ADATOK**

Elvben az anyagot az irányelv értelmében robbanásveszélyesnek kell tekinteni, ha a hő, ütés vagy súrlódási érzékenység vizsgálata során pozitív eredményt kapnak.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag azonosítását, összetételét, tisztaságát, nedvességtartalmát stb.,

— a minta fizikai jellemzőit, és annak feltüntetését, hogy őrölték, aprították és/vagy szitálták-e az anyagot,

— a hőérzékenységi vizsgálatok során tett megfigyeléseket (például a minta tömege, száma stb.),

— a mechanikai hatással szembeni érzékenységvizsgálatok során tett megfigyeléseket (például jelentős mennyiségű füst képződése vagy teljes elbomlás csattanás nélkül, lángok, szikra, csattanás, sistergés, ropogás stb.),

— minden egyes típusú vizsgálat eredményét,

— ha alternatív készüléket használtak, meg kell adni az adott készülékkel kapott eredmények és az egyenértékű készülékkel kapott eredmények közötti korreláció tudományos indoklását, valamint prioritását,

▼B

— minden hasznos megjegyzést, ilyen például a hivatkozás a hasonló termékekkel végrehajtott vizsgálatokra, amely lényeges lehet az eredmények megfelelő értelmezéséhez,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE ÉS ÉRTÉKELÉSE

A vizsgálati jelentésnek tartalmaznia kell minden hamis, rendellenes, illetve nem jellemző eredményt. Amennyiben a vizsgálatok közül bármelyiket figyelmen kívül kell hagyni, meg kell adni annak magyarázatát és minden alternatív vagy kiegészítő vizsgálat eredményeit. A rendellenes eredményt el kell fogadni névértéken, és az anyagot ennek megfelelően osztályozni kell, kivéve ha az eredmény megmagyarázható.

4. **SZAKIRODALOM**

(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

Függelék

Példa az anyag meghatározására a hőérzékenységvizsgálathoz (lásd a DIN 1623 szabványt)

(1) Cső: 1.0336.505 g számú anyagmeghatározás.

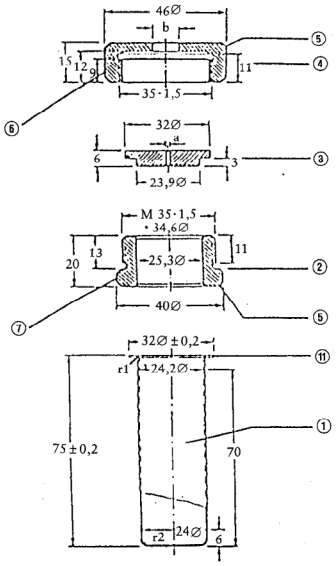
(2) Zárólemez: 1.4873 számú anyagmeghatározás.

(3) Menetes gyűrű és anya: 1.3817 számú anyagmeghatározás.

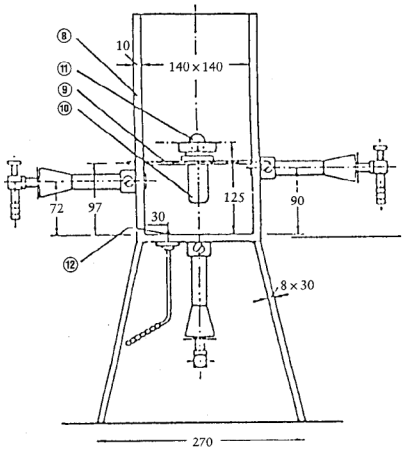
1. ábra

Hőérzékenységet vizsgáló készülék

(minden méret mm-ben van megadva)



1a. ábra. Acélcső és tartozékok



1b. ábra. Fűtő-és védőkészülék

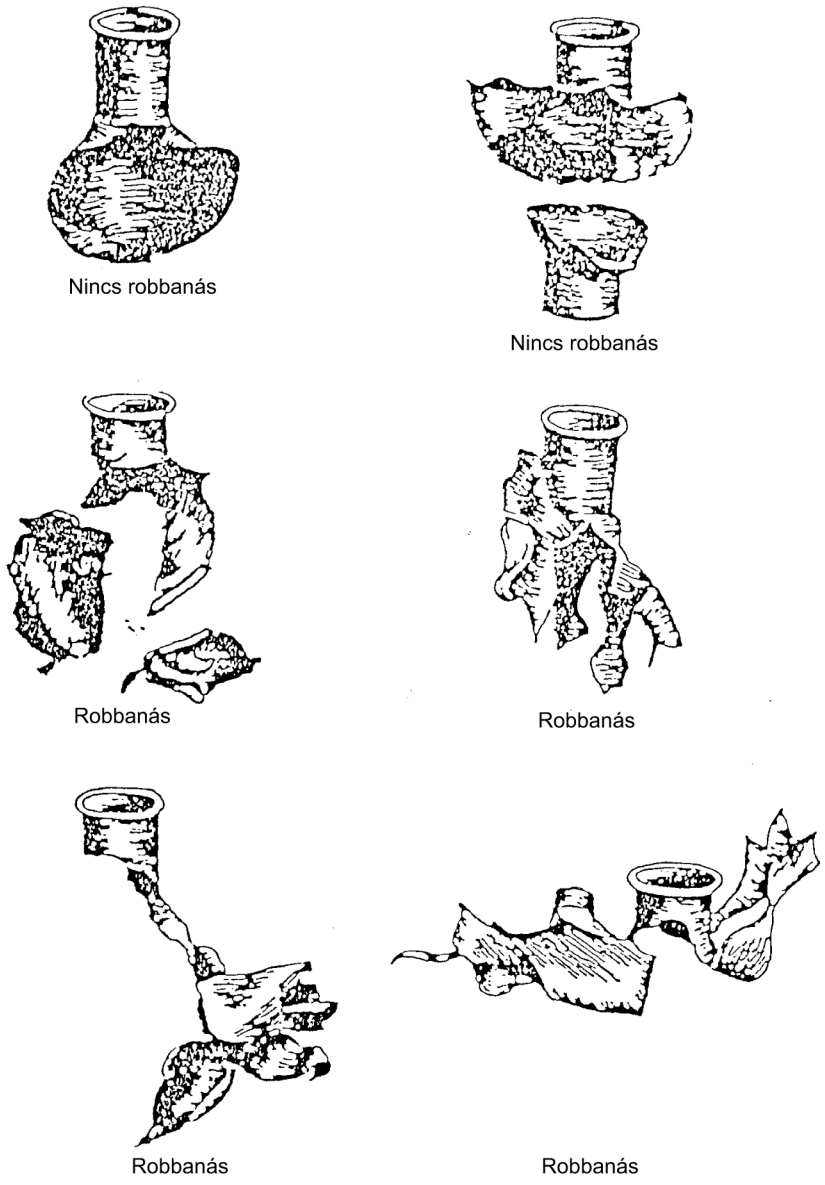
(1) cső
(1a) külső perem
(2) menetes gyűrű; kis súrlódású menet
(3) blende, a = 2,0 vagy 6,0 mm átmérő
(4) anya, b = 10 mm átmérő
(5) lekerekített felület
(6) 2 lemezfedél 41-es méretű villáskulcshoz
(7) 2 lemezfedél 36-os méretű villáskulcshoz
(8) repeszálló kamra
(9) 2 csőtartó rúd
(10) felszerelt cső
(11) hátsó égő helye; a többi égő látható
(12) gyújtócső

▼B

2. ábra

Hőérzékenység-vizsgálat

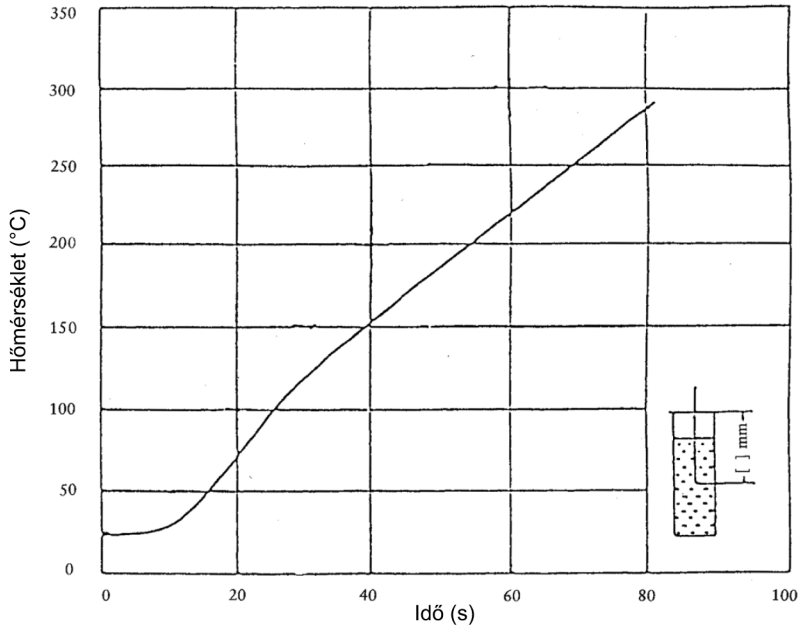
Példák a széttörésre



▼B

3. ábra

Hevítési sebesség kalibrációja a hőérzékenység-vizsgálathoz



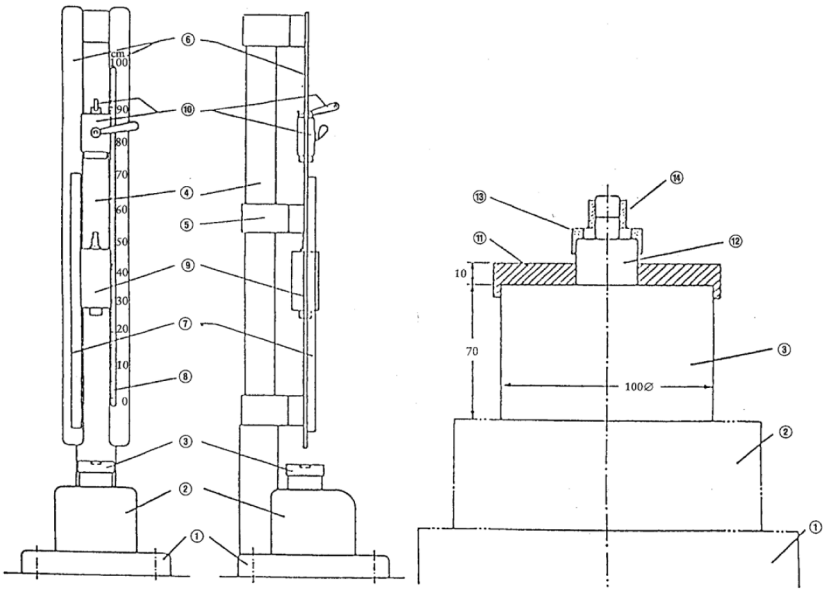
Egy zárt (1,5 mm-es zárólemez) csőben 3,2 liter/perces áramlási sebességű propán segítségével dibutil-ftalát (27 cm^3) melegítésekor kapott hőmérséklet/idő görbe. A hőmérsékletet egy 1 mm átmérőjű, középre, 43 mm-rel a cső pereme alá helyezett rozsdamentes acéllal bevont kromel/-alumel termoelemmel mérik. 135 °C és 285 °C között a hevítési sebességnek 185 és 215 K/perc között kell lennie.

▼B

4. ábra

Ütési érzékenységet vizsgáló készülék

(minden méret mm-ben van megadva)



4a. ábra: Ejtőkalapács, elölnézet és oldalnézet, általános nézet

(1) alaptest, 450 × 450 × 60
(2) acéltömb, 230 × 250 × 200
(3) üllő, 100 átmérő × 70
(4) oszlop
(5) középső keretelem
(6) 2 vezetősín
(7) fogazott tartó

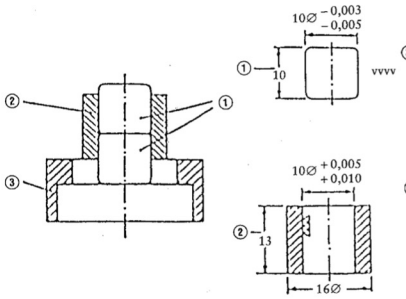
4b. ábra: Ejtőkalapács, alsó rész

(8) skála
(9) ejtőkalapács (leeső tömeg)
(10) tartó- és kioldókészülék
(11) rögzítőlemez
(12) közbenső üllő (cserélhető), 26 átmérő × 26
(13) centírozó gyűrű átfolyónyílásokkal
(14) ütőkészülék

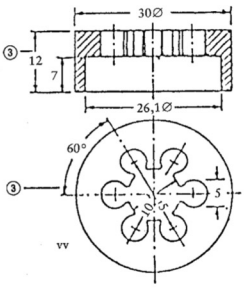
▼B

4. ábra

Folytatás

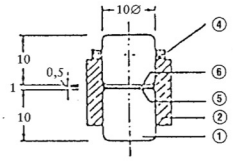


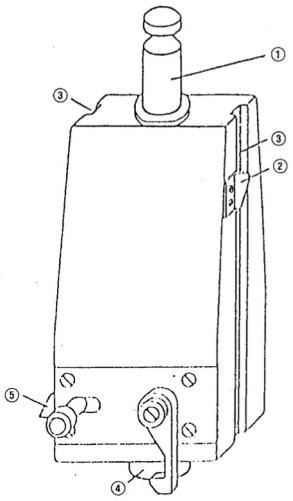
4c. ábra: Űtőkészülék por alakú vagy pépszerű anyagokhoz



4d. ábra: Ütőkészülék folyékony anyagokhoz

(1) acélhengerek
(2) vezetőgyűrű acélhengerekhez
(3) centírozógyűrű áramlásnyílásokkal
a) függőleges metszet
b) felülnézet
(4) gumigyűrű
(5) folyékony anyag (40 mm^3)
(6) folyadékmentes tér





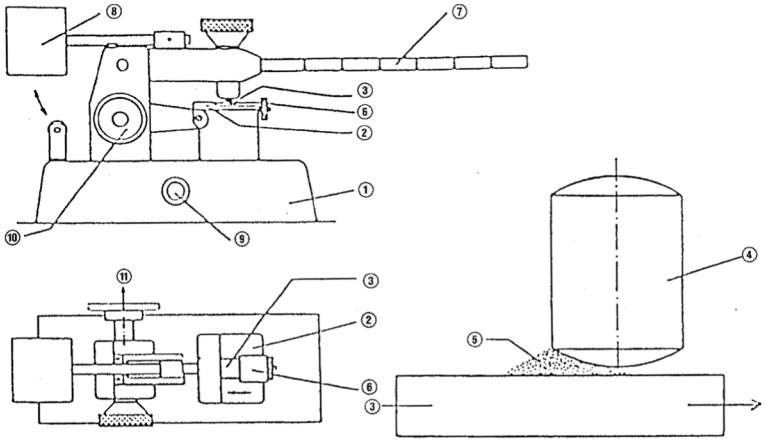
4e. ábra: Kalapács (5 kg-os leeső tömeg)

(1) felfüggesztő csap
(2) magasságjelző
(3) beállító vájat
(4) hengeres ütőfej
(5) visszaugró befogás

▼B

5. ábra

Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék



5a. ábra: Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék: függőleges nézet és felülnézet

(1) acélalap
(2) mozgatható kocsi
(3) porcelánlap, 25 × 25 × 5 mm, a kocsira rögzítve
(4) rögzített porcelánhenger, 10 mm átmérőjű × 15 mm
(5) vizsgált minta, körülbelül 10 mm^3

5b. ábra: A mintán a henger kezdőhelyzete

(6) hengertartó
(7) terhelő kar
(8) ellensúly
(9) kapcsoló
(10) kerék a kocsi kiindulási helyzetbe állításához
(11) a villanymotor felé mutató irány

▼B

A.15. ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLET (FOLYADÉKOK ÉS GÁZOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Robbanásveszélyes és környezeti hőmérsékleten levegővel érintkezve öngyulladó anyagokat nem lehet ezen eljárással vizsgálni. A vizsgálati eljárás olyan gázokhoz, folyadékokhoz és gőzökhöz alkalmazható, amelyek forró felülettel érintkezve meggyulladhatnak.

Az öngyulladási hőmérsékletet jelentős mértékben csökkentheti a katalitikus szennyeződések jelenléte, a felület anyaga vagy a vizsgálati tartály nagyobb térfogata.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az öngyulladási képesség mértéke az öngyulladási hőmérséklet segítségével fejezhető ki. Az öngyulladási hőmérséklet az a legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a vizsgált anyag levegővel keverve meggyullad a vizsgálati módszerben meghatározott körülmények között.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A szabványok tartalmazzák a referenciaanyagokat (lásd az 1.6.3. pontot). Ezeknek elsősorban a módszer megfelelőségének időnkénti ellenőrzésére és a más módszerekkel kapott eredményekkel való összehasonlítás lehetővé tételére kell szolgálniuk.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A módszer meghatározza valamely körülkerített tér belső felületének azt a minimális hőmérsékletét, amelynél meggyullad az e térbe fecskendezett gáz, gőz vagy folyadék.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az ismételhetőség az öngyulladási hőmérsékletek tartományának és az alkalmazott vizsgálati módszernek megfelelően változik.

Az érzékenység és specifikusság az alkalmazott vizsgálati módszertől függ.

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

A készüléket az 1.6.3. pontban említett módszer írja le.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

A vizsgált anyagmintát az 1.6.3. pontban említett módszernek megfelelően vizsgálják.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

Lásd az IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037 szabványokat.

▼B

2. **ADATOK**

Regisztrálni kell a vizsgálati hőmérsékletet, a légköri nyomást, a felhasznált minta mennyiségét és a gyulladás bekövetkezéséig eltelt holtidőt.

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— az anyag pontos leírását (azonosítás és szennyeződések),

— a felhasznált minta mennyiségét, a légköri nyomást,

— a vizsgálathoz használt készüléket,

— a mérések eredményeit (vizsgálati hőmérsékletek, gyulladással kapcsolatos eredmények, megfelelő holtidők),

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

4. **SZAKIRODALOM**

Nincs.

▼B

A.16. **SZILÁRD ANYAGOK RELATÍV ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLETE**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Robbanásveszélyes és környezeti hőmérsékleten levegővel érintkezve öngyulladó anyagokat nem szabad alávetni ennek a vizsgálatnak.

A vizsgálat célja előzetes információk biztosítása szilárd anyagok magas hőmérsékleteken bekövetkező öngyulladásáról.

Amennyiben az anyagnak oxigénnel történő reakciója, vagy az exoterm bomlás során fejlődő hő nem elég gyorsan áramlik a környezetbe, öngyulladáshoz vezető önmelegedés jön létre. Az öngyulladás tehát akkor következik be, amikor a hőtermelés üteme meghaladja a hőveszteség ütemét.

A vizsgálati eljárás hasznos mint előzetes szűrővizsgálat szilárd anyagoknál. Tekintettel a szilárd anyagok gyulladásának és égésének bonyolult természetére, e vizsgálati módszernek megfelelően meghatározott öngyulladási hőmérsékletet csak összehasonlítási célokra szabad használni.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az e módszerrel kapott öngyulladási hőmérséklet az a ^{o}C-ban kifejezett minimális környezeti hőmérséklet, amelynél meghatározott körülmények között meghatározott mennyiségű anyag meggyullad.

1.3 REFERENCIAANYAG

Nincs.

1.4 A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Meghatározott térfogatú vizsgált anyagot szobahőmérsékletű kemencébe helyeznek; majd regisztrálják a minta közepére vonatkozó hőmérséklet/idő görbét, miközben a kemence hőmérsékletét 0,5 ^{o}C/-perc sebességgel 400 ^{o}C-ra vagy olvadáspontra emelik, amennyiben az kisebb 400 ^{o}C-nál. E vizsgálat alkalmazásában öngyulladási hőmérséklet a kemencének az a hőmérséklete, amelynél a minta hőmérséklete önmelegedéssel eléri a 400 ^{o}C-t.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincs.

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Készülék**

1.6.1.1. *Kemence*

Természetes levegőkeringtetéssel és robbanás elleni szeleppel ellátott, hőmérsékletprogramozott laboratóriumi kemence (körülbelül 2 liter térfogatú). A lehetséges robbanásveszély elkerülése érdekében nem szabad engedni, hogy bármilyen gáz-halmazállapotú bomlástermék kapcsolatba lépjen az elektromos fűtőelemekkel.

▼B

1.6.1.2. *Drótháló kocka*

Az 1. ábrán látható mintának megfelelő 0,045 mm-es nyílásokkal rendelkező, rozsdamentes acél dróthálót kell kivágni. A hálót össze kell hajtogatni nyitott tetejű kockává, és huzallal rögzíteni kell.

1.6.1.3. *Termoelemek*

Alkalmas termoelemek.

1.6.1.4. *Regisztráló készülék*

Bármely, 0-tól 600 °C-ig vagy ennek megfelelő feszültségre kalibrált, kétcsatornás regisztráló készülék.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

Az anyagokat az átvételüknek megfelelő állapotukban vizsgálják.

1.6.3. **A vizsgálat végrehajtása**

A kockát megtöltik a vizsgált anyaggal, és gyenge ütögetéssel tömörítik, majd további anyagot adnak hozzá, amíg teljesen meg nem telik a kocka. A kockát ezután szobahőmérsékleten felfüggesztik a kemence közepén. Az egyik termoelemet a kocka közepére helyezik, a másikat a kocka és a kemence fala közé a kemence hőmérsékletének regisztrálására.

A kemence és a minta hőmérsékletét folyamatosan regisztrálják, miközben 0,5 °C/perc sebességgel 400 °C-ra, vagy ha az olvadási pont ennél alacsonyabb, akkor az olvadási pontra növelik a kemence hőmérsékletét.

Amennyiben az anyag meggyullad, a mintában lévő termoelem nagyon hirtelen hőmérsékletnövekedést fog mutatni a kemence hőmérsékletéhez képest.

2. **ADATOK**

Az értékeléshez lényeges a kemencének az a hőmérséklete, amelynél a minta hőmérséklete önmelegedéssel eléri a 400 °C-ot (lásd a 2. ábrát).

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag leírását,

— a mérés eredményeit, a hőmérséklet/idő görbét is ideértve,

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést.

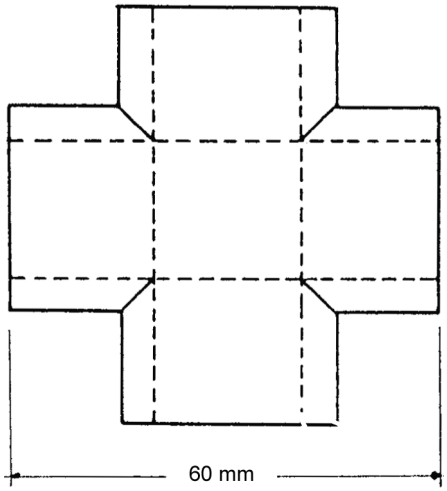
4. **SZAKIRODALOM**

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

▼B

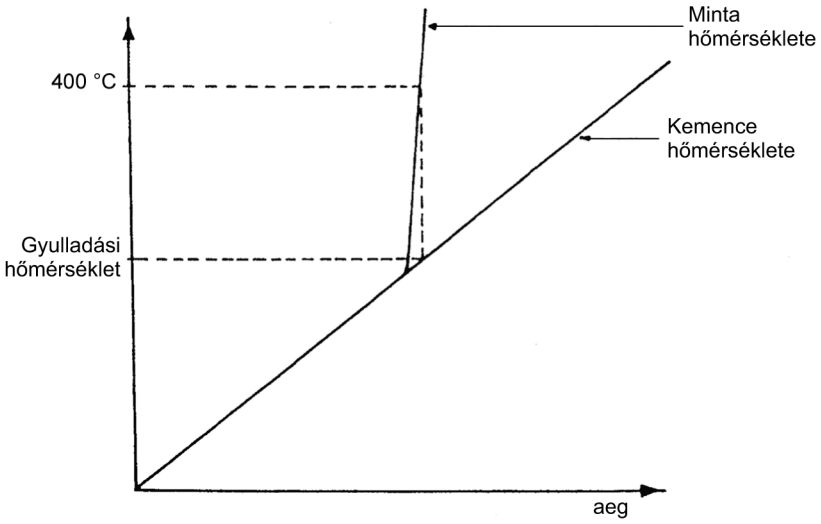
1. ábra

20 mm-es vizsgálati kocka sémája



2. ábra

Jellegzetes hőmérséklet/idő görbe



▼B

A.17. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (SZILÁRD ANYAGOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat végrehajtásához hasznos előzetes információkat szerezni az anyag minden lehetséges robbanási tulajdonságáról.

Ez a vizsgálat nem alkalmazható folyadékokhoz, gázokhoz, robbanásveszélyes vagy tűzveszélyes anyagokhoz vagy szerves peroxidokhoz.

A vizsgálatot nem kell végrehajtani, ha a szerkezeti képlet vizsgálata minden kétség nélkül kimutatja, hogy az anyag nem képes exoterm reakcióba lépni éghető anyaggal.

Előzetes vizsgálatot kell végrehajtani annak megállapítására, hogy különleges óvintézkedésekkel kell-e végrehajtani a vizsgálatot.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Égési idő: az 1.6. pontban leírt eljárást követve, az a másodpercben meghatározott reakcióidő, amely alatt a reakciózónában az égés az anyagnyaláb mentén szétterjed.

Égési sebesség: milliméter/szekundumban kifejezve.

Maximális égési sebesség: 10–90 tömegszázalékban oxidálószert tartalmazó keverékekkel kapott égési sebességek közül a legnagyobb érték.

1.3. REFERENCIAANYAG

A vizsgálathoz és az előzetes vizsgálathoz referenciaanyagként (analitikai tisztaságú) bárium-nitrátot használnak.

A referenciakeverék az a bárium-nitrátnak cellulózporral alkotott, az 1.6. pontnak megfelelően elkészített (rendszerint 60 tömegszázalékos bárium-nitrátot tartalmazó) keveréke, amelynek maximális az égési sebessége.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Biztonsági okokból előzetes vizsgálatot hajtanak végre. Nincs szükség további vizsgálatra, amennyiben az előzetes vizsgálat világosan jelzi, hogy a vizsgált anyagnak oxidáló tulajdonságai vannak. Ellenkező esetben az anyagot teljes vizsgálatnak kell alávetni.

A teljes vizsgálat során a vizsgált anyag és valamilyen meghatározott éghető anyag különböző arányú keverékét kell alkalmazni. Ezután minden egyes keverékből kialakítanak egy halmot, és a halmot az egyik végén meggyújtják. A meghatározott maximális égési sebességet összehasonlítják a referenciakeverék maximális égési sebességével.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Amennyiben szükséges, az őrlés és keverés bármilyen módszere megfelel, feltéve hogy a hat különálló vizsgálatban a maximális égési sebesség 10 %-nál nem nagyobb mértékben tér el a számtani középértéktől.

▼B

1.6. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészítés**

1.6.1.1. *A vizsgált anyag*

A vizsgált anyagot < 0,125 mm-es részecskeméretűre őrlik a következő eljárás segítségével: a vizsgált anyag szitálása, a visszamaradó anyag őrlése, az eljárás megismétlése, amíg a teljes vizsgált anyag keresztül nem halad a szitán.

A minőségi követelménynek megfelelő bármilyen őrlési és szitálási módszer használható.

A keverék előkészítése előtt az anyagot 105 °C hőmérsékleten súlyállandóságig szárítják. Amennyiben a vizsgált anyag bomlási hőmérséklete 105 °C alatt van, az anyagot alacsonyabb hőmérsékleten kell megszárítani.

1.6.1.2. *Éghető anyag*

Éghető anyagként por alakú cellulózt használnak. A cellulóznak vékonyfilm- vagy oszlopkromatográfiához használt típusúnak kell lennie. A szálhosszúság több mint 85 %-a 0,020 és 0,075 mm között legyen. A cellulózport egy 0,125 mm nyílásméretű szitán áttörik. Ugyanabból a gyártási sorozatból származó cellulózt kell használni a teljes vizsgálat során.

A keverék előkészítése előtt a porított cellulózt 105 °C-on súlyállandóságig szárítják.

Amennyiben falisztet használnak az előzetes vizsgálatnál, akkor puha falisztet kell készíteni, amely átmegy egy 1,6 mm nyílásméretű szitán, ezt alaposan meg kell keverni, majd 105 °C hőmérsékleten 4 órán át kell szárítani 25 mm-nél nem vastagabb rétegben. Ezután le kell hűteni, és amíg szükséges – legfeljebb a szárítástól számított 24 órán keresztül – légmentes tartályban kell tárolni, amelyet a lehető legjobban meg kell tölteni.

1.6.1.3. *Gyújtóforrás*

Gyújtóforrásként gázégőből (minimális átmérője 5 mm) kiáramló forró lángot kell használni. Amennyiben más gyújtóforrást használnak (például inert légkörben végrehajtott vizsgálatkor), a jelentésben meg kell adni annak leírását és indoklását.

1.6.2. **A vizsgálat végrehajtása**

Megjegyzés:

Az oxidálószereknek cellulózzal vagy falisztel alkotott keverékeit robbanásveszélyesnek kell tekinteni, és kellő gondossággal kell kezelni.

1.6.2.1. *Előzetes vizsgálat*

A szárított anyagot alaposan összekeverik szárított cellulózzal vagy falisztel 2 vizsgáltanyag-tömegrész – 1 cellulóz- vagy faliszt-tömegrész arányban, és a keveréket kis, kúp alakú, 3,5 cm (az alap átmérője) × 2,5 cm-es (magasság) halomba formálják egy kúp alakú forma (például lezárt szárú laboratóriumi üvegtölcsér) tömörítés nélküli megtöltésével.

▼B

A halmot egy hideg, nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető-képességű alaplemezre helyezik. A vizsgálatot az 1.6.2.2. pontnak megfelelően füstszekrényben kell végrehajtani.

A gyújtóforrást érintkezésbe hozzák a kúppal. Megfigyelik és regisztrálják az ennek eredményeként létrejövő reakció erőteljességét és időtartamát.

Az anyagot oxidálónak kell tekinteni, ha erőteljes a reakció.

Minden esetben, ahol kételyek merülnek fel az eredménnyel kapcsolatban, végre kell hajtani az alábbiakban leírt teljes vizsgálatsorozatot.

1.6.2.2. *Vizsgálatsorozat*

10 %-os intervallumokban, 10–90 tömegszázalékban oxidálószert tartalmazó oxidálószer/cellulózkeverékeket készítenek. Határesetekhez közbenső oxidáló szer/cellulózkeverékeket kell használni azért, hogy pontosabb legyen a kapott maximális égési sebesség.

A halmot forma segítségével alakítják ki. A háromszög keresztmetszetű forma fémből készült, hossza 250 mm, belső magassága 10 mm és belső szélessége 20 mm. A forma mindkét oldalán hosszirányban két fémlemezt szereltek fel oldallapként, amelyek 2 mm-rel túlnyúlnak a háromszög alakú keresztmetszet felső szélén (lásd az ábrát). Ezt az eszközt lazán megtöltik a szükségesnél kissé több keverékkel. Miután a formát egyszer 2 cm-es magasságból szilárd felületre ejtették, a megmaradó felesleges anyagot lekaparják egy ferdén elhelyezett lappal. Az oldallapokat eltávolítják, és a megmaradt por felületét kisimítják egy henger segítségével. Ezután a forma tetejére nem éghető, nem porózus és alacsony hővezetőképességű alaplemezt helyeznek, a készüléket megfordítják, és eltávolítják a formát.

A halmot a füstszekrény huzatába helyezik.

A levegő sebességének elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megakadályozza az égéstermékek laboratóriumba szökését, és azt a vizsgálat során megváltoztatni nem szabad. A berendezés köré huzatellenzőt kell szerelni.

A cellulóz és néhány vizsgált anyag vízfelvevő képessége miatt a vizsgálatot a lehető leggyorsabban kell végrehajtani.

Meggyújtják a halom egyik végét úgy, hogy hozzáérintik a lángot.

A reakcióidőt 200 mm-es távolság mentén mérik, miután a reakciózóna már 30 mm távolságra terjedt.

A vizsgálatot a referenciaanyaggal és a vizsgált anyagnak a cellulózzal alkotott keverékei mindegyikével legalább egyszer végrehajtják.

Amennyiben megállapítják, hogy a maximális égési sebesség lényegesen nagyobb, mint amelyet a referenciakeverékből kaptak, a vizsgálat megszakítható; egyébként a vizsgálatot ötször meg kell ismételni a legnagyobb égési sebességet adó három keverék mindegyikével.

▼B

Amennyiben az eredmény gyaníthatóan hamis pozitív, a vizsgálatot meg kell ismételni cellulóz helyett ehhez hasonló részecskeméretű inert anyag, például kovaföld segítségével. Más megoldásként a legnagyobb égési sebességű vizsgált anyag/cellulózkeveréket újra meg kell vizsgálni inert légkörben (< 2 térfogatszázalék oxigéntartalom).

2. **ADATOK**

Biztonsági okokból a maximális égési sebességet – és nem a középértéket – kell a vizsgált anyag jellemző oxidáló tulajdonságának tekinteni.

Az értékeléshez adott keverék hat vizsgálatából álló vizsgálatsorozatán belül az égési sebesség legnagyobb értéke a fontos.

Fel kell rajzolni minden egyes keverék legnagyobb égési sebességének görbéjét az oxidálószer koncentrációja függvényében. A görbéből kell megállapítani a maximális égési sebességet.

A maximális égési sebességű keverék vizsgálatából kapott hat mért égési sebesség értékének nem szabad 10 %-nál nagyobb mértékben eltérnie a számtani középértéktől; ellenkező esetben javítani kell az őrlési és keverési módszereken.

Össze kell hasonlítani a kapott maximális égési sebességet a referenciaanyag maximális égési sebességével (lásd az 1.3. pontot).

Amennyiben a vizsgálatokat inert légkörben hajtják végre, a maximális reakciósebességet összehasonlítják a referenciakeverék inert légkörben kapott maximális reakciósebességével.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag azonosságát, összetételét, tisztaságát, nedvességtartalmát stb.,

— a vizsgált minta minden kezelését (például őrlés, szárítás, …),

— a vizsgálatok során használt gyújtóforrást,

— a mérések eredményeit,

— a reakció módját (például felvillanással égés a felületen, a teljes tömegen keresztüli égés, az égéstermékekre vonatkozó minden információ, …),

— az eredmények értelmezése szempontjából lényeges minden további megjegyzést, ilyen például a hevesség (lángolás, szikrázás, füstölgés, lassú izzás stb.) leírása, és mind a vizsgált, mind a referenciaanyag előzetes biztonsági/szűrési vizsgálata során kapott közelítő időtartam,

— inert anyaggal végrehajtott vizsgálatokból kapott eredményeket, amennyiben van ilyen,

— inert légkörben végrehajtott vizsgálatokból kapott eredményeket, amennyiben van ilyen.

▼B

3.2. AZ EREDMÉNY ÉRTELMEZÉSE

Valamely anyagot oxidáló anyagnak kell tekinteni, amikor:

a) az előzetes vizsgálat során erőteljes reakció jön létre;

b) a teljes vizsgálat során a vizsgált keverékek maximális égési sebessége nagyobb vagy egyenlő, mint a cellulóz és a bárium-nitrát alkotta referenciakeverék maximális égési sebessége.

A hamis pozitív eredmény elkerülése érdekében az inert anyaggal kevert anyag vizsgálatakor és/vagy inert légkörben végrehajtott vizsgálatkor kapott eredményeket figyelembe kell venni az eredmények értelmezésekor.

4. **SZAKIRODALOM**

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

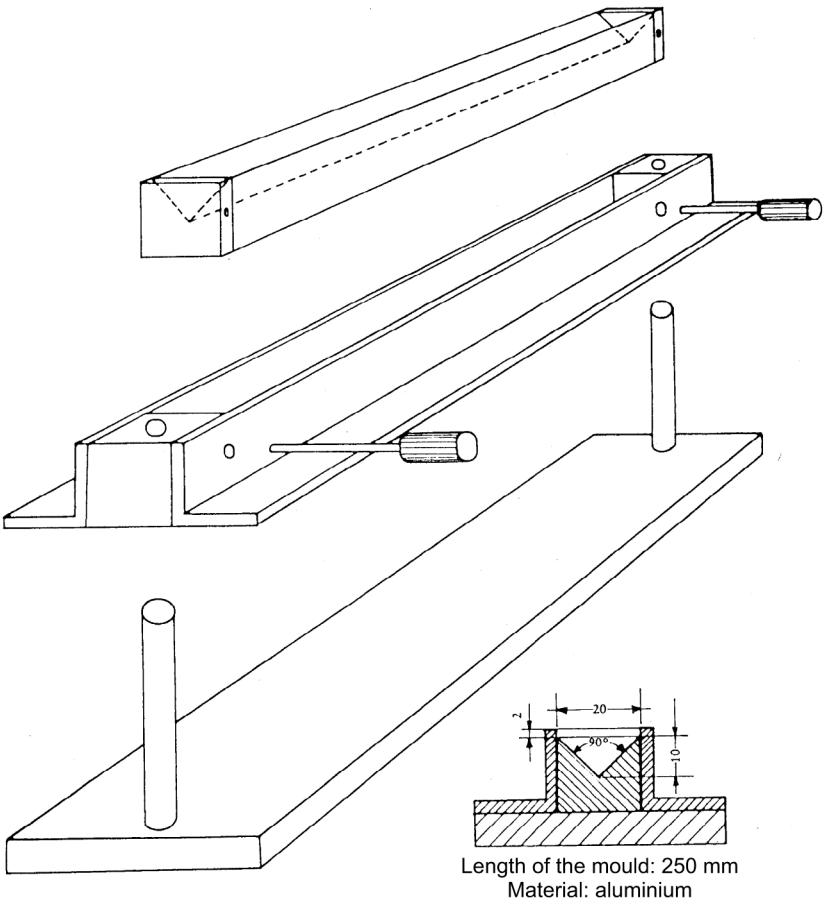
▼B

Függelék

Ábra

Forma és tartozékok a halom elkészítéséhez

(Minden méret mm-ben van megadva)



▼B

A.18. **A POLIMEREK SZÁMÁTLAG SZERINTI MOLEKULATÖMEGE ÉS MOLEKULATÖMEG-ELOSZLÁSA**

1. **MÓDSZER**

E gél permeációs kromatográfiás módszer megfelel az OECD TG 118-nak (1996). Az alapelvek és további technikai információk az 1. hivatkozásban találhatók.

1.1. BEVEZETÉS

Mivel a polimerek tulajdonságai olyan változatosak, lehetetlen egyetlen módszert leírni, pontosan felsorolva az elválasztás és kiértékelés feltételeit, amelyek lefednek minden, a polimerek elválasztásánál előforduló eshetőséget és különlegességet. Különösen a komplexpolimer rendszereknél gyakran nem használható a gél permeációs kromatográfia (GPC). Amennyiben a GPC nem használható, a molekulatömeg más módszerekkel határozható meg (lásd a függeléket). Ilyen esetekben meg kell adni a használt módszer valamennyi részletét és igazolását.

A leírt módszer az 55672 DIN szabványon alapul (1). Ebben a DIN szabványban található részletes információ a kísérletek kivitelezéséről és az adatkiértékelésről. Amennyiben a kísérleti körülmények módosítása szükséges, a változtatásokat igazolni kell. Más szabvány is használható, amennyiben teljes körű hivatkozással rendelkezik. A leírt módszer kalibrációra ismert polidiszperzitású polisztirol mintákat használ, és esetleg módosítani kell, hogy megfelelő legyen bizonyos polimereknél, pl.: vízben oldható és hosszú láncú elágazó polimerek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az M_n számátlag molekulatömeget és az M_w tömegátlag molekulatömeget az alábbi egyenletekkel lehet meghatározni:

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

ahol

H_i a detektorjel szintje az alapvonaltól V_i retenciós térfogatra,

M_i a polimerfrakció molekulatömege V_i retenciós térfogatnál, és

n az adatpontok száma.

A molekulatömeg eloszlásának szélességét, ami a rendszer diszperzitásának mértéke, az M_w/M_n arány adja meg.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Kalibrációt kell készíteni, mert a GPC relatív módszer. Keskeny eloszlású, lineárisan felépített, ismert M_n és M_w átlagos molekulatömegű, és ismert molekulatömeg eloszlású polisztirol standardokat használnak e célra. Az ismeretlen minta molekulatömegének meghatározására a kalibrációs görbe csak akkor használható, amennyiben a minta és a standardok elválasztásának körülményei azonos módon lettek kiválasztva.

A molekulatömeg és az elúciós térfogat között meghatározott kapcsolat csak az adott kísérlet sajátos körülményei között érvényes. A körülmények magukban foglalják mindenek felett a hőmérsékletet, az oldószert (vagy oldószerkeveréket), a kromatográfiás feltételeket és az elválasztó oszlopot vagy oszlopokat.

A minta így meghatározott molekulatömegei relatív értékek és „polisztirol ekvivalens molekulatömeg”-ként írták le őket. Ez azt jelenti, hogy a minta és a standard szerkezeti és kémiai különbségeitől függően a molekulatömegek kisebb-nagyobb mértékben eltérhetnek az abszolút értéktől. Amennyiben más standardokat használtak, pl. polietilén-glikol, polietilén-oxid, polimetil-metakrilát, poliakrilsav, azt meg kell indokolni.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A minta molekulatömeg-eloszlása és az átlagos molekulatömegek (M_n, M_w) GPC-vel meghatározhatók. A GPC a folyékony kromatográfia speciális típusa, aminél a minta az egyes alkotók hidrodinamikai térfogata szerint választódik el (2).

Az elválasztás a minta porózus anyaggal, tipikusan szerves géllel töltött oszlopon való áthaladásakor valósul meg. Kis molekulák be tudnak hatolni a pórusokba, a nagy molekulák nem. A nagy molekulák útja ezért rövidebb, és elsőként eluálódnak. A közepes méretű molekulák a pórusok egy részébe behatolnak, és később eluálódnak. A legkisebb, a gél pórusainál kisebb átlagos hidrodinamikai sugarú molekulák minden pórusba be tudnak hatolni. Ezek eluálódnak utoljára.

Ideális helyzetben az elválasztást teljesen a molekulafajták mérete szabja meg, de a gyakorlatban nehéz elkerülni valamely abszorpciós hatás közrehatását. A nem egyenletes oszlopfeltöltés és a holttérfogat ronthatja a helyzetet (2).

A detektálás megvalósul pl. a törésmutatóval vagy az UV-elnyeléssel, és egyszerű eloszlási görbét eredményez. Azonban ahhoz, hogy a tényleges molekulatömeg-értékeket a görbéhez lehessen rendelni, az oszlopot kalibrálni kell ismert molekulatömegű és ideális esetben nagyjából hasonló szerkezetű polimerek, pl. különböző polisztirol standardok futtatásával. Tipikusan Gauss-görbe kapható, néha a kis molekulatömeg oldalán kis farokkal eltorzítva, a függőleges tengely a különböző eluált molekulafajták tömeg szerinti mennyiségét, a vízszintes tengely a molekulatömeg logaritmusát mutatja.

▼B

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az elúciós térfogat reprodukálhatósága (relatív standard deviáció, RSD) 0,3 %-nál jobb kell, hogy legyen. Az analízis megkövetelt reprodukálhatóságát belső standarddal való korrekcióval kell biztosítani, amennyiben a kromatogramot az idő függvényében értékelik ki, és nem felel meg a fent említett követelménynek (1). A polidiszperzitás függ a standardok molekulatömegétől. Polisztirol standardoknál a tipikus értékek:

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

(M_p a standard molekulatömege a csúcsmaximumnál)

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **A standard polisztirol oldatok készítése**

A polisztirol standardokat óvatosan keverve oldják fel a választott eluensben. A gyártó ajánlásait számításba kell venni az oldatok készítésénél.

A választott standardok koncentrációja különböző faktoroktól függ, pl. injektált térfogat, az oldat viszkozitása és az elemző detektor érzékenysége. A túltöltés elkerülése érdekében a maximális injektált térfogatot az oszlop hosszához kell igazítani. 30 cm × 7,8 mm-es oszlopú GPC-vel történő analitikai elválasztásoknál a jellemző injektált térfogat rendesen 40 és 100 µl között van. Nagyobb térfogat is elképzelhető, de nem lépheti túl a 250 µl-t. Az oszlop aktuális kalibrációja előtt meg kell határozni az injektált térfogat és a koncentráció optimális arányát.

1.6.2. **A mintaoldat elkészítése**

Elvben a mintaoldatok elkészítésére is ugyanezek a követelmények érvényesek. A mintát megfelelő oldószerben pl. tetrahidro-furán (THF) óvatos rázással oldják fel. Semmilyen körülmények között sem szabad ultrahangos fürdőben feloldani. Amennyiben szükséges, az oldat tisztítható 0,2–2 µm-es pórusméretű membránszűrővel.

A feloldatlan részecskék jelenlétét, amik nagy molekulatömegű fajták miatt fordulhatnak elő, fel kell jegyezni a végleges jelentésben. A feloldott részecskék tömegszázalékának meghatározására megfelelő módszert kell alkalmazni. Az oldatot 24 órán belül fel kell használni.

1.6.3. **Készülék**

— oldószertartály,

— gáztalanító (szükség szerint),

— pumpa,

▼B

— rezgéscsillapító (szükség szerint),

— injektáló rendszer,

— kromatográfiás oszlopok,

— detektor,

— áramlásmérő (szükség szerint),

— adat rögzítő-feldolgozó,

— hulladéktároló.

Biztosítani kell, hogy a GPC rendszer inert legyen a használt oldószerekkel szemben (pl. THF oldószernél acélkapillárisok használata).

1.6.4. **Injektáló és oldószerszállító rendszer**

A minta oldatának meghatározott térfogatát automataadagolóval vagy kézzel töltik az oszlopra egy pontosan meghatározott zónába. Amennyiben kézzel végzik, a fecskendő dugattyújának túl gyors benyomása vagy kihúzása a megfigyelt molekulatömeg-eloszlásban változásokat okozhat. Az oldószert szállító rendszernek, amennyire csak lehet, lüktetésmentesnek kell lenni, ideálisan rezgéscsillapítót magában foglalva. Az áramlási sebesség 1 ml/perc nagyságrendű.

1.6.5. **Oszlop**

A mintától függően a polimert egy egyszerű, vagy több, sorba kötött oszlopot használva jellemeznek. Számos meghatározott tulajdonságokkal (pl. pórusméret, szelektivitási határérték) rendelkező porózus oszlopanyag elérhető a kereskedelemben. Az elválasztó gél vagy az oszlophossz megválasztása a minta tulajdonságaitól (pl. hidrodinamikai térfogatok, molekulatömeg-eloszlás) és az elválasztás sajátos körülményeitől, pl. oldószer, hőmérséklet és áramlási sebesség is függ (1) (2) (3).

1.6.6. **Elméleti tányérszám**

Az elválasztásra használt oszlopot vagy oszlopkombinációt az elméleti tányérszámmal kell jellemezni. A THF eluáló oldószer esetében ez magában foglalja etil-benzol vagy más, megfelelő nem poláris oldat töltését ismert hosszúságú oszlopra. Az elméleti tányérszámot a következő egyenlet adja meg:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{vagy} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

ahol:

N = az elméleti tányérszám

V_e = az elúciós térfogat a csúcsmaximumnál

▼B

W = az alapvonal csúcsszélesség

$W_{1/2}$ = a csúcsszélesség félmagasságnál.

1.6.7. **Az elválasztás hatékonysága**

Az elméleti tányérszámon kívül, ami a sávszélességet meghatározó mennyiség, az elválasztás hatékonyságának is van szerepe, amit a kalibrációs görbe meredeksége határoz meg. Egy oszlop elválasztási hatékonyságát a következő kapcsolat adja meg:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{az oszlop keresztmet szetének t erülete}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

ahol:

$V_{e,\,Mx}$ = az M_x molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata

$V_{e,(10.Mx)}$ = a 10-szer nagyobb molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata.

A rendszer felbontása általában így definiált:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

Ahol

V_{e1}, V_{e2} = két polisztirol standard elúciós térfogata a csúcsmaximumnál

W_1, W_2 = az alapvonal csúcsszélességei

M_1, M_2 = a molekulatömegek a csúcsmaximumnál (10-es faktorral térjenek el).

Az oszloprendszerre az R-értéknek nagyobbnak kell lennie mint 1,7 (4).

1.6.8. **Oldószerek**

Minden oldószernek nagy tisztaságúnak kell lennie (THF-ből 99,5 %-os tisztaságút használnak). Az oldószertartálynak (inertgáz-atmoszférában, amennyiben szükséges) elég nagynak kell lenni az oszlop kalibrálásához és néhány mintaanalízishez. Az oldószert gáztalanítani kell, mielőtt a pumpával az oszlopra juttatják.

1.6.9. **Hőmérséklet-szabályozás**

A kritikus belső komponensek (injektáló hurok, oszlopok, detektor, csövezés) hőmérsékletét állandó és az oldószerválasztásnak megfelelő értéken kell tartani.

▼B

1.6.10. **Detektor**

A detektor célja az oszlopról eluált minta koncentrációjának mennyiségi rögzítése. A csúcsok szükségtelen szélesedésének elkerülésére a detektorcella követta térfogatának a lehető legkisebbnek kell lenni. Nem lehet nagyobb 10 μl-nél, kivéve a fényszórási és viszkozitásdetektoroknál. A detektálásra differenciális törésmutató-mérést szokás használni. Azonban, ha a minta vagy az elúciós oldószer sajátos tulajdonságai megkövetelik, más detektortípusok is használhatók, pl. UV/látható fény, IR, viszkozitásdetektor stb.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉS**

2.1. ADATOK

A DIN szabványra (1) kell hivatkozni a részletes értékelési követelménynél éppúgy, mint az adatgyűjtéssel és -feldolgozással kapcsolatos követelményeknél.

Minden mintánál két független kísérletet kell végezni. Külön-külön kell azokat elemezni.

M_n-t, M_w-t, M_w/M_n-t és M_p-t meg kell adni minden mérésnél. Fontos egyértelműen jelezni, hogy a mért értékek a használt standard molekulatömegével ekvivalens relatív értékek.

A retenciós térfogatok, vagy a retenciós idők (lehetőleg belső standardot használva korrigáltak) meghatározása után a log M_p értékek (M_p a kalibráló standard csúcsmaximuma) lesznek ábrázolva egyikük függvényében. Molekulatömeg-dekádonként legalább két kalibrációs pont szükséges, és legalább öt mérési pont kell a teljes görbéhez, aminek le kell fedni a minta becsült molekulatömegét. A kalibrációs görbe kis molekulatömegű végpontját n-hexil-benzol, vagy más megfelelő nem poláris oldott anyag definiálja. A számátlag és a tömegátlag molekulatömeget általában elektronikus adatfeldolgozással, az 1.2. pont képletei alapján határozzák meg. A kézi digitalizálás esetében az ASTM D 3536-91 használható (3).

Az eloszlási görbét táblázat vagy ábra (differenciális frekvencia, vagy összegszázalék a log M függvényében) formájában kell megadni. Grafikus ábrázolásnál egy molekulatömeg-dekádnak általában kb. 4 cm szélesnek kell lennie, a csúcsmaximumnak pedig kb. 8 cm magasnak kell lennie. Integrál eloszlási görbék esetében az ordinátában a különbségnek 0 és 100 % között kb. 10 cm-esnek kell lenni.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

2.2.1. **Vizsgált anyag**

— elérhető információk a vizsgált anyagról (azonosság, adalékanyag, szennyező anyag),

▼B

— a mintakezelés, megfigyelések, problémák leírása.

2.2.2. **Műszerezettség**

— eluens tartály, inert gáz, az eluens gáztalanítása, az eluens összetétele, szennyezők,

— pumpa, rezgéscsillapító, injektáló rendszer,

— elválasztó oszlopok (a gyártó, az oszlop jellemzőiről minden információ, mint pórusméret, az elválasztó anyag fajtája stb., a használt oszlopok száma, hossza és elrendezése),

— az oszlop (vagy oszlopkombináció) elméleti tányérszáma, elválasztás hatékonysága (a rendszer felbontása),

— információ a csúcsok szimmetriájáról,

— oszlophőmérséklet, hőmérséklet-szabályozás módja,

— detektor (mérési elv, típus, küvettatérfogat),

— áramlásmérő, amennyiben használva lett (gyártó, mérési elv),

— adatrögzítő és -feldolgozó rendszer (hardver és szoftver).

2.2.3. **A rendszer kalibrálása**

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt módszer részletes leírása,

— információk a módszer minőségi követelményeiről (pl. korrelációs együttható, eltérés négyzetösszege stb.),

— információk minden, a kísérleti eljárás és az adatok kiértékelése és feldolgozása során alkalmazott extrapolációról, feltételezésről és közelítésről,

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt minden mérést dokumentálni kell egy táblázatban, amely minden kalibrációs pont esetében az alábbiakat tartalmazza:

  — a minta neve,

  — a minta gyártója,

  — az M_p, M_n, M_w, és M_w/M_n standardok jellemző értékei, ahogy azokat a gyártó rendelkezésre bocsátotta, vagy az azt követő mérésekből következnek, a meghatározási módszer részleteivel együtt,

  — injektálási térfogat és koncentráció,

▼B

— a kalibrációhoz használt M_p érték,

— a csúcsmaximumoknál mért elúciós térfogat, vagy korrigált retenciós idő,

— a csúcsmaximumnál számított M_p,

— a számított M_p és a kalibrációs érték százalékos hibája.

2.2.4. **Kiértékelés:**

— időn alapuló kiértékelés: a megkövetelt reprodukálhatóság biztosítására használt módszerek (korrekciós módszer, belső standard stb.),

— információ arról, hogy a kiértékelés az elúciós térfogat vagy a retenciós idő alapján történt,

— információ a kiértékelés korlátairól, amennyiben nem elemeztek egy csúcsot teljesen,

— a kiegyenlítési módszerek leírása, amennyiben használva lettek,

— minta-előállítási és -előkezelési eljárások,

— feloldatlan részecskék jelenléte, amennyiben voltak,

— injektálási térfogat (μl) és injektálási koncentráció (mg/ml),

— az ideális GPC profiltól való eltéréshez vezető hatásokat jelző megfigyelések,

— a vizsgálati eljárások minden módosításának részletes leírása,

— a hibatartományok részletei,

— az eredmények értelmezésére vonatkozó bármely egyéb információ és megfigyelés.

3. **IRODALOMJEGYZÉK**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, 1. rész.

(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 Polistyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Függelék

Példák polimerek számátlag molekulatömege (M_n) meghatározásának más módszereire

M_n meghatározására a gél permeációs kromatográfia (GPC) az előnyben részesített módszer, különösen, ha elérhető a polimeréhez hasonló szerkezetű standardkészlet. Azonban, ha gyakorlati nehézségekbe ütközik a GPC használata, vagy amennyiben számítani lehet arra, hogy nincs megfelelő érték az M_n számára (és ami igazolást igényel), alternatív módszerek alkalmazhatók, úgymint:

1. **A kolligatív tulajdonságok felhasználása**

1.1. Ebullioszkópia/krioszkópia:

az oldószer polimer hozzáadásával kiváltott forráspont-emelkedésének (ebullioszkópia), vagy fagypont-csökkenésének (krioszkópia) mérése. A módszer azon a tényen alapul, hogy az oldott polimer hatása a folyadék forrás/fagypontjára a polimer molekulatömegétől függ (1) (2).

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\,000$.

1.2. Gőznyomás csökkentése:

a kiválasztott referenciafolyadék gőznyomásának mérése ismert mennyiségű polimer hozzáadása előtt és után (1) (2).

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\,000$ (elméletben; gyakorlatban azonban korlátozott értékű).

1.3. Membrán ozmometria:

az ozmózis elvén alapul, azaz, hogy az oldószer-molekulák hajlamosak híg oldatból a tömény oldatba átmenni egy félig áteresztő membránon keresztül, hogy egyensúly jöjjön létre. A vizsgálatnál a híg oldat nulla koncentrációjú, a tömény oldat pedig a polimert tartalmazza. Az oldószer átvándorlása a membránon keresztül nyomáskülönbséget okoz, amely az oldat koncentrációjától és a polimer molekulatömegétől függ (1) (3) (4).

Alkalmazhatóság: M_n20 000–200 000 között.

1.4. Gőzfázis ozmometria:

tiszta oldószer aeroszol párolgási sebességének összehasonlítása legalább három eltérő koncentrációban polimert tartalmazó aeroszolhoz képest (1) (5) (6).

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Végcsoport analízis**

A módszer alkalmazásához a polimer általános szerkezetének és a láncot lezáró végcsoportok szerkezetének (aminek a fő váztól pl. NMR-rel vagy titrálással/származékképzéssel megkülönböztethetőnek kell lenni) ismerete szükséges. A polimerben jelen lévő végcsoportok molekulakoncentrációjának meghatározása a molekulatömeg értékéhez vezethet (7) (8) (9).

Alkalmazhatóság: M_n50 000-ig (csökkenő megbízhatósággal).

3. **Irodalomjegyzék**

(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. Copper 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: Determination 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 Weighs, Part I, P. E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, pp. 2139–2146.

▼B

A.19. POLIMEREK KIS MOLEKULATÖMEG-TARTALMA

1. MÓDSZER

Ez a gél permeációs kromatográfiás módszer az OECD TG 119-nek megfelelője (1996). Az alapelvek és további technikai információk az 1. hivatkozásban találhatók.

1.1. BEVEZETÉS

Mivel a polimerek tulajdonságai olyan változatosak, lehetetlen egyetlen módszert leírni, pontosan felsorolva az elválasztás és kiértékelés feltételeit, amelyek lefednek minden, a polimerek elválasztásánál előforduló eshetőséget és különlegességet. Különösen a komplexpolimer rendszereknél gyakran nem használható a gél permeációs kromatográfia (GPC). Amennyiben a GPC nem használható, a molekulatömeg más módszerekkel határozható meg (lásd a függeléket). Ilyen esetekben meg kell adni a használt módszer valamennyi részletét és igazolását.

A leírt módszer az 55672 DIN szabványon alapul (1). Ebben a DIN szabványban található részletes információ a kísérletek kivitelezéséről és az adatkiértékelésről. Amennyiben a kísérleti körülmények módosítása szükséges, a változtatásokat igazolni kell. Más szabvány is használható, ha teljes körű hivatkozással rendelkezik. A leírt módszer ismert polidiszperzitású polisztirol kalibrációs mintákat használ, és esetleg módosítani kell, hogy megfelelő legyen bizonyos polimereknél, pl. vízben oldható és hosszú láncú elágazó polimerek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A kis molekulatömeget önkényesen 1 000 dalton alattiként definiálták.

Az M_n számátlag molekulatömeget és az M_w tömegátlag molekulatömeget a következő egyenletekkel lehet meghatározni:

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

ahol:

H_I = a detektorjel szintje az alapvonaltól V_i retenciós térfogatra

M_i = a polimerfrakció molekulatömege V_i retenciós térfogatnál, és n az adatpontok száma.

A molekulatömeg eloszlásának szélességét, ami a rendszer diszperzitásának mértéke, az M_w/M_n arány adja meg.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Kalibrációt kell készíteni, mert a GPC relatív módszer. Keskeny eloszlású, lineárisan felépített, ismert M_n és M_w átlagos molekulatömegű, és ismert molekulatömeg eloszlású polisztirol standardokat használnak e célra. Az ismeretlen minta molekulatömegének meghatározására a kalibrációs görbe csak akkor használható, amennyiben a minta és a standardok elválasztásának körülményei azonos módon lettek kiválasztva.

A molekulatömeg és az elúciós térfogat között meghatározott kapcsolat csak az adott kísérlet sajátos körülményei között érvényes. A körülmények magukban foglalják mindenek felett a hőmérsékletet, az oldószert (vagy oldószerkeveréket), a kromatográfiás feltételeket és az elválasztó oszlopot vagy oszlopokat.

A minta így meghatározott molekulatömegei relatív értékek és „polisztirol ekvivalens molekulatömeg”-ként írták le őket. Ez azt jelenti, hogy a minta és a standard szerkezeti és kémiai különbségeitől függően a molekulatömegek kisebb-nagyobb mértékben eltérhetnek az abszolút értéktől. Amennyiben más standardokat használtak, pl. polietilén-glikol, polietilén-oxid, polimetil-metakrilát, poliakrilsav, azt meg kell indokolni.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A minta molekulatömeg-eloszlása és az átlagos molekulatömegek (M_n, M_w) GPC-vel meghatározhatók. A GPC a folyékony kromatográfia speciális típusa, aminél a minta az egyes alkotók hidrodinamikai térfogata szerint választódik el (2).

Az elválasztás a minta porózus anyaggal, tipikusan szerves géllel töltött oszlopon való áthaladásakor valósul meg. Kis molekulák be tudnak hatolni a pórusokba, a nagy molekulák nem. A nagy molekulák útja ezért rövidebb, és elsőként eluálódnak. A közepes méretű molekulák a pórusok egy részébe behatolnak, és később eluálódnak. A legkisebb, a gél pórusainál kisebb átlagos hidrodinamikai sugarú molekulák minden pórusba be tudnak hatolni. Ezek eluálódnak utoljára.

Ideális helyzetben az elválasztást teljesen a molekulafajták mérete szabja meg, de a gyakorlatban nehéz elkerülni valamely abszorpciós hatás közrehatását. A nem egyenletes oszlopfeltöltés és a holt térfogat ronthatja a helyzetet (2).

A detektálás megvalósul pl. a törésmutatóval vagy az UV-elnyeléssel, és egyszerű eloszlási görbét eredményez. Azonban ahhoz, hogy a tényleges molekulatömeg-értékeket a görbéhez lehessen rendelni, az oszlopot kalibrálni kell ismert molekulatömegű és ideális esetben nagyjából hasonló szerkezetű polimerek, pl. különböző polisztirol standardok futtatásával. Tipikusan Gauss-görbe kapható, néha a kis molekulatömeg oldalán kis farokkal eltorzítva, a függőleges tengely a különböző eluált molekulafajták tömeg szerinti mennyiségét mutatja, a vízszintes tengely a molekulatömeg logaritmusát.

▼B

A kis molekulatömeg-tartalmat ebből a görbéből származtatjuk. A számítás csak akkor lehet pontos, amennyiben az alacsony molekulatömegű fajták a polimerre, mint egészre ekvivalensen, tömeg szerinti alapon hatnak vissza.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az elúciós térfogat reprodukálhatósága (relatív standard deviáció, RSD) 0,3 %-nál jobb kell, hogy legyen. Az analízis megkövetelt reprodukálhatóságát belső standarddal való korrekcióval kell biztosítani, amennyiben a kromatogramot az idő függvényében értékelik ki, és nem felel meg a fent említett követelménynek (1). A polidiszperzitás függ a standardok molekulatömegétől. Polisztirol standardoknál a tipikus értékek:

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

(M_p a standard molekulatömege a csúcsmaximumnál)

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **A standard polisztirol oldatok készítése**

A polisztirol standardokat óvatosan keverve oldják fel a választott eluensben. A gyártó ajánlásait számításba kell venni az oldatok készítésénél.

A választott standardok koncentrációja különböző faktoroktól függ, pl. injektált térfogat, az oldat viszkozitása, és az elemző detektor érzékenysége. A túltöltés elkerülése érdekében a maximális injektált térfogatot az oszlop hosszához kell igazítani. 30 cm × 7,8 mm-es oszlopú GPC-vel történő analitikai elválasztásoknál a jellemző injektált térfogat rendesen 40 és 100 µl között van. Nagyobb térfogat is elképzelhető, de nem lépheti túl a 250 µl-t. Az oszlop aktuális kalibrációja előtt meg kell határozni az injektált térfogat és a koncentráció optimális arányát.

1.6.2. **A mintaoldat készítése**

Elvben a mintaoldatok elkészítésére is ugyanezek a követelmények érvényesek. A mintát megfelelő oldószerben, pl. tetrahidro-furán (THF), óvatos rázással oldják fel. Semmilyen körülmények között sem szabad ultrahangos fürdőben feloldani. Amennyiben szükséges, az oldat tisztítható 0,2–2 µm-es pórusméretű membránszűrővel.

A feloldatlan részecskék jelenlétét, amik nagy molekulatömegű fajták miatt fordulhatnak elő, fel kell jegyezni a végleges jegyzőkönyvben. A feloldott részecskék tömegszázalékának meghatározására megfelelő módszert kell alkalmazni. Az oldatot 24 órán belül fel kell használni.

▼B

1.6.3. **A szennyezőanyag- és adalékanyag-tartalom korrekciója**

Rendszerint szükséges az M < 1 000 fajta tartalmának korrekciója a nem polimer fajtájú jelen lévő komponensek (pl. szennyező anyagok, és/vagy adalékanyagok) járulékára, kivéve ha a mért tartalom már < 1 %. Ezt a polimer oldat, vagy a GPC eluátum közvetlen analízisével érik el.

Amennyiben az oszlopon való áthaladás után az eluátum túl híg a további analízishez, töményíteni kell. Szükséges lehet az eluátum beszáradásig való párologtatása és újraoldása. Az eluátum töményítésének olyan körülmények között kell történnie, amelyek biztosítják, hogy az eluátumban nem történik változás. A GPC lépés utáni eluátumkezelés függ a mennyiségi meghatározás használt analitikus módszerétől.

1.6.4. **Készülék**

A GPC készülék a következő komponensekből áll:

— oldószertartály,

— gáztalanító (szükség szerint),

— pumpa,

— rezgéscsillapító (szükség szerint),

— injektáló rendszer,

— kromatográfiás oszlopok,

— detektor,

— áramlásmérő (szükség szerint),

— adatrögzítő, -feldolgozó,

— hulladéktároló.

Biztosítani kell, hogy a GPC rendszer inert legyen a használt oldószerekkel szemben (pl. THF oldószernél acélkapillárisok használata).

1.6.5. **Injektáló és oldószerszállító rendszer**

A minta oldatának meghatározott térfogatát automataadagolóval vagy kézzel töltik az oszlopra egy pontosan meghatározott zónába. Amennyiben kézzel végzik, a fecskendő dugattyújának túl gyors benyomása vagy kihúzása a megfigyelt molekulatömeg-eloszlásban változásokat okozhat. Az oldószert szállító rendszernek, amennyire csak lehet, lüktetésmentesnek kell lenni, ideálisan rezgéscsillapítót magában foglalva. Az áramlási sebesség 1 ml/perc nagyságrendű.

1.6.6. **Oszlop**

A mintától függően a polimert egy egyszerű, vagy több, sorba kötött oszlopot használva jellemeznek. Számos meghatározott tulajdonságokkal (pl. pórusméret, kizárási határérték) rendelkező porózus oszlopanyag elérhető a kereskedelemben. Az elválasztó gél vagy az oszlophossz megválasztása a minta tulajdonságaitól (pl. hidrodinamikai térfogatok, molekulatömeg-eloszlás) és az elválasztás sajátos körülményeitől, pl. oldószer, hőmérséklet és áramlási sebesség is függ (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Elméleti tányérszám**

Az elválasztásra használt oszlopot vagy oszlopkombinációt az elméleti tányérszámmal kell jellemezni. A THF eluáló oldószer esetében ez magában foglalja etil-benzol, vagy más megfelelő nem poláris oldat töltését ismert hosszúságú oszlopra. Az elméleti tányérszámot a következő egyenlet adja meg:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{vagy} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

Ahol:

N = az elméleti tányérszám

V_e = az elúciós térfogat a csúcsmaximumnál

W = az alapvonal csúcsszélessége

$W_{1/2}$ = a csúcsszélesség félmagasságnál

1.6.8. **Az elválasztás hatékonysága**

Az elméleti tányérszámon kívül, ami a sávszélességet meghatározó mennyiség, az elválasztás hatékonyságának is van szerepe, amit a kalibrációs görbe meredeksége határoz meg. Egy oszlop elválasztási hatékonyságát a következő kapcsolat adja meg:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{as oszlop keresztmetszetének területe}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

ahol:

Ve, Mx = az M_x molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata

$V_{e,(10.Mx)}$ = a 10-szer nagyobb molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata

A rendszer felbontása általában így definiált:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

ahol:

Ve1, V_{e2} = két polisztirol standard elúciós térfogata a csúcsmaximumnál

W_1, W_2 = az alapvonal csúcsszélességei

M_1, M_2 = a molekulatömegek a csúcsmaximumnál (10-es faktorral térjenek el).

Az oszloprendszerre az R-értéknek nagyobbnak kell lennie mint 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Oldószerek**

Minden oldószernek nagy tisztaságúnak kell lennie (THF-ből 99,5 %-os tisztaságút használnak). Az oldószertartálynak (inertgáz-atmoszférában, amennyiben szükséges) elég nagynak kell lennie az oszlop kalibrálásához és néhány mintaanalízishez. Az oldószert gáztalanítani kell, mielőtt a pumpával az oszlopra juttatják.

1.6.10. **Hőmérséklet-szabályozás**

A kritikus belső komponensek (injektáló hurok, oszlopok, detektor, csövezés) hőmérsékletét állandó és az oldószerválasztásnak megfelelő értéken kell tartani.

1.6.11. **Detektor**

A detektor célja az oszlopról eluált minta koncentrációjának mennyiségi rögzítése. A csúcsok szükségtelen szélesedésének elkerülésére a detektorcella küvettatérfogatának a lehető legkisebbnek kell lenni. Nem lehet nagyobb 10 µl-nél, kivéve a fényszórási és viszkozitás-detektoroknál. A detektálásra differenciális törésmutató mérést szokás használni. Azonban, ha a minta vagy az elúciós oldószer sajátos tulajdonságai megkövetelik, más detektortípusok is használhatók, pl. UV/látható fény, IR, viszkozitásdetektor stb.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉS**

2.1. ADATOK

A DIN szabványra (1) kell hivatkozni a részletes értékelési követelménynél éppúgy, mint az adatgyűjtéssel és -feldolgozással kapcsolatos követelményeknél.

Minden mintánál két független kísérletet kell végezni. Külön-külön kell azokat elemezni. Minden esetben elengedhetetlen a mintával azonos körülmények között kezelt vakpróbákból származó adatokat is meghatározni.

Fontos egyértelműen jelezni, hogy a mért értékek a használt standard molekulatömegével ekvivalens relatív értékek.

A retenciós térfogatok vagy a retenciós idők (lehetőleg belső standardot használva korrigáltak) meghatározása után a log M_p értékek (M_p a kalibráló standard csúcsmaximuma) lesznek ábrázolva egyikük függvényében. Molekulatömeg-dekádonként legalább két kalibrációs pont szükséges, és legalább öt mérési pont kell a teljes görbéhez, aminek le kell fedni a minta becsült molekulatömegét. A kalibrációs görbe kis molekulatömegű végpontját n-hexil-benzol, vagy más megfelelő nem poláris oldott anyag definiálja. A görbének az 1 000-nél kisebb molekulatömegeknek megfelelő részét a szennyező és adalékanyagoknak megfelelően határozták meg és korrigálták. Az elúciós görbéket általában elektronikus adatfeldolgozás útján értékelik ki. A kézi digitalizálás esetében az ASTM D 3536-91 használható (3).

▼B

Amennyiben az oszlopon visszamaradt bármilyen nem oldható polimer, molekulatömege valószínűleg nagyobb az oldható frakcióénál, és amennyiben ezt figyelmen kívül hagyják, az az alacsony molekulatömeg-tartalom túlbecsülését eredményezi. A kis molekulatömeg-tartalmú nem oldható polimer korrekciójára vonatkozó útmutatás a függelékben található.

Az eloszlási görbét táblázat vagy ábra (differenciális frekvencia vagy összegszázalék a log M függvényében) formájában kell megadni. Grafikus ábrázolásnál egy molekulatömeg-dekádnak általában kb. 4 cm szélesnek kell lennie, a csúcsmaximumnak pedig kb. 8 cm magasnak kell lenni. Integrális eloszlási görbék esetében az ordinátában a különbségnek 0 és 100 % között kb. 10 cm-esnek kell lenni.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

2.2.1. **Vizsgált anyag**

— elérhető információk a vizsgált anyagról (azonosság, adalékanyagok, szennyező anyagok),

— a mintakezelés, megfigyelések, problémák leírása.

2.2.2. **Műszerezettség**

— eluens tartály, inert gáz, az eluens gáztalanítása, az eluens összetétele, szennyezők,

— pumpa, rezgéscsillapító, injektáló rendszer,

— elválasztó oszlopok (a gyártó, az oszlop jellemzőiről minden információ, mint pórusméret, az elválasztó anyag fajtája stb., a használt oszlopok száma, hossza és elrendezése),

— az oszlop (vagy oszlopkombináció) elméleti tányérszáma, elválasztás hatékonysága (a rendszer felbontása),

— információ a csúcsok szimmetriájáról,

— oszlophőmérséklet, hőmérséklet-szabályozás módja,

— detektor (mérési elv, típus, küvettatérfogat),

— áramlásmérő, amennyiben használva lett (gyártó, mérési elv),

— adatrögzítő és -feldolgozó rendszer (hardver és szoftver).

2.2.3. **A rendszer kalibrálása**

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt módszer részletes leírása,

▼B

— információk a módszer minőségi követelményeiről (pl. korrelációs együttható, eltérés négyzetösszege stb.),

— információk minden, a kísérleti eljárás és az adatok kiértékelése és feldolgozása során alkalmazott extrapolációról, feltételezésről és közelítésről,

— a kalibrációs görbék megalkotásához használt minden mérést dokumentálni kell egy táblázatban, amely minden kalibrációs pont esetében az alábbiakat tartalmazza:

  — a minta neve,

  — a minta gyártója,

  — az M_p, M_n, M_w, és M_w/M_n standardok jellemző értékei, ahogy azokat a gyártó rendelkezésre bocsátotta, vagy az azt követő mérésekből következnek, a meghatározási módszer részleteivel együtt,

  — injektálási térfogat és koncentráció,

  — a kalibrációhoz használt M_p érték,

  — a csúcsmaximumoknál mért elúciós térfogat vagy korrigált retenciós idő,

  — a csúcsmaximumnál számított M_p,

  — a számított M_p és a kalibrációs érték százalékos hibája.

2.2.4. **Információ a kis molekulatömegű polimertartalomról**

— az analízishez használt módszerek és a kísérletek kivitelezési módjának leírása,

— információ a teljes mintára vonatkozó kis molekulatömegű frakciók százalékos (w/w) tartalmáról,

— információ a teljes mintára vonatkozó szennyező, adalékanyagokról, és más nem polimer frakcióról, tömegszázalékban kifejezve.

2.2.5. **Kiértékelés:**

— időn alapuló kiértékelés: a megkövetelt reprodukálhatóság biztosítására használt módszerek (korrekciós módszer, belső standard stb.),

— információ arról, hogy a kiértékelés az elúciós térfogat vagy a retenciós idő alapján történt,

— információ a kiértékelés korlátairól, amennyiben nem elemeztek egy csúcsot teljesen,

— a kiegyenlítési módszerek leírása, amennyiben használva lettek,

— minta-előállítási és minta-előkezelési eljárások,

— feloldatlan részecskék jelenléte, amennyiben voltak,

▼B

— injektálási térfogat (μl) és injektálási koncentráció (mg/ml),

— az ideális GPC profiltól való eltéréshez vezető hatásokat jelző megfigyelések,

— a vizsgálati eljárások minden módosításának részletes leírása,

— a hibatartományok részletei,

— az eredmények értelmezésre vonatkozó bármely egyéb információ és megfigyelés.

3. **IRODALOMJEGYZÉK**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, 1. rész.

(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

Függelék

Útmutató a kis molekulatömeg-tartalom korrekciójához a nem oldható polimerfrakciók vonatkozásában

Amennyiben nem oldható polimer van jelen a mintában, tömegveszteséget okoz a GPC analízis során. A nem oldható polimer irreverzibilisen visszamarad az oszlopon vagy a mintaszűrőn, míg a minta oldható része áthalad az oszlopon. Amennyiben a polimer törésmutató növekedése (dn/dc) megbecsülhető vagy mérhető, meg lehet becsülni a minta tömegvesztését az oszlopon. Ekkor az ismert koncentrációjú standard anyagokkal való külső kalibrálás és a dn/dc használatával korrekciót alkalmaznak a refraktométer válaszának kalibrálására. Az alábbi példában poli(metil-metakrilát) (pMMA) standardot használtak.

Az akril polimerek analízisénél a külső kalibráció során ismert koncentrációjú tetrahidro-furánban oldott pMMA standardot analizálnak GPC-vel, és a kapott adatok használhatók a refraktométer-állandó megállapításához, a következő egyenlet szerint:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

ahol

K = a refraktométer-állandó (mikrovoltszekundum/ml-ben),

R = a pMMA standard válasza (mikrovoltszekundumban),

C = a pMMA standard koncentrációja (mg/ml-ben),

V = az injektált térfogat (ml-ben) és

dn/dc = a törésmutató növekedése pMMA-ra tetrahidro-furánban (ml/mg-ban).

A következő adatok tipikusak a pMMA standardra:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Az eredményül kapott K értéket ($3{,}05 \times 10^{11}$ ezután az elméleti detektorválasz kiszámítására lehet használni, amennyiben az injektált polimer 100 %-a eluálódott a detektoron.

▼B

A.20. **POLIMEREK OLDÓDÁS/EXTRAKCIÓ VISELKEDÉSE VÍZBEN**

1. **MÓDSZER**

A leírt módszer megfelel az OECD TG 120-nak (1997). Az alapelvek és további technikai információk az (1) hivatkozásban találhatók.

1.1. BEVEZETÉS

Bizonyos polimereknél, pl. emulziós polimereknél, kezdeti előkészítő munkára lehet szükség, mielőtt az alább leírt módszert használni lehetne. A módszer nem alkalmazható folyékony polimerek és a vizsgálati körülmények között vízzel reagáló polimerek esetében.

Amennyiben a módszer nem praktikus vagy nem lehetséges, az oldódási/extrakciós viselkedés más módszerekkel is vizsgálható. Ilyen esetben meg kell adni a használt módszer minden részletét és igazolását.

1.2 REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.3 A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A polimerek vizes közegben való oldódási/extrakciós viselkedése lombik módszerrel (ld. A.6 oldhatóság vízben, lombik módszer) határozható meg, az alább leírt módosításokkal.

1.4 MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.5 A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Berendezés**

A következő berendezés szükséges a módszerhez:

— aprítóeszköz, pl. őrlőmalom ismert méretű részecskék előállítására,

— rázókészülék, hőmérséklet-szabályozási lehetőséggel,

— membránszűrő-rendszer,

— megfelelő analitikai berendezés,

— standardizált szűrők.

1.5.2 **Mintakészítés**

Egy reprezentatív mintát először 0,125 és 0,25 mm közötti részecske méretűre kell csökkenteni megfelelő szűrőket használva. A minta stabilitásához vagy az őrlési folyamatnál szükség lehet hűtésre. Gumiszerű anyagok folyékonynitrogén-hőmérsékleten apríthatók (1).

Amennyiben a megkövetelt részecskeméret-frakció nem érhető el, a részecskeméretet annyira le kell csökkenteni, amennyire csak lehetséges, és jegyzőkönyvezni kell az eredményt. A jegyzőkönyvben fel kell tüntetni az aprított minta vizsgálat előtti tárolási módját.

▼B

1.5.3. **Eljárás**

A vizsgált anyagból három 10 g-os mintát kell bemérni egyenként, három üvegdugós edénybe, és 1 000 ml vizet kell adni mindegyikhez. Amennyiben 10 g polimer kezelése kivihetetlen, a következő legnagyobb kezelhető mennyiséget kell használni, és a víz mennyiségét ehhez kell igazítani.

Az edényeket szorosan le kell zárni és 20 °C-on felrázni. Állandó hőmérsékleten működni képes rázó- vagy keverőeszközt kell használni. 24 órás időtartam elteltével az edények tartalmát centrifugálni vagy szűrni kell, és a polimer koncentrációját a tiszta vizes fázisban megfelelő analitikai módszerrel meg kell határozni. Amennyiben a vizes fázishoz nincs megfelelő analitikai módszer, a teljes oldhatóság/extrahálhatóság megbecsülhető a szűrési maradék vagy centrifugálási csapadék száraz tömegéből.

Rendszerint szükség van egyrészt a szennyező anyagok és az adalékanyagok, másrészt a kis molekulatömegű fajták közti mennyiségi megkülönböztetésre. Gravimetriás meghatározásnál vizsgált anyag használata nélküli vakpróba elvégzése is szükséges, hogy a kísérleti eljárásból származó maradékokkal is el lehessen számolni.

A polimerek oldódási/extrakciós viselkedésének meghatározása vízben 37 °C-on 2-es és 9-es pH-nál, a 20 °C-on történő kísérlet leírása szerint végezhető. A pH-értékek alkalmas pufferek vagy megfelelő savak és bázisok, mint sósav, ecetsav, analitikai tisztaságú nátrium-, vagy kálium-hidroxid, vagy NH_3 hozzáadásával állíthatók be.

A használt analitikai módszertől függően egy vagy két vizsgálatot kell elvégezni. Amennyiben a vizes fázis polimertartalmának közvetlen analízisére megfelelő sajátos módszerek állnak rendelkezésre, egy, a fent leírtak szerinti vizsgálatnak kielégítőnek kell lenni. Amennyiben ilyen módszerek nem állnak rendelkezésre és a polimer oldódási/extrakciós viselkedésének meghatározása csak a vizes extraktum teljes szervesszéntartalmának (TOC) meghatározásával végzett közvetett analízisre korlátozott, még egy további vizsgálatot kell elvégezni. Ezt a további vizsgálatot is háromszor kell elvégezni, 10-szer kisebb polimermintákkal és az első vizsgálatban használttal azonos vízmennyiséggel.

1.5.4. **Analízis**

1.5.4.1. *Egy mintamérettel végzett vizsgálat*

A vizes fázisú polimer komponenseinek közvetlen analízisére módszerek állhatnak rendelkezésre. Alternatív lehetőségként megfontolható az oldott/extrahált polimerkomponensek közvetett analízise a teljes oldhatórész-tartalom meghatározásával és a nem polimerspecifikus komponensekre vonatkozó korrekcióval.

A vizes fázis analízise az összes polimerfajta esetében lehetséges:

vagy elegendően érzékeny módszerrel, pl.

— TOC, CO_2-ot fejlesztő perszulfát vagy dikromát feltárással, amit IR-rel vagy kémiai analízissel történő becslés követ,

▼B

— atomabszorpciós spektrometria (AAS), vagy induktív csatolású plazmaemissziós (ICP) ekvivalense szilícium- vagy fémtartalmú polimereknél,

— UV abszorpció vagy spektrofluorimetria aril polimereknél,

— LC-MS alacsony molekulatömegű mintáknál,

vagy a vizes extraktum száradásig történő vákuumpárologtatásával és a maradék spektroszkópiás (IR, UV, stb.) vagy AAS/ICP analízisével.

Amennyiben a vizes fázis ily módon történő analízise nem kivitelezhető, a vizes kivonatot vízzel nem vegyíthető szerves oldószerrel, pl. klórozott szénhidrogénnel kell extrahálni. Az oldószert ezután el kell párologtatni, és a maradékot a fentiek szerint, a megadott polimertartalomnak megfelelően kell analizálni. Bármilyen szennyezőként vagy adalékként azonosított komponenst ebben a maradékban le kell vonni a polimerre magára jellemző oldódási/extrakciós fok meghatározásának céljából.

Amennyiben ezen anyagok viszonylag nagy mennyiségben vannak jelen, szükséges lehet a maradékot például HPLC- vagy GC-analízisnek alávetni annak érdekében, hogy megkülönbözethetők legyenek a szennyezők a jelen lévő monomer és monomerszármazék-fajtáktól, és így az utóbbiak valódi tartalma meghatározható legyen.

Néhány esetben elegendő lehet a szerves oldószer egyszerű száradásig történő elpárologtatása és a száraz maradék lemérése.

1.5.4.2. *Két különböző mintamérettel végzett vizsgálat*

Minden vizes extraktum TOC-ra nézve analizált.

A minta nem oldódott/nem extrahált részén gravimetriás meghatározást végeznek. Amennyiben az egyes edények tartalmának centrifugálása vagy szűrése után polimermaradékok maradnak az edény falához tapadva, az edényt a szűrlettel kell öblíteni, amíg az edény megtisztul minden látható maradéktól. Ezt követően a szűrletet újracentrifugálják, vagy szűrik. A szűrőn vagy a centrifugacsőben maradó maradékokat 40 °C-on vákuumban szárítják, és lemérik. A szárítást állandó tömeg eléréséig kell folytatni.

2. ADATOK

2.1. EGY MINTAMÉRETTEL VÉGZETT VIZSGÁLAT

Mind a három lombik eredményeit és az átlagértékeket is meg kell adni, és tömeg per az oldat térfogatban (tipikusan mg/l), vagy tömeg per polimerminta-tömegben (tipikusan mg/g) kell kifejezni. Továbbá a minta tömegvesztését (számítása: az oldott anyag tömege osztva a kiindulási minta tömegével) is meg kell adni. Ki kell számolni a relatív standard deviációkat (RSD). Egyedi számokat kell megadni a teljes anyagra (polimer + alapvető adalékok stb.) és csak a polimerre (azaz az ilyen adalékok levonása után).

▼B

2.2. KÉT KÜLÖNBÖZŐ MINTAMÉRETTEL VÉGZETT VIZSGÁLAT

Meg kell adni a két három párhuzamossal végzett kísérlet vizes extraktumainak egyedi TOC-értékeit és valamennyi kísérlet átlagértékét, tömeg per az oldat térfogata (tipikusan mgC/l) és tömeg per kiindulási mintatömeg (tipikusan mgC/g) egységekben is kifejezve.

Amennyiben nincs különbség a nagy és kis minta/víz arány eredményeiben, ez azt jelezheti, hogy valamennyi extrahálható komponens tényleg extrahálva lett. Ebben az esetben a közvetlen analízis általában nem szükséges.

A maradékok egyedi tömegeit meg kell adni, és a minták kiindulási tömegének százalékában kell kifejezni. Átlagokat kísérletenként kell számolni. A 100 és a talált százalék különbsége az eredeti mintában lévő oldható és extrahálható anyag százalékát képviseli.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésben az alábbi információkat kell tartalmazni:

3.1.1. **Vizsgált anyag**

— a vizsgált anyagról rendelkezésre álló információk (azonosság, adalékok, szennyezők, alacsony molekulatömegű fajok tartalma).

3.1.2. **Kísérleti körülmények**

— a használt eljárások és kísérleti körülmények leírása,

— az analitikai és detektálási módszerek leírása.

3.1.3. **Eredmények**

— oldhatósági/extrahálhatósági eredmények mg/l-ben; a különböző oldatokbeli extrakciós tesztek egyedi és átlagértékei, polimertartalom és szennyező anyagok, adalékanyagok stb. szerint bontva,

— oldhatósági/extrahálhatósági eredmények mg/polimer g-ban,

— a vizes extraktumok TOC-értékei, az oldott anyag tömege és a számolt százalékok, amennyiben mérik,

— az egyes minták pH-ja,

— információ a vakpróbaértékekről,

— irodalmi hivatkozások a vizsgált anyag kémiai instabilitásról a vizsgálati és az analitikai eljárás alatt, amennyiben szükséges,

— valamennyi, az eredmények értelmezéséhez fontos információ.

4. **IRODALOMJEGYZÉK**

DIN 5377 (1976) Zerkleinerung von Kunstofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (FOLYADÉKOK)

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Ezzel a vizsgálati módszerrel egy folyékony anyag azon képességét mérhetjük, hogy milyen mértékben képes egy éghető anyag égésének sebességét vagy intenzitását növelni, vagy olyan keveréket képezni egy éghető anyaggal, amely spontán öngyulladásra képes, ha a két anyagot alaposan összekeverik. A módszer az oxidáló folyadékok vizsgálatára szolgáló ENSZ-módszeren (1) alapul, illetve egyenértékű azzal. Mivel azonban az A21. módszer elsősorban arra szolgál, hogy kielégítse az 1907/2006 rendelet követelményeit, csak egyetlen referenciaanyaggal kell az összehasonlítást elvégezni. Más referenciaanyagok vizsgálatára és összehasonlítására akkor lehet szükség, ha a vizsgálatok eredményeit várhatóan más célokra használják fel ([1]).

Nem kell elvégezni ezt a vizsgálatot, ha a szerkezeti képlet alapján kétségkívül megállapítható, hogy az anyag nem képes exoterm reakcióba lépni egy éghető anyaggal.

Hasznos, ha a vizsgálat elvégzése előtt rendelkezünk előzetes információkkal az anyag potenciális robbanásveszélyességi tulajdonságairól.

Nem alkalmazható a vizsgálat szilárd anyagokra, gázokra, robbanásveszélyes vagy erősen tűzveszélyes anyagokra vagy szerves peroxidokra.

Előfordulhat, hogy nem kell elvégezni ezt a vizsgálatot, ha az oxidáló folyadékok vizsgálatára szolgáló ENSZ-módszerrel (1) már megvizsgálták az anyagot, és rendelkezésre állnak ennek eredményei.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS EGYSÉGEK

„Átlagos nyomásemelkedési idő”: az a mért átlagos idő, amely alatt a vizsgált keverék nyomása a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra emelkedik.

1.3. REFERENCIAANYAG

Referenciaanyagként 65 tömegszázalékos vizes salétromsav (analitikai minőségű) szükséges ([2]).

([1]) Ahogyan például az ENSZ szállítási rendeleteinek keretében.

([2]) A savat a vizsgálat előtt titrálni kell annak érdekében, hogy ellenőrizzük a koncentrációját.

▼B

Adott esetben, ha a vizsgáló előre tudja, hogy a vizsgálat eredményeit végül más célokra használhatják ([1]), célszerű lehet további referenciaanyagokat is megvizsgálni ([2]).

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó folyadékot 1:1 tömegarányban összekeverjük rostos cellulózzal és nyomástartó edénybe tesszük. Ha a keverés vagy betöltés során spontán öngyulladás lép fel, nincs szükség további vizsgálatra.

Ha nem lép fel spontán öngyulladás, az egész vizsgálatot el kell végezni. A keveréket a nyomástartó edényben hevíteni kell, majd meg kell mérni, hogy átlagosan mennyi idő szükséges ahhoz, hogy a nyomás a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra emelkedjen. Ezt kell azután összehasonlítani a referenciaanyag(ok) és cellulóz 1:1 arányú keverékével kapott átlagos nyomásemelkedési idővel.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Egyetlen anyagon elvégzett öt kísérletben egyik eredmény sem térhet el 30 %-nál nagyobb mértékben a számtani átlagtól. Az átlaghoz képest 30 %-nál nagyobb eltérést mutató eredményeket el kell vetni, tökéletesíteni kell a keverési és betöltési eljárást, majd meg kell ismételni a vizsgálatot.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészítés**

1.6.1.1. *Az éghető anyag*

Éghető anyagként 50–250 μm szálhosszúságú és 25 μm átlagos szálátmérőjű ([3]) száraz, rostos cellulózt kell használni. Maximum 25 mm vastag rétegben, 105 °C-on, 4 órán át, tömegállandóságig kell szárítani, majd lehűlésig, illetve felhasználásig nedvszívó anyag jelenlétében a szárítóberendezésben kell tartani. A száraz cellulóz víztartalmának a száraz tömeg ([4]) 0,5 %-a alatt kell lennie. Ennek eléréséhez szükség esetén hosszabb szárítási időt kell alkalmazni ([5]). A vizsgálat során ugyanazt a tétel cellulózt kell használni.

([1]) Ahogyan például az ENSZ szállítási rendeleteinek keretében.
([2]) Például 50 w/w %-os perklórsav és 40 w/w %-os nátrium-klorát kerül használatra az (1) hivatkozásban.
([3]) Például Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalógusszám: 4021 050.
([4]) Például Karl–Fisher titrálással ellenőrizve.
([5]) Ez a víztartalom szintén elérhető például 24 órás 105 °C-on vákuum alatt történő melegítéssel.

▼B

1.6.1.2. *A berendezés*

1.6.1.2.1. A nyomástartó edény

Szükség van egy nyomástartó edényre. Az edény henger alakú, acél nyomástartó edény, amelynek hossza 89 mm, külső átmérője pedig 60 mm (lásd az 1. ábrát). A két ellentétes oldalon sík felület van kialakítva (itt az edény keresztmetszeti mérete 50 mm-re csökken), amely megkönnyíti a kezelést, amikor becsavarják a gyújtódugót és a szellőződugót. Az edényen átmenő 20 mm átmérőjű furatot az egyik végén 19 mm mélységben kibővítik, és abba 1"-os csőmenetet (British Standard Pipe = BSP) vagy azzal egyenértékű metrikus menetet vágnak. A nyomáselvezető, amely egy oldalág, a nyomástartó edény ívelt falába van becsavarozva, 35 mm-re az edény egyik végétől, és 90 º-os szögben a megmunkált sík felülethez képest. Az erre a célra szolgáló menetes furat 12 mm mély, és 1/2"-os csőmenettel (vagy ezzel egyenértékű metrikus menettel) van ellátva az oldalág végén levő menetnek megfelelően. Ha szükséges, a gáztömörség érdekében egy inert tömítés is beilleszthető. A 6 mm átmérőjű átmenő furattal ellátott oldalág 55 mm-re nyúlik ki a nyomástartó edényből. Az oldalág végén a furat fel van bővítve, és csavarmenettel van ellátva membrános nyomásátalakító számára. Bármilyen nyomásmérő eszköz alkalmazható, feltéve hogy ellenáll a forró gázoknak vagy bomlástermékeknek, és legfeljebb 5 ms alatt képes 690–2 070 kPa nyomásemelkedést érzékelni.

A nyomástartó edénynek az oldalágtól távolabbi vége gyújtódugóval van lezárva, amelyben két elektróda van, amelyek közül az egyik szigetelve van a dugó testétől, a másik pedig azzal elektromosan érintkezik. A nyomástartó edény másik vége egy hasadótárcsával van lezárva (hasadó nyomása körülbelül 2 200 kPa), amelyet egy 20 mm-es furattal ellátott rögzítődugó tart a helyén. Szükség esetén a gáztömörség biztosítására a gyújtódugóhoz inert tömítés alkalmazható. A használat során a szerelvényt egy állványzat (2. ábra) tartja megfelelő helyzetben. Ez általában egy 235 mm × 184 mm × 6 mm méretű lágyacél alaplapból és egy 185 mm hosszúságú 70 mm × 70 mm × 4 mm-es zárt szelvényből áll.

A zárt szelvény egyik végén a két szemben levő oldalból egy-egy szakaszt kivágnak úgy, hogy két lapos lábrész jöjjön létre, amely felett 86 mm hosszúságban megmarad az érintetlen zárt szelvény. Ezeknek a lapos részeknek a végét a zárt szelvény hossztengelyéhez képest 60°-os szögben levágják és az alaplaphoz hegesztik. A zárt szelvény felső végén az egyik oldalba 22 mm széles és 46 mm mély hornyot vágnak úgy, hogy ha a nyomástartó edény szerelvényt a gyújtódugóval lefelé a zárt szelvénybe belehelyezik, az oldalág a horonyba illeszkedik. Távtartóként 30 mm széles és 6 mm vastag acéldarabot hegesztenek a zárt szakasz alul levő belső felületére. Két ellentétes oldalon egy-egy 7 mm-es füles csavar rögzíti a nyomástartó edényt a helyén. Egy-egy 12 mm széles és 6 mm vastag acélszalag van hozzáhegesztve a két lapos lábhoz a zárt szakasz alsó végénél, amely a nyomástartó edényt alulról támasztja meg.

▼B

1.6.1.2.2. A gyújtórendszer

A gyújtórendszer 25 cm hosszú, 0,6 mm átmérőjű és 3,85 ohm/m ellenállású Ni/Cr huzalból áll. A huzalt egy 5 mm átmérőjű rúd segítségével tekercs alakúra kell csavarni, és a gyújtódugóban lévő elektródákhoz kell kapcsolni. A tekercset a 3. ábrán bemutatottak valamelyikének megfelelően kell kialakítani. Az edény alja és a gyújtótekercs alja közötti távolságnak 20 mm-nek kell lennie. Ha az elektródák nem állíthatók, a gyújtóhuzalnak a tekercs és az edény alja közötti végeit kerámiaköpennyel kell szigetelni. A huzalt egy legalább 10 A-t szolgáltató állandó áramú tápegységgel kell fűteni.

1.6.2. **A vizsgálat elvégzése** ([1])

A nyomásátalakító és a fűtőrendszer felszerelése után, de még a hasadótárcsa behelyezése előtt, a berendezést úgy kell tartani, hogy a gyújtódugó alul legyen. Egy üveg főzőpohárban egy keverőbot segítségével a vizsgálandó folyadékból 2,5 g-ot össze kell keverni 2,5 g száraz cellulózzal ([2]). Biztonsági okokból a keverést úgy kell végezni, hogy a vizsgálatot végző személy és a keverék között legyen egy biztonsági védőlemez. Ha a keverék a keverés vagy betöltés során meggyullad, nincs szükség további vizsgálatokra. A keveréket kisebb adagokban és ütögetve a nyomástartó edénybe kell tölteni, vigyázva arra, hogy a keverék a gyújtótekercs körül gyűljön össze, és megfelelően érintkezzen azzal. Fontos, hogy a betöltés során a tekercs ne torzuljon, mivel ez hibás eredményekhez vezethet ([3]). Ezt követően be kell tenni a hasadótárcsát a helyére, majd szorosan be kell csavarozni a tartódugót. A megtöltött edényt a hasadótárcsával felfelé a robbantó állványra kell helyezni, amelyet egy megfelelő, fémborítású füstkamrában vagy robbantókamrában kell elhelyezni. Az áramforrást a gyújtódugó külső csatlakozóihoz kell kapcsolni, és 10 A áramot kell rákapcsolni. A keverés megkezdése és az áram bekapcsolása között nem telhet el 10 percnél hosszabb idő.

A nyomásátalakító által létrehozott jelet megfelelő rendszerrel rögzíteni kell, amely lehetővé teszi mind az eredmény kiértékelését, mind pedig a nyomás változásának folyamatos rögzítését az idő függvényében (pl. egy szalagos íróműszerhez kapcsolt tranziens íróműszer). A keveréket addig kell hevíteni, amíg a hasadótárcsa el nem törik, vagy legalább 60 másodpercig. Ha a hasadótárcsa nem törik el, meg kell várni, amíg a keverék lehűl, majd a megfelelő óvintézkedések betartásával, az esetleges nyomásnövekedésre számítva, óvatosan szét kell szerelni a berendezést. A vizsgálandó anyaggal és a referenciaanyaggal vagy referenciaanyagokkal is öt kísérletet kell végezni. Fel kell jegyezni azt az időt, amely alatt a nyomás a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra emelkedik. Ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt.

Bizonyos esetekben az anyagok olyan (vagy túl magas vagy túl alacsony) nyomásemelkedést idézhetnek elő, amelyet nem az anyag oxidáló tulajdonságait jellemző kémiai reakciók okoznak. Ilyen esetekben szükség lehet arra, hogy a vizsgálatot cellulóz helyett egy inert anyaggal, pl. kovafölddel megismételjük, és így tisztázzuk a reakció jellegét.

([1]) Az oxidálószerek cellulózzal készített keverékeit potenciálisan robbanásveszélyesnek kell tekinteni, és ennek megfelelő óvatossággal kell kezelni.

([2]) A gyakorlatban ez úgy érhető el, hogy a vizsgálandó folyadékból és a cellulózból a kísérlethez szükségesnél nagyobb mennyiségben készítjük el az 1:1 arányú keveréket, majd 5 ± 0,1 g-ot teszünk belőle a nyomástartó edénybe. A keveréket minden egyes kísérlethez frissen kell elkészíteni.

([3]) Különösen kerülni kell, hogy a tekercs egymással szomszédos menetei egymáshoz érjenek.

▼B

2. **ADATOK**

Nyomásemelkedési idő mind a vizsgálandó anyag, mind a referenciaanyag(ok) esetében. Nyomásemelkedési idő az inert anyaggal végzett vizsgálat esetén, ha ilyen is történt.

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mind a vizsgálandó anyag, mind a referenciaanyag(ok) esetében ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt.

Ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt az inert anyaggal végzett vizsgálat esetén (ha ilyen is történt).

Az 1. táblázatban a kapott eredményekre láthatunk példát.

1. táblázat

Példák az eredményekre [a]

Anyag [b]	Átlagos nyomásemelkedési idő cellulózzal készített 1:1 arányú keverékben (ms)
Ammónium-dikromát, telített vizes oldat	20 800
Kalcium-nitrát, telített vizes oldat	6 700
Vas(III)-nitrát, telített vizes oldat	4 133
Lítium-perklorát, telített vizes oldat	1 686
Magnézium-perklorát, telített vizes oldat	777
Nikkel-nitrát, telített vizes oldat	6 250
Salétromsav, 65 %	4 767 [c]
Perklórsav, 50 %	121 [c]
Perklórsav, 55 %	59
Kálium-nitrát, 30 %-os vizes oldat	26 690
Ezüst-nitrát, telített vizes oldat	– [d]
Nátrium-klorát, 40 %-os vizes oldat	2 555 [c]
Nátrium-nitrát, 45 %-os vizes oldat	4 133
Inert anyag	
Víz: cellulóz	– [d]

[a] Az ENSZ szállítási rendszer szerinti osztályozást lásd az (1) hivatkozásban.
[b] A telített oldatokat 20 °C-on kell elkészíteni.
[c] Laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatokból kapott átlagérték.
[d] Nem érte el a 2 070 kPa-os maximális nyomást.

▼B

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált anyag neve, összetétele, tisztasága stb.,

— a vizsgált anyag koncentrációja,

— a cellulóz szárítására alkalmazott módszer,

— az alkalmazott cellulóz víztartalma,

— a mérések eredményei,

— az inert anyaggal kapott vizsgálatok eredményei, ha történt ilyen,

— a számított átlagos nyomásemelkedési idők,

— az ettől a módszertől való bármely eltérés és annak okai,

— az eredmények értékelése szempontjából lényeges összes egyéb információ.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE ([1])

A vizsgálatok eredményeit a következők alapján kell értelmezni:

a) a vizsgált anyagból és cellulózból készített keverékben fellép-e spontán öngyulladás; és

b) a nyomásnak a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2 070 kPa-ra való emelkedéséhez szükséges átlagos idő összehasonlítása a referenciaanyag(ok) esetén mért értékekkel.

Oxidáló hatásúnak kell tekinteni egy folyékony anyagot, ha:

a) cellulózzal alkotott 1:1 tömegarányú keverékében spontán öngyulladás lép fel; vagy

b) cellulózzal alkotott 1:1 tömegarányú keverékében az átlagos nyomásemelkedési idő kisebb vagy egyenlő a 65 tömegszázalékos vizes salétromsav és cellulóz 1:1 tömegarányú keverékében mérttel.

A téves pozitív eredmények elkerülése érdekében az eredmények értelmezésekor szükség esetén figyelembe kell venni a folyadék inert anyaggal történő vizsgálatakor kapott eredményeket is.

([1]) Az ENSZ szállítási rendeletek szerinti, több referenciaanyaggal mért eredmények értelmezéséhez lásd az (1) hivatkozást.

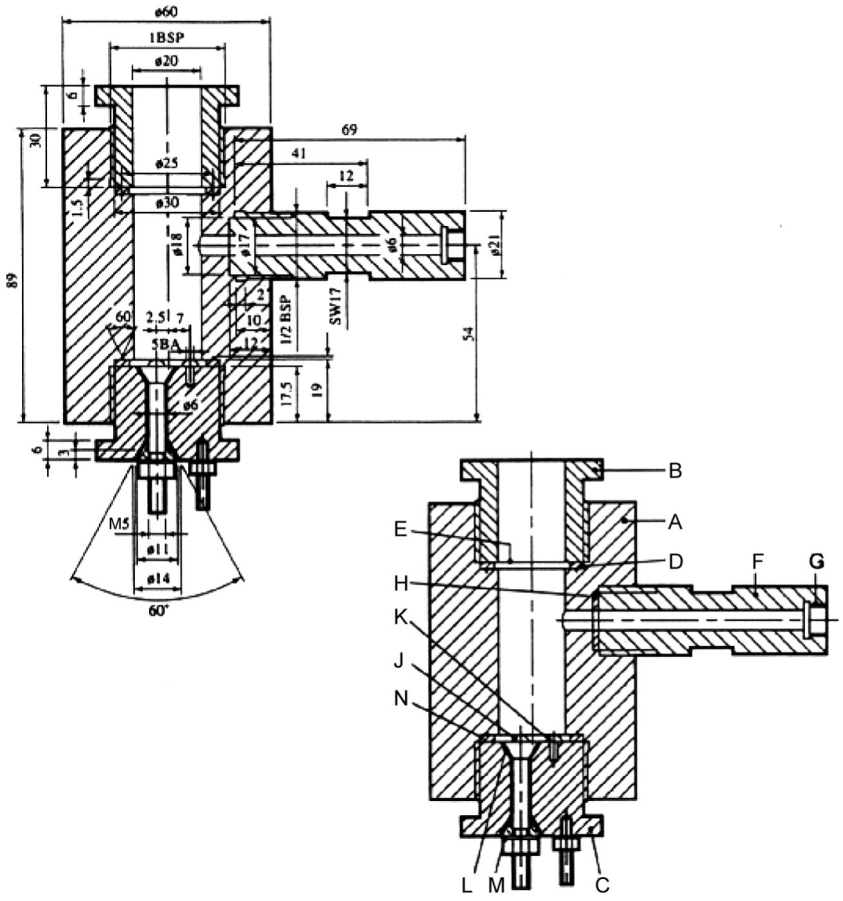
▼B

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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.

1. ábra

A nyomástartó edény



(A) A nyomástartó edény háza

(B) A hasadótárcsát tartó dugó

(C) Gyújtódugó

(D) Lágyólom alátétlemez

(E) Hasadótárcsa

(F) Oldalág

(G) Nyomásátalakító fej

(H) Alátétlemez

(J) Szigetelt elektróda

(K) Földelt elektróda

(L) Szigetelés

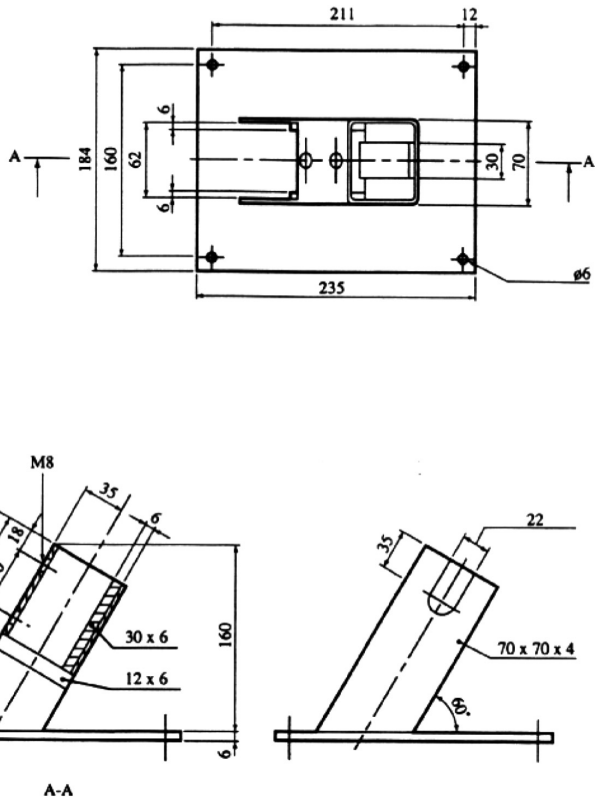
(M) Acélkúp

(N) Horony a tömítőgyűrű részére

▼B

2. ábra

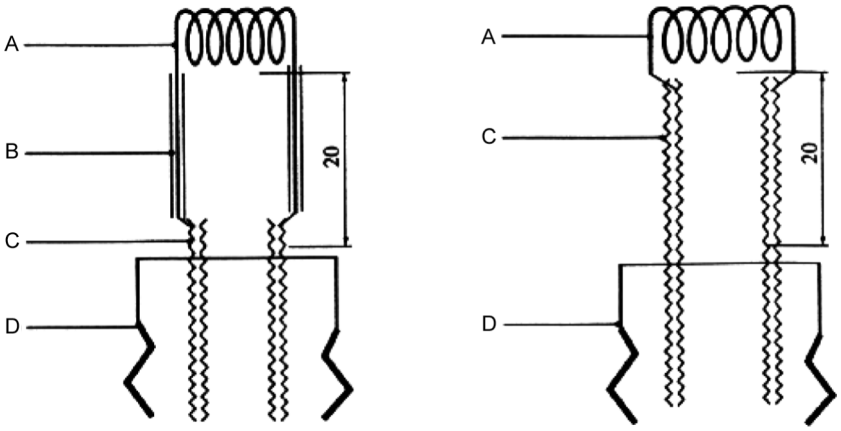
Az állványzat



3. ábra

A gyújtórendszer

(A) Gyújtótekercs (B) Szigetelés (C) Elektródák (D) Gyújtódugó



Megjegyzés: a fenti elrendezések bármelyike alkalmazható.

▼M1

A.22. ROSTOK HOSSZAL SÚLYOZOTT ÁTLAGOS GEOMETRIAI ÁTMÉRŐJE

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Ez a módszer a mesterséges ásványi rostok (MMMF) hosszal súlyozott átlagos geometriai átmérőjének (LWGMD) mérési módszerét írja le. Mivel a minta sokaság hosszal súlyozott átlagos geometriai átmérője 95 %-os valószínűséggel a 95 %-os konfidenciaszinteken belül lesz (LWGMD ± két standard hiba), a jelentett érték (a vizsgálati érték) a minta alsó 95 %-os konfidenciahatára lesz (azaz LWGMD – 2 két standard hiba). A módszer egy HSE ipari eljárástervezet frissítésén alapul (1994. június), melyet az ECFIA és a HSE Chester tartott megbeszélésén fogadott el, 1993. szeptember 26-án, és egy második laboratóriumközi vizsgálat részére készült, illetve abból dolgozták ki (1, 2). Ez a mérési módszer az ömlesztett anyagok vagy a mesterséges ásványi szálakat, beleértve a refraktor kerámia rostokat (RCF), mesterséges üvegszálakat (MMVF), kristályos és polikristályos szálakat tartalmazó termékek rostátmérőjének jellemzésére használható.

A hosszal történő súlyozás az anyagok mintavételezésekor vagy mozgatásakor a hosszú rostok törése által okozott átmérő eloszlásra gyakorolt hatást egyenlíti ki. Az MMMF átmérők méreteloszlásának méréséhez geometriai statisztikát (geometriai átlag) alkalmaznak, mert ezeknek az átmérőknek a méreteloszlása rendszerint a logaritmiko-normális eloszláshoz közelít.

A hossz és az átmérő mérése egyaránt unalmas és időigényes, de csak ha azokat a rostokat mérik, melyek érintik a SEM látómező egy végtelenül vékony vonalát, egy adott rost kiválasztásának lehetősége arányos annak hosszával. Mivel a hosszal súlyozott számításokban ez figyelemmel van a hosszra, az egyetlen megkívánt mérés az átmérő mérése, és a LWGMD-2SE a leírtak szerint számítható.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Részecske: Olyan tárgy, melynél a hossznak a szélességhez viszonyított aránya kisebb mint 3:1.

Rost: Olyan tárgy, melynél a hossznak a szélességhez viszonyított aránya (méretarány) legalább 3:1.

1.3. ALKALMAZÁSI TERÜLET ÉS KORLÁTOK

A módszer a 0,5 μm és 6 μm közti átlagátmérőjű átmérő eloszlás vizsgálatára született. A nagyobb átmérők kisebb SEM nagyítással vizsgálhatóak, de a módszer növekvő mértékben korlátozóvá válik a finomabb rosteloszlás esetében és 0,5 μm alatti átlagátmérő esetében TEM (transzmissziós elektronmikroszkóp) mérés javasolt.

▼M1

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A rostpaplanból vagy a szabad ömlesztett rostból több reprezentatív magmintát vesznek. Az ömlesztett rostok hosszát aprítási eljárással csökkentik és a reprezentatív almintát vízben oszlatják el. Az aliquotokat kivonatolják és 0,2 μm pórusméretű, polikarbonát szűrőn átszűrik, majd előkészítik a pásztázó elektronmikroszkóp (SEM) technikájú vizsgálatra. A rostátmérőket 10 000-szeres vagy nagyobb képernyőnagyítással mérik ([1]), egyenes metszés módszer alkalmazásával, az átlagátmérő torzítatlan becslése végett. A kisebb 95 % konfidenciaintervallumot (egyoldalas vizsgálaton alapulva) számítják, és az eredmény az anyag átlag geometriai rostátmérőjének legkisebb becsült értéke.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Biztonság/óvintézkedések**

A lebegő rostoknak történő személyi kitettséget minimalizálni kell, és a száraz rostok mozgatásakor füstszekrényt vagy kesztyűs manipulátort kell használni. A módszerek hatékonyságának meghatározására időszakos személyi kitettség monitoringot kell végezni. Mesterséges ásványi rostok mozgatásakor a bőrirritációk csökkentésére és a kereszt-szennyeződés megelőzése érdekében eldobható kesztyűt kell viselni.

1.5.2. **Készülék / berendezés**

— Préselő és sajtoló (10 MPa előállítására képes).

— 0,2 μm pórusméretű polikarbonát kapilláris pórus szűrők (25 mm átmérő).

— 5 μm pórusméretű cellulózészter membránszűrő alátétszűrőnek.

— Üveg szűrőberendezés (vagy eldobható szűrőrendszerek) 25 mm átmérőjű szűrőkhöz (pl. Millipore üveg mikroanalízis készlet, XX10 025 00 típusú).

— Mikroorganizmusok eltávolítására 0,2 μm pórusátmérőjű szűrőn átszűrt, frissen desztillált víz.

— Katódbevonó arany vagy arany/palládium anyaggal.

— Pásztázó elektronmikroszkóp, mely 10 nm felbontású és 10 000-szeres nagyításra képes.

— Vegyes: spatulák, 24-es típusú szikepenge, csipeszek, SEM tárgylemezek, szén ragasztó vagy szén tapadó szalag, ezüst vezető.

— Ultrahangos szonda vagy asztali ultrahangos fürdő.

— Fúró mintavevő vagy dugófúró, a mesterséges ásványi szál paplanból történő magmintavételre.

([1]) Ez a nagyítási érték 3 μm rostokhoz javasolt, a 6 μm rostok esetében 5 000-szeres nagyítás megfelelőbb lehet.

▼M1

1.5.3. **A vizsgálat kivitelezése**

1.5.3.1. *Mintavétel*

Paplanok és lapok esetében egy 25 mm-es magfúróval vagy dugófúróval vesznek mintákat a keresztmetszetből. Ezek a paplanok egy rövid hosszoldalán, annak szélességében egyenlő távolságra kell, hogy elhelyezkedjenek, vagy pedig véletlenszerűen kell venni őket, amennyiben elegendő hosszú hosszdarabok áll rendelkezésre. Ugyanezt a berendezést szabad rostokból történő véletlenszerű minták vételére is lehet használni. Lehetőség szerint hat mintát kell venni, az ömlesztett anyag térbeli eltéréseinek tükrözése céljából.

A hat magmintát 50 mm átmérőjű sajtolóban, 10 MPa-on kell összetörtni. Az anyagot egy spatulával kell összekeverni, majd 10 MPa-on újra összenyomni. Ezután az anyag kikerül a sajtolóból és lezárt üvegben kerül tárolásra.

1.5.3.2. *A minta előkészítése*

Ha szükséges, a szerves kötőanyag eltávolítható a rostnak körülbelül egy órára 450 °C-os kemencébe történő helyezésével.

A mintát kúp alakúra kell formálni, majd negyedelve szétosztani (ezt porkamrában kell végezni).

Spatula segítségével adjuk a minta egy kis mennyiségét (< 0,5 g) 100 ml frissen desztillált, 0,2 μm-es membránszűrőn átszűrt vízhez (ha kielégítőnek bizonyulnak, más, alternatív ultratiszta víz forrásokat is lehet használni). 100 W teljesítményen működtetett, kavitációra beállított ultrahangos szondával alaposan oszlassuk el. (Ha nem áll rendelkezésre szonda, a következő módszert alkalmazzuk: ismételten rázzuk és invertáljuk 30 másodpercig; asztali ultrahangos fürdőben ultrahangozzuk öt percig; majd ismételten rázzuk és invertáljuk további 30 másodpercig).

Rögtön a rost szétoszlatását követően vegyünk ki több aliquotot (pl. három darab, 3, 6 és 10 ml aliquot) egy széles szájú pipetta segítségével (2–5 ml kapacitás).

Mindegyik aliquotot vákuumszűrőzzük át egy 0,2 μm polikarbonát szűrőn, melyet egy 5 μm pórusú MEC alátét szűrővel egészít ki, egy 25 mm-es hengeres tartályos, üvegszűrős tölcsérrel. Körülbelül 5 ml szűrt desztillált vizet kell a tölcsérbe helyezni, és az aliquotot lassan át kell pipettázni át a vízbe, a pipetta csúcsát a meniszkusz alatt tartva. A pipettázást követően a pipettát és a tartályt alaposan át kell öblíteni, mivel a vékony rostok hajlamosak inkább a felületen maradni.

Óvatosan távolítsuk el a szűrőt és válasszuk el az alátét szűrőtől, mielőtt egy tartályba helyeznénk szárítani.

▼M1

24-es típusú szikével a szűrt üledékből vágjunk egy negyed vagy fél szűrőrészt, ide-oda mozgó mozdulatokkal. A kivágott részt óvatosan helyezzük a SEM tárgylemezre, szén ragasztószalaggal vagy szénragasztóval rögzítve. A szűrő széleinek és a tárgylemez villamos érintkezésének javítása érdekében legalább három helyen ezüst vezetőt kell alkalmazni. Amikor a ragasztó/ezüst vezető száraz, szórással vonja be az üledék felületét körülbelül 50 nm arany/palládium bevonattal.

1.5.3.3. *SEM kalibrálása és működtetése*

1.5.3.3.1. Kalibrálás

A SEM kalibrálását legalább hetente egyszer ellenőrizni kell (ideálisan naponta egyszer), hitelesített kalibrációs ráccsal. A kalibrációt össze kell hasonlítani egy hitelesített standarddal és ha a mért érték (SEM) nincs a hitelesített érték ± 2 %-án belül, a SEM kalibrációt be kell állítani és újra kell ellenőrizni.

A SEM-nek legalább látható 0,2 μm átmérő felbontással kell rendelkeznie, valós minta mátrixot alkalmazva, 2 000-szeres nagyításon.

1.5.3.3.2. Működtetés

A SEM-et 10 000-szeres nagyításon kell működtetni ([1]), olyan körülményeket alkalmazva, melyek jó felbontást és elfogadható képet adnak lassú, például 5 másodperc per kép letapogatási sebességnél. Bár a különböző SEM-ek üzemeltetési követelményei eltérhetnek, általánosságban a legjobban látható és legjobb felbontás érdekében, viszonylag alacsony atomsúlyú anyagokkal 5–10 keV gyorsítófeszültséget kell alkalmazni kis fénypont mérettel és rövid működési távolsággal. Mivel lineáris metszést végzünk, 0°-os dőlést kell alkalmazni a minimális újrafókuszáláshoz, vagy, ha az SEM-nek van eucentrikus állapota, az eucentrikus működési távolságot kell használni. Kisebb nagyítás alkalmazható, ha az anyag nem tartalmaz kis (átmérőjű) rostokat, és a rostok átmérője nagy (> 5 μm).

1.5.3.4. *Méretezés*

1.5.3.4.1. Kisebb nagyítású vizsgálat a minta értékelésére

A mintát először kis nagyítással kell vizsgálni összetapadt nagy rostok jeleit keresve, és a rostok sűrűségét vizsgálva. Túlzott tapadás esetén javasolt új minta készítése.

A statisztikai pontosság érdekében fontos egy minimum számú rost mérése, és kívánatos a magas rostsűrűség, mivel az üres mezők vizsgálata időigényes és nem segíti az elemzést. Ugyanakkor, ha a szűrő túltöltött, nehézkes az összes mérhető rost mérése, mert a kis rostokat eltakarhatják a nagyobbak, ezért ezek esetleg figyelmen kívül maradnak.

([1]) A 3 μm rostok esetében lásd az előző jegyzetet.

▼M1

Az LWGMD túlbecslése annak eredménye lehet, ha a lineáris átlón a rostsűrűség meghaladja milliméntereként a 150 rostot. Másrészről az alacsony rostkoncentrációk növelik az elemzés idejét, és gyakran költséghatékonyabb az optimálishoz közeli rostsűrűségű minta készítése, mint az alacsony koncentrációjú szűrők számolgatásához ragaszkodás. Az optimális rostsűrűség esetén 5 0000-szeres nagyításnál egy látómezőben átlag egy vagy két megszámlálható rost található. Ugyanakkor az optimum sűrűség függ a rostok méretétől (átmérő), ezért fontos, hogy a műveletet végző személy szakszerűen döntsön arról, hogy a rostsűrűség optimálishoz közeli-e vagy sem.

1.5.3.4.2. A rostátmérők hosszal történő súlyozása

Csak azokat a rostokat kell számolni, melyek a SEM képernyőjén lévő (végtelenül) vékony vonalat érintik (vagy keresztezik). Ebből az okból kifolyólag a képernyő közepén egy vízszintes (vagy függőleges) vonal húzódik.

Alternatívaként a képernyő közepén egyetlen pont található, és a szűrőn keresztül egy irányban zajlik a folyamatos pásztázás. Minden olyan rost átmérője, melynek méretaránya nagyobb mint 3:1, és érinti, vagy keresztezi ezt a pontot, mérésre és rögzítésre kerül.

1.5.3.4.3. Rostok méretezése

Minimum 300 rost mérése javasolt. Minden rostot csak egyszer, a képen lévő vonallal vagy ponttal kapott metszéspontban mérünk (vagy ha a rost végei takarva vannak, a metszésponthoz közel). Ha nem szokványos keresztmetszetű rostok fordulnak elő, a rost átlag átmérőjét képviselő mérést kell alkalmazni. Gondosan kell eljárni a végek meghatározásakor, illetve a rost végei közötti legrövidebb távolság mérésekor. A méretezés végezhető on-line vagy pedig a tárolt képekkel vagy fotókkal off-line. Félautomatikus képi mérési rendszerek – melyek az adatokat közvetlenül egy táblázatba töltik le – használata ajánlott, mivel ezek időt takarítanak meg, kiküszöbölik az elírási hibákat és a számítások automatikusak.

A hosszú rostok végeit kis nagyítással kell ellenőrizni, meggyőződve arról, hogy azok nem göndörödnek vissza a mérési látómezőbe és csak egyszer kerülnek mérésre.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A rostátmérők rendszerint nem mutatnak normális eloszlást. Ugyanakkor a logtranszformáció elvégzésével a normálishoz közelítő eloszlást nyerhetünk.

Kiszámítjuk az n rostátmérők (D) természetes e alapú logaritmusa (lnD) számtani átlagát (mean lnD) és standard eltérését (SD_{lnD}):

$$\text{mean lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{mean } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

A standard hiba (SE_{lnD}) meghatározásához a standard eltérést elosztjuk a mérések számának (n) négyzetgyökével.

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Az átlagból kivonjuk a standard hiba kétszeresét, és kiszámítjuk az érték (mínusz két standardhiba) exponenciálisát, így megkapjuk a geometriai átlag mínusz két standard hiba értéket.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek legalább a következő információt kell tartalmaznia:

— Az LWGMD-2SE értéke.

— Bármilyen eltérés és különösen azok, melyek hatással lehetnek az eredmények precízségére vagy pontosságára, megfelelő indoklással.

4. **HIVATKOZÁSOK**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 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. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS (1-OKTANOL/VÍZ): LASSÚ KEVERÉSES MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 123. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. A lassú keveréses módszert sikerrel alkalmazták az 1-oktanol/víz megoszlási hányados (P_{OW}) pontos meghatározására log P_{OW} = 8,2 értékig (1). Ez a kísérleti megközelítés éppen ezért alkalmas az erősen hidrofób anyagok P_{OW} értékének közvetlen meghatározására.

2. Az 1-oktanol/víz megoszlási hányados (P_{OW}) meghatározásának egyéb módszerei a lombikrázásos módszer (2), valamint a P_{OW} fordított fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) kapott retencióból történő meghatározása (3). A lombikrázásos módszernél az oktanol-mikrocseppek vizes fázisba való átkerülése miatt fennáll a torzított mérési eredmények veszélye. Minél nagyobb a P_{OW} értéke, annál inkább előfordulhat e cseppek vizes fázisban való jelenléte miatt a vizsgált anyag vízben oldott koncentrációjának túlbecslése. Éppen ezért e módszer alkalmazása a 4-nél kisebb log P_{OW} értékű anyagokra korlátozódik. A második módszer közvetlen módon meghatározott, konkrét P_{OW}-adatokat használ a HPLC technikával megállapított retenciós viselkedés és a mért P_{OW} értékek közötti összefüggés kalibrálással való meghatározásához. Az ionizálható anyagok 1-oktanol/víz megoszlási hányadosának meghatározásához állt ugyan rendelkezésre OECD-iránymutatástervezet (4), ez azonban már nem alkalmazható.

3. A jelen vizsgálati módszert Hollandiában dolgozták ki. Az itt leírt vizsgálatok precizitását egy 15 laboratórium részvételével végzett validációs körvizsgálati tanulmány keretében validálták és optimalizálták (5).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

Szignifikancia és alkalmazási terület

4. Inert szerves anyagoknál erősen szignifikáns összefüggést mutattak ki az 1-oktanol/víz megoszlási hányados (P_{OW}) és az anyag halakban történő bioakkumulációja között. Ezen túlmenően összefüggést találtak a P_{OW} és a halakra gyakorolt toxikus hatás, valamint a vegyi anyagok szilárd anyagok, például talaj és üledékek általi felvétele között. A hivatkozott irodalom (6) széles körű áttekintést nyújt ezen összefüggésekről.

5. Számos különböző összefüggést állapítottak meg az 1-oktanol/víz megoszlási hányados és az anyagok környezeti toxikológia és kémia szempontjából lényeges egyéb tulajdonságai között. Ennek következtében az 1-oktanol/víz megoszlási hányados meghatározó paraméterré vált a vegyi anyagok környezeti kockázatának értékelése, valamint a vegyi anyagok környezeti sorsának előrejelzése szempontjából.

Alkalmazási kör

6. A lassú keveréses kísérlet során feltételezhetően kisebb mértékű a mikrocseppek 1-oktanol-cseppekből való képződése a vizes fázisban. Ennek következtében nem fordul elő a vízben oldott koncentrációnak a vizsgált anyag e cseppekhez kötődő molekulái miatti túlbecslése. A lassú keveréses módszer éppen ezért különösen alkalmas az 5 vagy annál nagyobb várt log P_{OW} értékű anyagok P_{OW} értékének meghatározására, amelyeknél a lombikrázásos módszer (2) gyakran ad hibás eredményeket.

▼M4

FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

7. Egy adott anyag víz és lipofil oldószer (1-oktanol) közötti megoszlási hányadosa a vegyi anyag két fázis közötti egyensúlyi megoszlását írja le. A víz és 1-oktanol közötti megoszlási hányados (P_{OW}) a vizsgált anyag vízzel telített 1-oktanolban (C_O) és 1-oktanollal (C_W) telített vízben fennálló egyensúlyi koncentrációinak hányadosát jelenti.

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Koncentrációhányados lévén dimenzió nélküli szám. A legtöbb esetben 10-es alapú logaritmusként (log P_{OW}) adják meg. A P_{OW} hőmérsékletfüggő, ezért a jegyzőkönyvezett adatok között szerepelnie kell a mérési hőmérsékletnek.

A MÓDSZER ELVE

8. A megoszlási hányados meghatározásához a vizet, az 1-oktanolt és a vizsgált anyagot állandó hőmérsékleten egyensúlyba hozzuk egymással. Ezt követően meghatározzuk a vizsgált anyag koncentrációját a két fázisban.

9. Az itt javasolt lassú keveréses módszerrel csökkenthetők a lombikrázásos kísérlet során jelentkező mikrocseppképződéssel összefüggő kísérleti nehézségek. A lassú keveréses kísérlet során vizet, 1-oktanolt és vizsgált anyagot hozunk egyensúlyba egy termosztátos keverőreaktorban. A fázisok közötti anyagmozgást keveréssel gyorsítjuk. A keverés korlátozott turbulenciával jár, ami mikrocseppek képződése nélkül fokozza az 1-oktanol és a víz közötti anyagmozgást (1).

A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

10. Mivel a vizsgált anyagtól eltérő anyagok jelenléte befolyásolhatja a vizsgált anyag aktivitási együtthatóját, a vizsgált anyagot tiszta formában kell vizsgálni. Az 1-oktanol/víz kísérlethez a kereskedelmi forgalomban kapható legnagyobb tisztaságú anyagot kell felhasználni.

11. A jelen módszer tiszta anyagokra vonatkozik, amelyeknél nem figyelhető meg disszociáció vagy asszociáció, illetve jelentős mértékű határfelületi aktivitás. A módszerrel az ilyen anyagok, valamint a keverékek 1-oktanol/víz megoszlási hányadosa határozható meg. Amennyiben a módszert keverékeknél alkalmazzuk, a megállapított 1-oktanol/víz megoszlási hányados feltételesnek tekintendő, és függ a vizsgált keverék kémiai összetételétől, valamint a vizes fázisként alkalmazott elektrolit-összetételtől. A módszer disszociáló vagy asszociáló vegyületekre is alkalmazható, ugyanakkor ez esetben további műveleteket kell elvégezni (12. bekezdés).

12. Mivel a disszociáló anyagok – például szerves savak és fenolok, szerves lúgok, valamint szerves fémvegyületek – 1-oktanol/víz megoszlása során vízben és 1-oktanolban több egyensúlyi állapot jön létre, az 1-oktanol/víz megoszlási hányados feltételes állandó, amely nagymértékben függ az elektrolit összetételétől (7) (8). Az 1-oktanol/víz megoszlási hányados meghatározásához éppen ezért a kísérlet során szabályozni és jegyzőkönyvezni kell a pH-t és az elektrolit összetételét. E megoszlási hányadosok értékelésekor szakértői megítélésre kell támaszkodni. A disszociációs állandó(k) értéke alapján alkalmas pH-értékeket kell kiválasztani úgy, hogy minden egyes ionizációs állapothoz meghatározható legyen a megoszlási hányados. A szerves fémvegyületek vizsgálatához olyan puffereket kell használni amelyekben nem képződnek komplex vegyületek (8). A kísérleti feltételeket a vizes fázisról rendelkezésre álló kémiai ismeretek (komplexképzési állandók, disszociációs állandók) figyelembevételével oly módon kell kiválasztani, hogy megbecsülhető legyen a vizsgált anyagból a vizes fázisban keletkező változatok megjelenése. Háttérelektrolit használatával minden kísérlet során azonos ionerősséget kell biztosítani.

▼M4

13. Alacsony vízoldékonysággal vagy magas P_{OW} értékkel rendelkező anyagok vizsgálata során nehézségek merülhetnek fel, mivel a vízben oldott koncentráció ez esetben olyan alacsony, hogy nehéz pontosan meghatározni. Ez a vizsgálati módszer útmutatást ad az említett probléma kezeléséhez.

INFORMÁCIÓK A VIZSGÁLT ANYAGRÓL

14. Analitikai vagy annál nagyobb tisztasági fokú kémiai reagenseket kell alkalmazni. Javasolt jelöletlen, ismert kémiai összetételű, lehetőség szerint legalább 99 %-os tisztaságú vizsgált anyagokat, vagy radioaktívan jelölt, ismert kémiai összetételű, radiokémiai tisztaságú vizsgált anyagokat használni. Rövid felezési idejű nyomjelző elem használata esetén korrekciókat kell végezni a bomlás figyelembevétele érdekében. Radioaktívan jelölt vizsgált anyag esetén az adott vegyi anyagra specifikus analitikai módszert kell alkalmazni annak érdekében, hogy a mért radioaktivitás közvetlenül a vizsgált anyaghoz kötődjön.

15. A log P_{OW} becslése kereskedelmi forgalomban kapható, a log P_{OW} becslésére szolgáló szoftverrel, vagy a két oldószerben mérhető oldékonyság hányadosa alapján végezhető el.

16. A P_{OW} meghatározására szolgáló, lassú keveréses kísérlet elvégzése előtt a vizsgált anyagról az alábbi információknak kell rendelkezésre állniuk:

a) szerkezeti képlet;

b) az anyag vízben és 1-oktanolban oldott koncentrációjának meghatározására alkalmas analitikai módszerek;

c) ionizálható anyagok esetén a disszociációs állandó(k) (112. OECD-iránymutatás (9));

d) vízoldékonyság (10);

e) abiotikus hidrolízis (11);

f) gyors biológiai lebonthatóság (12);

g) gőznyomás (13).

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Felszerelések és készülékek

17. Általános laboratóriumi felszerelések, így különösen a következők szükségesek:

— mágneses keverők és teflonbevonatú mágneses keverőrudak a vizes fázis keveréséhez,

— a vizsgált anyag várható koncentrációjának meghatározására alkalmas analitikai műszerek,

— alul csappal ellátott keverőedény. A becsült log P_{OW} értéktől és a vizsgált vegyület kimutatási határától (LOD) függően megfontolandó egy ugyanolyan geometriai kialakítású, 1 liternél nagyobb kapacitású reakcióedény használata, hogy kellő mennyiségű víz álljon rendelkezésre a kémiai extraháláshoz és elemzéshez. Ez magasabb koncentrációt eredményez a kivett vízmintában, és következésképpen megbízhatóbb analitikai meghatározást tesz lehetővé. A szükséges térfogat becsült minimális értékét, a vegyület LOD-ját és becsült log P_{OW} értékét, valamint vízoldékonyságát az 1. függelék táblázata tartalmazza. A táblázat a log P_{OW} és az oktanolban és vízben való oldhatóság hányadosa közötti, Pinsuwan és munkatársai által bemutatott összefüggésen (14) alapul:

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

ahol

$SR = S_{oktanol}/S_{víz}$ (molaritásban kifejezve),

a táblázat alapjául szolgál továbbá a Lyman által a vízoldékonyság előrejelzéséhez megadott összefüggés (15) is. Az 1. függelékben szereplő egyenlettel kiszámított vízoldékonysági értékeket első közelítésnek kell tekinteni. Megjegyzendő, hogy a vizsgálatot végző személy a vízoldékonyságot bármilyen, a víztaszító képesség és az oldékonyság közötti kapcsolat ábrázolására alkalmasabbnak tekintett összefüggés alapján is megbecsülheti. Szilárd vegyületek esetén például ajánlott az oldékonyság előrejelzése során az olvadáspontot is figyelembe venni. Módosított egyenlet alkalmazása esetén meg kell bizonyosodni arról, hogy az oktanolban való oldhatóság számítására szolgáló egyenlet módosítva is érvényes. A 2. függelék tartalmazza egy körülbelül 1 liter térfogatú, kettősfalú üveg keverőedény vázlatrajzát. A 2. függelékben ábrázolt edény arányai előnyösnek bizonyultak, és eltérő méretű eszköz használata esetén is célszerű megtartani azokat,

— a lassú keveréses kísérlet során alapvető fontosságú az állandó hőmérsékletet biztosító eszköz használata.

18. Inert anyagból készült edényeket kell használni, hogy az edény felületén elhanyagolható mértékű adszorpció jelentkezzen.

A vizsgált oldatok előkészítése

19. A P_{OW} meghatározásához a kereskedelmi forgalomban kapható legnagyobb (legalább 99 %-os) tisztaságú 1-oktanolt kell használni. Ajánlott az 1-oktanolt savval, lúggal és vízzel végzett extrakció, majd pedig szárítás útján tisztítani. Az 1-oktanol ezenkívül desztillálással is tisztítható. A tisztított 1-oktanolt a vizsgált anyagok standard oldatainak elkészítésére kell felhasználni. A P_{OW} meghatározásához üveg- vagy kvarcedényben desztillált, vagy tisztítórendszerrel nyert vizet kell használni, illetve használható HPLC-tisztaságú víz is. Desztillált víz esetén 0,22 μm-es szűrővel végzett szűrés szükséges, továbbá vakmintákat is kell készíteni annak ellenőrzése érdekében, hogy a koncentrált kivonatokban nincs-e jelen a vizsgált anyagot esetlegesen befolyásoló szennyeződés. Üvegszálas szűrő használata esetén a szűrőt három órán keresztül 400 °C hőmérsékleten végzett hőkezeléssel kell tisztítani.

20. A kísérlet előtt mindkét oldószert kölcsönösen telítsük egymással úgy, hogy megfelelő méretű edényben egyensúlyi állapotba hozzuk azokat. Ez a kétfázisú rendszer két napon át tartó lassú keverésével történik.

21. Válasszuk ki a vizsgált anyag megfelelő koncentrációját, és ennek megfelelő anyagmennyiséget oldjunk fel (vízzel telített) 1-oktanolban. Az 1-oktanol/víz megoszlási hányadost híg 1-oktanolos és vizes oldatban kell meghatározni. A vizsgált anyag koncentrációja ezért az egyes fázisokban nem haladhatja meg az oldhatóság 70 %-át, és legfeljebb 0,1 mól lehet (1). A kísérlet során használt 1-oktanol-oldatok nem tartalmazhatnak lebegő, szilárd vizsgált anyagot.

22. Megfelelő mennyiségű vizsgált anyagot oldjunk fel (vízzel telített) 1-oktanolban. Ha a log P_{OW} becsült értéke 5-nél nagyobb, ügyelni kell arra, hogy a kísérlet során használt 1-oktanolos oldatok ne tartalmazzanak lebegő, szilárd vizsgált anyagot. Ennek érdekében az 5-nél nagyobb becsült log P_{OW} értékű vegyi anyagok esetében az alábbi eljárást kell alkalmazni:

— a vizsgált anyagot oldjuk fel (vízzel telített) 1-oktanolban,

▼M4

— várjuk meg, amíg az oldatból a lebegő szilárd anyag kiülepedik. Az ülepítés ideje alatt kísérjük figyelemmel a vizsgált anyag koncentrációját,

— miután az 1-oktanolos oldatban mért koncentráció megállapodik egy stabil értéken, a törzsoldatot hígítsuk megfelelő mennyiségű 1-oktanollal,

— mérjük meg a hígított törzsoldat koncentrációját. Ha a mért koncentráció összhangban van a hígítás mértékével, a hígított törzsoldat felhasználható a lassú keveréses kísérlethez.

A minták extrahálása és elemzése

23. Az anyag vizsgálatához validált analitikai módszert kell alkalmazni. A vizsgálatot végző személyeknek bizonyítaniuk kell, hogy a vízzel telített 1-oktanol, valamint az 1-oktanollal telített víz fázisban a kísérlet során mért koncentrációk az alkalmazott analitikai eljárások mennyiségi kimutatásának módszertani határértéke fölött vannak. Amennyiben extrahálási módszerek szükségesek, a vizsgált anyag vizes és 1-oktanolos fázisból történő analitikai visszanyerését a kísérlet előtt meg kell állapítani. Az analitikai jelet vakmintákkal korrigálni kell, és ügyelni kell arra, hogy az analit ne kerüljön át az egyik mintából a másikba.

24. A hidrofób vizsgált anyagok vizes fázisban fennálló meglehetősen alacsony koncentrációja miatt az elemzés előtt valószínűleg el kell végezni a vizes fázis szerves oldószerrel történő extrahálását, és az extraktumot be kell töményíteni. Ugyanezen okból csökkenteni kell az esetleges vakminták koncentrációját. Ennek érdekében magas tisztasági fokú, lehetőség szerint szermaradék-elemzésre szolgáló oldószereket kell alkalmazni. A keresztszennyeződés ezenkívül előzőleg alaposan megtisztított(például oldószerrel kimosott vagy magas hőmérsékleten hőkezelt) üvegeszközök használatával is elkerülhető.

25. A log P_{OW} becsült értéke becslési programmal vagy szakértői megítélés alapján kapható meg. Ha az érték 6-nál nagyobb, a vakmintákkal való korrekciókat és az analit áthordását szorosan figyelemmel kell kísérni. Hasonlóképpen, ha a log P_{OW} 6-nál nagyobb, a magas betöményítési tényezők elérése érdekében kötelező helyettesítő standardot alkalmazni a visszanyeréssel való korrekciókhoz. A kereskedelmi forgalomban több szoftverprogram is kapható a log P_{OW} becsléséhez, [1] például Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) és ACD log P (19). A becslési módszerek leírása a hivatkozott irodalomban olvasható (20–22).

26. A vizsgált anyag 1-oktanolban és vízben oldott mennyiségének megállapításához használt mennyiségi meghatározási határértékeket (LOQ) elfogadott módszerek alapján kell meghatározni. Általános szabályként a mennyiségi meghatározás módszerspecifikus határértéke akként a vízben vagy 1-oktanolban oldott koncentrációként határozható meg, amely 10-es jel/zaj arányt eredményez. Megfelelő extrahálási és betöményítési módszert kell kiválasztani, továbbá meg kell határozni az analitikai visszanyeréseket is. Megfelelő betöményítési tényezőt válasszunk ki annak érdekében, hogy az analitikai meghatározás eredményeként szükséges nagyságú jelet kapjunk.

[1] Ezek az információk csupán a felhasználók kényelmét szolgálják. Más, egyenértékű számítógépes programok is használhatók, amennyiben bizonyítottan képesek azonos eredmények előállítására.

▼M4

27. Az analitikai módszer paraméterei és a várt koncentrációk alapján határozzuk meg a vegyület pontos koncentrációjának megállapításához szükséges hozzávetőleges mintaméretet. Kerülendő az olyan vizes minták használata, amelyek túl kis mennyiségűek ahhoz, hogy megfelelő analitikai jelet adjanak. Kerülendő továbbá a túl nagy méretű vízminták használata, mivel ellenkező esetben túl kevés víz maradhat a minimális számú (n = 5) elemzés elvégzéséhez. Az 1. függelék az edény térfogatának, valamint a vizsgált anyag LOD értékének és oldhatóságának függvényében adja meg a minimális mintamennyiséget.

28. A vizsgált anyagok mennyiségi meghatározása az adott vegyület kalibrálási görbéivel való összehasonlítás alapján történik. Az elemzett mintákban oldott koncentrációknak a standardok koncentrációi közé kell esniük.

29. Hatnál nagyobb becsült log P_{OW} értékű vizsgált anyagok esetén az extrahálás előtt helyettesítő standardot kell a vízmintához adni, hogy a vízminták extrahálása és betöményítése során történő veszteségek észlelhetők legyenek. A visszanyeréssel való pontos korrekció érdekében a helyettesítő standardoknak a vizsgált anyagéihoz nagyon hasonló vagy azokkal azonos tulajdonságokkal kell rendelkezniük. Erre a célra lehetőség szerint a vizsgált anyagok izotóppal jelölt (stabil) (például deutériumos vagy C^{13} izotóppal jelölt) analógjait kell használni. Amennyiben jelölt stabil izotópok – azaz C^{13} vagy H^2 – használatára nincs lehetőség, a szakirodalomban közzétett megbízható adatok alapján igazolni kell, hogy a helyettesítő standard fizikai és kémiai tulajdonságai nagyon hasonlóak a vizsgált anyagéihoz. A vizes fázis folyadék-folyadék extrakciója során emulziók képződhetnek. Ez csökkenthető, ha sót adunk a mintához, és hagyjuk az emulziót egy éjszakán át ülepedni. A minták extrahálására és betöményítésére alkalmazott módszereket jegyzőkönyvezni kell.

30. Az 1-oktanolos fázisból nyert minták elemzés előtt megfelelő oldószerrel szükség szerint hígíthatók. Ezen túlmenően javasolt a helyettesítő standardok visszanyeréssel való korrekció érdekében történő alkalmazása az olyan anyagok esetén, amelyeknél a visszanyerési kísérletek tekintetében nagymértékű variáció (10 %-nál nagyobb relatív szórás) volt tapasztalható.

31. Az analitikai módszer részleteit jegyzőkönyvezni kell. Ebbe beleértendő az extrakciós módszer, a betöményítési és hígítási tényező, a műszerek paraméterei, a kalibrálási eljárás, a kalibrálási tartomány, a vizsgált anyag vízből való analitikai visszanyerése, helyettesítő standardok visszanyeréssel való korrekció céljából történő alkalmazása, a vakminták értékei, kimutatási határok és mennyiségi meghatározási határértékek.

A vizsgálat végrehajtása

Optimális 1-oktanol/víz térfogatarányok

32. A víz és az 1-oktanol térfogatának kiválasztásakor figyelembe kell venni az 1-oktanolra és vízre vonatkozó LOQ-t, a vizes mintákra alkalmazott betöményítési tényezőket, az 1-oktanolból és vízből vett minták térfogatát, valamint a várt koncentrációkat. A lassú keveréses rendszerben alkalmazott 1-oktanol térfogatát a kísérlettel összefüggő okokból úgy kell kiválasztani, hogy az 1-oktanol-réteg kellően vastag (> 0,5 cm) legyen ahhoz, hogy az 1-oktanolos fázisból annak felkavarása nélkül lehessen mintát venni.

33. A 4,5 vagy annál nagyobb log P_{OW} értékű vegyületek meghatározásához jellemzően használt fázisarány 20–50 ml 1-oktanol és 950–980 ml víz 1 literes edényben.

▼M4

Vizsgálati körülmények

34. A vizsgálat során a reakcióedényt termosztáttal szabályozzuk, hogy a hőmérséklet-ingadozás 1 °C alá csökkenjen. A vizsgálatot 25 °C-on kell elvégezni.

35. A kísérleti rendszert vagy a kísérlet sötétkamrában való elvégzésével, vagy a reakcióedény alufóliával való bevonásával védeni kell a napfénytől.

36. A kísérletet (a lehetőségekhez mérten) pormentes környezetben kell elvégezni.

37. Az 1-oktanol–víz rendszert az egyensúlyi állapot létrejöttéig keverjük. Egy lassú keveréses kísérletet, valamint a vízből és az 1-oktanolból történő, rendszeres időközönkénti mintavételt magában foglaló előkísérlettel mérjük fel az egyensúlyba hozatalhoz szükséges időt. A mintavételi időpontok között legalább öt órának kell eltelnie.

38. Minden egyes P_{OW}-meghatározást legalább három, egymástól független lassú keveréses kísérlettel kell elvégezni.

Az egyensúlyba hozatali idő meghatározása

39. Abból kell kiindulni, hogy az egyensúlyi állapot akkor jön létre, amikor az 1-oktanol/víz koncentrációs arány idő függvényében meghatározott regressziójának négy megfigyelési időpontot magában foglaló időtartam alatti meredeksége 0,05 értékű p-szint mellett nem tér el szignifikáns mértékben a nullától. A mintavétel megkezdése előtti minimális egyensúlyba hozatali idő egy nap. Általános szabályként az 5-nél kisebb becsült log P_{OW} értékű anyagok mintavételezése a második és a harmadik napon végezhető. Víztaszítóbb vegyületek esetén az egyensúlyba hozatalhoz hosszabb időre lehet szükség. Egy 8,23-nál nagyobb log P_{OW} értékű vegyület (dekaklór-bifenil) esetén 144 óra elegendőnek bizonyult az egyensúlyi állapot kialakulásához. Az egyensúly értékelése egyetlen edényből végzett ismételt mintavétellel történik.

A kísérlet megkezdése

40. A kísérlet kezdetekor a reakcióedényt töltsük meg 1-oktanollal telített vízzel. Kellő időt kell hagyni a termosztált hőmérséklet eléréséhez.

41. A kívánt mennyiségű (szükséges térfogatnyi, vízzel telített 1-oktanolban feloldott) vizsgált anyagot óvatosan töltsük a reakcióedénybe. Ez a kísérlet kritikus lépése, ugyanis kerülendő a két fázis turbulens keveredése. Éppen ezért az 1-oktanolos fázist lassan, a kísérleti edény fala mentén, a vízfelülethez közelről kell pipettával csepegtetni. Az anyag ezt követően lefolyik az üvegfal mentén, és a vizes fázis felett vékony réteget képez. Feltétlenül kerülendő az 1-oktanol közvetlenül a lombikba történő átöntése; az 1-oktanol-cseppek nem hullhatnak közvetlenül a vízbe.

42. A keverés megkezdését követően a keverési sebességet lassan növelni kell. Ha a keverőmotorok nem állíthatók be megfelelően, transzformátor alkalmazását kell megfontolni. A keverési sebességet úgy kell beállítani, hogy a víz és az 1-oktanol határfelületénél 0,5 és legfeljebb 2,5 cm közötti mélységű örvény alakuljon ki. Ha az örvény mélysége meghaladja a 2,5 cm-t, a keverési sebességet csökkenteni kell, máskülönben az 1-oktanol-cseppekből mikrocseppek képződhetnek a vizes fázisban, ami a vizsgált anyag vízben oldott koncentrációjának túlbecsléséhez vezet. A 2,5 cm mélységű örvényt eredményező keverési sebesség a validációs körvizsgálati tanulmány (5) eredményei alapján ajánlott. Ez a sebesség kompromisszumot jelent az egyensúlyi állapot gyors elérése és az 1-oktanol-mikrocseppek keletkezésének korlátozása között.

▼M4

Mintavétel és a minták kezelése

43. A keverőt a mintavétel előtt ki kell kapcsolni, és meg kell várni, amíg a folyadékok mozgása megáll. A mintavétel befejeztével a keverőt alacsony sebességen, a fent leírtaknak megfelelően indítsuk újra, majd a keverési sebességet fokozatosan növeljük.

44. A vizes fázisból való mintavétel a reakcióedény alján található üvegcsapon keresztül történik. A csapok holttérfogatából származó vizet (a 2. függelékben ábrázolt edény esetén ez körülbelül 5 ml) nem szabad felhasználni. A csapokban lévő víz nem keveredik, így nincs egyensúlyban az elegy főtömegével. A vizes minták térfogatát fel kell jegyezni, és ügyelni kell arra, hogy a fel nem használt vízben lévő vizsgált anyagot figyelembe vegyük az anyagmérleg meghatározásakor. Az elpárolgással járó veszteségeket minimalizálni kell azáltal, hogy a vizet óvatosan, a víz–1-oktanol réteg felkavarása nélkül engedjük a választótölcsérbe áramolni.

45. Az 1-oktanol mintavételezése kis mennyiségű (kb. 100 µl) aliquotnak az 1-oktanol-rétegből 100 mikroliteres színüveg-fém fecskendővel való felszívásával történik. Ügyelni kell arra, hogy ne kavarjuk fel a határfelületet. A folyadékminta térfogatát jegyezzük fel. Kis mennyiségű aliquot elegendő, mivel az 1-oktanol-mintát hígítani fogjuk.

46. Kerülendő a minta szükségtelen átöntése. A minta térfogatát éppen ezért gravimetriai módszerrel kell meghatározni. Vízminták esetén ez a vízmintának a szükséges mennyiségű oldószert már tartalmazó választótölcsérbe való gyűjtésével érhető el.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

47. A jelen vizsgálati módszer szerint a P_{OW} meghatározása érdekében három lassú keveréses kísérletet (három kísérleti egységet) végzünk azonos körülmények között a vizsgált vegyületen. Az egyensúlyi állapot létrejöttének igazolására használt regressziónak legalább négy, egymást követő időpontokban végzett C_O-/C_W-meghatározás eredményein kell alapulnia. Ez lehetővé teszi az egyes kísérleti egységek révén kapott átlagérték bizonytalanságának mércéjeként szolgáló szórásnégyzet kiszámítását.

48. A P_{OW} az egyes kísérleti egységek révén nyert adatok szórásnégyzetével jellemezhető. Ezen információk alapján számítjuk ki a P_{OW}-t az egyes kísérleti egységek eredményeinek súlyozott átlagaként. Ehhez a kísérleti egységek eredményei szórásnégyzetének reciprokát használjuk súlyozási tényezőként. Ennek eredményeként a nagy (szórásnégyzetként kifejezett) változékonyságú, tehát kisebb megbízhatóságú adatok kevésbé befolyásolják az eredményt, mint az alacsony szórásnégyzetű adatok.

49. Ezzel analóg módon kell kiszámítani a súlyozott szórást. Ez a P_{OW}-mérés ismételhetőségét jellemzi. A kis súlyozott szórás azt jelenti, hogy a P_{OW}-meghatározás egy adott laboratóriumon belüli ismételhetősége igen magas. Az adatok formális statisztikai feldolgozásának menete az alábbiakban olvasható.

▼M4

Az eredmények feldolgozása

Az egyensúlyi állapot létrejöttének igazolása

50. Minden egyes mintavételi időponthoz számítsuk ki a vizsgált anyag 1-oktanolban és vízben oldott koncentrációja hányadosának logaritmusát (log (C_o/C_w)). A kémiai egyensúly létrejöttét e logaritmus idő függvényében való ábrázolásával igazoljuk. Ha az így kapott görbén legalább négy egymást követő időpontot magában foglaló plató figyelhető meg, az egyensúlyi állapot létrejött, és a vegyület ténylegesen feloldódott az 1-oktanolban. Ellenkező esetben a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a görbe négy egymást követő időpont között olyan meredekséget nem ad, amely 0,05-ös p-szint mellett nem tér el szignifikánsan a 0-tól, ami arra utal, hogy a log C_o/C_w független az időtől.

A log P_{OW} kiszámítása

51. Az adott kísérleti egység log P_{OW} értékét a log C_o/C_w idő függvényében ábrázolt görbéje azon része log C_o/C_w értékeinek súlyozott átlagaként kell kiszámítani, amelynél az egyensúlyi állapot fennállását igazoltuk. A súlyozott átlagot az adatoknak a szórásnégyzet reciprokával történő súlyozásával kell kiszámítani annak érdekében, hogy az adatok végeredményre gyakorolt hatása fordítottan arányos legyen azok bizonytalanságával.

A log P_{OW} átlagértéke

52. A különböző kísérleti egységek log P_{OW} értékének átlagát az egyes kísérleti egységek eredményei átlagának az azokhoz tartozó szórásnégyzettel való súlyozásával kell kiszámítani.

A számítás a következőképpen történik:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

ahol

$\log P_{OW,i}$ = az i-edik önálló kísérleti egység log P_{OW} értéke,

$\log P_{OW,Av}$ = az egyes log P_{OW}-meghatározások súlyozott átlagértéke,

w_i = az i-edik kísérleti egység log P_{OW} értékéhez rendelt statisztikai súlyozási faktor.

A log $P_{OW,i}$ szórásnégyzetének reciprokát használjuk w_i-ként ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$)

53. A log P_{OW} átlagának hibáját az egyes kísérleti egységekben az egyensúlyi fázis során meghatározott log C_o/C_w ismételhetőségeként becsüljük meg. Ezt az értéket a log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$) súlyozott szórásaként fejezik ki, amely pedig a log $P_{OW,Av}$ értékhez kapcsolódó hiba mértéke. A súlyozott szórás a súlyozott szórásnégyzetből ($var_{\log Pow,Av}$) a következőképpen számítható ki:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Az n a kísérleti egységek számát jelöli.

▼M4

Vizsgálati jegyzőkönyv

54. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— közhasználatú név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyag használata esetén a jelölés pozíciójának feltüntetésével), valamint a vonatkozó fizikai és kémiai tulajdonságok (lásd a 17. bekezdést),

— a vizsgált anyag tisztasága (szennyeződései),

— a jelölt vegyi anyagok jelölőanyagának tisztasága és moláris aktivitása (ha szükséges),

— a log P_{ow} előzetes becslése, valamint ezen érték levezetésének módszere.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálatok elvégzésének időpontja,

— kísérleti hőmérséklet,

— az 1-oktanol és a víz térfogata a vizsgálat kezdetekor,

— a kivett 1-oktanol- és vízminták térfogata,

— a reakcióedényekben hátramaradó 1-oktanol és víz térfogata,

— a reakcióedény és a keverési körülmények leírása (a keverőrúd és a reakcióedény geometriai jellemzői, az örvény magassága mm-ben, valamint adott esetben a keverési sebesség),

— a vizsgált anyag meghatározásához használt analitikai módszerek és a mennyiségi meghatározás módszerspecifikus határértéke,

— mintavételi időpontok,

— a vizes fázis pH-ja és a felhasznált pufferek, ha a pH-t ionizálható molekulák miatt be kellett állítani,

— a párhuzamos mérések száma.

Eredmények:

— az alkalmazott analitikai módszerek ismételhetősége és érzékenysége,

— a vizsgált anyag 1-oktanolban és vízben meghatározott koncentrációja az idő függvényében,

— az anyagmérleg bemutatása,

— hőmérséklet és annak szórása, vagy a kísérlet során fennálló hőmérsékleti tartomány,

— a koncentrációarány regressziója az idő függvényében,

— a log $P_{ow,Av}$ átlagértéke és annak standard hibája,

— az eredmények szöveges értékelése és értelmezése,

▼M4

— példák a reprezentatív elemzés alapadataira (az összes alapadatot a helyes laboratóriumi gyakorlat [GLP] szabályainak megfelelően kell tárolni), beleértve a helyettesítő standardok visszanyerését, valamint a kalibráláshoz használt szintek számát (a kalibrációs görbe korrelációs együtthatójára vonatkozó kritériumokkal együtt), továbbá a minőségbiztosítás/minőség-ellenőrzés (QA/QC) eredményeit,

— amennyiben rendelkezésre áll: a vizsgálati eljárás validációs jelentése (a hivatkozások között feltüntetendő).

SZAKIRODALOM

(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) E melléklet A.8., Megoszlási hányados című fejezete.

(3) E melléklet A.8., Megoszlási hányados című fejezete.

(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) E melléklet A.6., Oldhatóság vízben című fejezete.

(11) E melléklet C.7., Lebomlás – abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében című fejezete.

(12) E melléklet C.4., A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása című fejezetének II–VII. része (A–F. módszer).

(13) E melléklet A.4., Gőznyomás című fejezete.

(14) Pinsuwan S, Li A and 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 to 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

1. függelék

Táblázat a különböző LOG P_{OW} értékű vizsgált anyagok vizes fázisban való kimutatásához szükséges legkisebb víztérfogatok kiszámításához

Feltételezések:

— Az egyes aliquotok maximális térfogata = a teljes térfogat 10 %-a; 5 aliquot = a teljes térfogat 50 %-a.

— A vizsgált anyagok koncentrációja $= 0,7 \times$ oldhatóság bármelyik fázisban. Alacsonyabb koncentráció esetén nagyobb térfogat szükséges.

— Az LOD meghatározásához használt térfogat = 100 ml.

— A log P_{ow}–log S_w és log P_{ow}–SR (S_{oct}/S_w) görbékkel a vizsgált anyagokra vonatkozó összefüggések elfogadhatóan megjeleníthetők.

Az S_w becslése

log P_{ow}	Egyenlet	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

Az S_{oct} becslése

log P_{ow}	Egyenlet	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**

Vizsgált anyag összes tömege (mg)	$Tömeg_{okt}/tömeg_{víz}$	$Tömeg_{H2O}$ (mg)	$Konc._{H2O}$ (mg/l)	$Tömeg_{okt}$ (mg)	$Konc._{okt}$ (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

A térfogatok kiszámítása

A H_2O fázis egyes LOD-koncentrációk mellett szükséges minimális térfogata

$\log K_{ow}$	LOD (mikrogramm/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
LOD-hez használt térfogat (l)	0,1					

Jelmagyarázat a számításokhoz

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 1 literes reakcióedényben.

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 2 literes reakcióedényben.

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 5 literes reakcióedényben.

A vizes fázis teljes térfogatának < 10 %-a 10 literes reakcióedényben.

A 10 literes reakcióedény 10 %-ánál is nagyobb.

▼M4

A vízoldékonyság és a log P_{ow} függvényében meghatározott szükséges térfogatok áttekintése

A H_2O fázis egyes LOD-koncentrációk mellett szükséges minimális térfogata (ml)

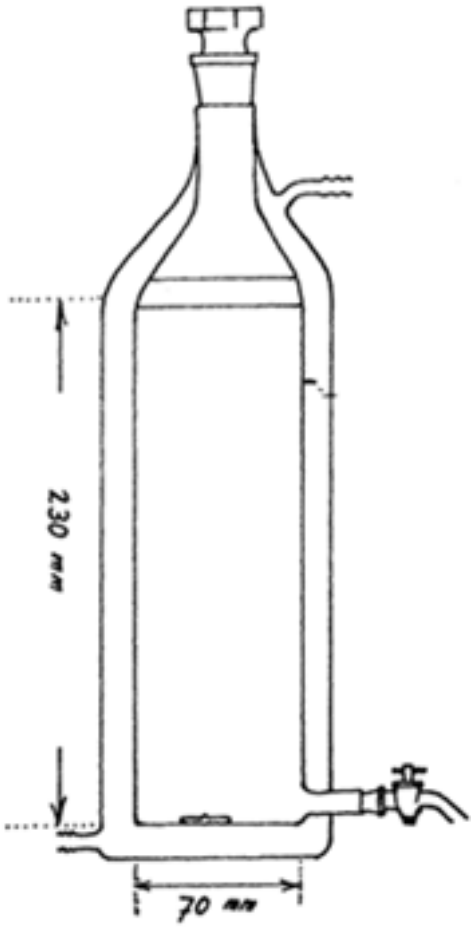
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramm/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	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 (mikrogramm/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
LOD-hez használt térfogat (l)		0,1					

2. függelék

Példa egy kettősfalú üveg reakcióedényre a P_{OW} meghatározására szolgáló lassú keveréses kísérlethez



▼B

B. RÉSZ: MÓDSZEREK A TOXICITÁS ÉS EGYÉB EGÉSZSÉGÜGYI HATÁSOK MEGHATÁROZÁSÁRA

TARTALOMJEGYZÉK

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

B.1a. AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – RÖGZÍTETT DÓZISÚ ELJÁRÁS

B.1b. AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER

B.2. AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS

B.3. AKUT TOXICITÁS (DERMÁLIS)

B.4. AKUT TOXICITÁS: BŐRIRRITÁCIÓ/BŐRKORRÓZIÓS HATÁS

B.5. AKUT TOXICITÁS: SZEMIRRITÁCIÓ/SZEMKORRÓZIÓS HATÁS

B.6. A BŐR ÉRZÉKENNYÉ TÉTELE

B.7. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ, 28 NAPOS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

B.8. SZUBAKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 28 NAPOS VIZSGÁLAT

B.9. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAPOS) TOXICITÁS (DERMÁLIS)

B.10. MUTAGENITÁS – KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VITRO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

B.11. MUTAGENITÁS – KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VIVO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

B.12. MUTAGENITÁS – *IN VIVO* EMLŐS ERITROCITA MIKRONUKLEUSZ VIZSGÁLAT

B.13/14. MUTAGENITÁS: REVERZ MUTAGENITÁSI VIZSGÁLAT BAKTÉRIUMOKKAL

B.15. MUTAGENITÁSVIZSGÁLAT ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS SZŰRÉSE GÉNMUTÁCIÓ VIZSGÁLATA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*-BEN

B.16. MITOTIKUS REKOMBINÁCIÓ-VIZSGÁLAT *SACHAROMYCES CEREVISIAE*- BEN

B.17. MUTAGENITÁS – *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓ VIZSGÁLAT EMLŐSSEJTEKEN

B.18. DNS-KÁROSODÁS ÉS -REPARÁCIÓ – NEM TERVEZETT DNS-SZINTÉZIS (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS, UDS) – EMLŐSSEJTEK *IN VITRO*

B.19. *IN VITRO* EMLŐSSEJTTESTVÉR-KROMATIDKICSERÉLŐDÉS (SISTER CHROMATID EXCHANGE, SCE) VIZSGÁLAT

B.20. NEMHEZ KÖTÖTT RECESSZÍV LETÁLIS VIZSGÁLAT *DROSOPHILA MELANOGASTERBEN*

▼B

B.21.	*IN VITRO* EMLŐSSEJT-TRANSZFORMÁCIÓS VIZSGÁLATOK
B.22.	DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON
B.23.	EMLŐS SPERMIOGONIÁLIS KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉG VIZSGÁLAT
B.24.	EGÉRFOLT- (SPOT) TESZT
B.25.	EGÉREN VÉGZETT ÖRÖKLETES TRANSZLOKÁCIÓS VIZSGÁLAT
B.26.	SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, RÁGCSÁLÓKON VÉGZETT 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
B.27.	SZUBKRÓNIKUSORÁLIS-TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLISTOXICITÁSI VIZSGÁLAT NEM RÁGCSÁLÓKON
B.28.	SZUBKRÓNIKUS DERMÁLIS TOXICITÁSVIZSGÁLAT 90 NAPOS, ISMÉTELT DERMÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓFAJOKON
B.29.	SZUBKRÓNIKUS INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 90 NAPOS VIZSGÁLAT
B.30.	KRÓNIKUS TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK
B.31.	PRENATÁLIS FEJLŐDÉSI TOXICITÁSVIZSGÁLAT
B.32.	A RÁKKELTŐ HATÁS VIZSGÁLATA
B.33.	A KRÓNIKUS TOXICITÁS ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS EGYÜTTES VIZSGÁLATA
B.34.	EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT
B.35.	KÉTGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT
B.36.	TOXIKOKINETIKAI VIZSGÁLAT
B.37.	SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT AKUT KÉSLELTETETT NEUROTOXICITÁS
B.38.	SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT KÉSLELTETETT NEUROTOXOCITÁS-VIZSGÁLAT, 28 NAPOS ISMÉTELT ADAGOLÁS ESETÉN
B.39.	NEM ÜTEMEZETT DNS-SZINTÉZIS (UDS) *IN VIVO* VIZSGÁLAT EMLŐS MÁJSEJTEKKEL
B.40.	*IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: TRANSZKUTÁN ELEKTROMOS REZISZTENCIA VIZSGÁLAT (TER)
B.40 A.	*IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: EMBERI BŐRMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLAT

▼**B**

B.41.	*IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
B.42.	BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER
B.43.	NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN
B.44.	BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VIVO* MÓDSZER
B.45.	BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VITRO* MÓDSZER
B.46.	*IN VITRO* BŐRIRRITÁCIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMON VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER
B.47.	SZARVASMARHA-SZARUHÁRTYA OPACITÁSÁNAK ÉS PERMEABILITÁSÁNAK MÉRÉSÉN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA
B.48.	IZOLÁLT CSIRKESZEM VIZSGÁLATÁN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA
B.49.	*IN VITRO* CELLULÁRIS MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT EMLŐSÖKÖN
B.50.	BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): DA
B.51.	BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52.	AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER

▼B

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A. A VIZSGÁLT ANYAG JELLEMZÉSE

A vizsgált anyag összetételét – beleértve a főbb szennyező anyagokat és a lényeges fizikaikémiai tulajdonságait, ill. az anyag stabilitását – a toxicitás-vizsgálat megkezdése előtt ismerni kell.

A vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságai döntő fontosságúak az adagolási mód kiválasztásánál, az egyes vizsgálatok megtervezésénél, a vizsgált anyag kezelésénél és tárolásánál.

A vizsgált anyagnak (amennyiben lehetséges, a legfontosabb szennyezésekkel együtt) az adagolási közegben és a biológiai anyagban történő mennyiségi és minőségi vizsgálatára vonatkozó analitikai módszer kifejlesztése megelőzi a vizsgálatok megkezdését.

Az azonosításra, a fizikai-kémiai tulajdonságok meghatározására, a tisztaságra és a vizsgált anyag viselkedésére vonatkozó összes információnak szerepelnie kell a vizsgálati jelentésben.

B. AZ ÁLLATOK GONDOZÁSA

A környezeti feltételek szigorú szabályozása és az állatoknak a fajnak megfelelő gondozása nagyon lényeges a toxicitásvizsgálatoknál.

i. *Tartási körülmények*

A kísérleti állatok elhelyezésének környezeti körülményit az adott faj igényeihez kell igazítani. Patkányok, egerek és tengerimalacok számára a megfelelő körülmények: 22 ± 3 ºC szobahőmérséklet, 30–70 százalékos relatív páratartalom mellett; míg nyulak számára a megfelelő körülmények: 20 ± 3 ºC hőmérséklet, 30–70 százalékos relatív páratartalom.

Néhány kísérleti eljárás különösen érzékeny a hőmérsékleti hatásokra, ezekben az esetekben a megfelelő környezeti körülményekre vonatkozó részleteket a vizsgálati módszer leírása tartalmazza. A toxikus hatások kutatása során, a hőmérsékletet és a páratartalmat minden esetben figyelni és rögzíteni kell és meg kell adni a vizsgálati jelentésben.

A világítás mesterséges, a világos és sötét szakaszok 12 óránként váltják egymást. A világításra vonatkozó adatokat feljegyzik és megadják a vizsgálati jelentésben.

Hacsak a módszer leírásában más nem szerepel, az állatok egyenként tartandók, vagy kis, azonos nemű egyedekből álló csoportokban összezárhatók; csoportos tartás esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható.

Az állatkísérletekről szóló jelentésében fontos megadni az állatok ketrecének típusát és az egyes ketrecekben tartott állatok számát, a vegyszer hatásának kitett időszak és az azt követő megfigyelés alatt egyaránt.

▼B

ii. *Etetési körülmények*

Az alkalmazott táplálóknak meg kell felelnie a vizsgált fajnak megfelelő, a táplálkozástudomány által meghatározott követelményeknek. Amikor a vizsgált anyagokat az állatok táplálékában adják be, akkor a tápértéket az anyag és a táplálék összetevőinek kölcsönhatása csökkentheti. Egy ilyen kölcsönhatás lehetőségét figyelembe kell venni a vizsgálat eredményeinek értelmezése során. Hagyományos laboratóriumi táplálás alkalmazható korlátozás nélküli ivóvízellátással. A táplálék típusának kiválasztását befolyásolhatja, hogy a táplálóknak és a vizsgált anyagnak a megfelelő keverékét kell biztosítani, ha ilyen módon adagolják a vizsgált anyagot.

A táplálék olyan szennyezései, amelyekről ismert, hogy befolyásolják a toxicitást, nem lehetnek jelen zavaró nagyságú koncentrációban.

C. **ALTERNATÍV VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**

Az Európai Unió elkötelezett olyan alternatív módszerek kifejlesztése és jóváhagyása támogatására, amelyek az ismereteket ugyanolyan szinten biztosítják, mint a jelenlegi állatkísérletek, azonban kevesebb állatot használnak fel, kevesebb szenvedést okoznak az állatoknak vagy teljesen kiküszöbölik az állatok alkalmazását.

Ilyen módszerek alkalmazását (amint elérhetővé válnak), ahol csak lehet, meg kell fontolni, a veszély jellemzésével, az azt követő osztályozással, címkézéssel és az anyag belső tulajdonságaiból adódó veszély jelölésével kapcsolatos eljárásokban.

D. **KIÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS**

A vizsgálatok kiértékelésekor és értelmezésekor figyelembe kell venni azt, hogy az állati és az *in vitro* vizsgálatok eredményét milyen mértékben lehet közvetlenül kiterjeszteni az emberre, és ezért az emberre káros hatás bizonyítékait, ahol rendelkezésre állnak, fel lehet használni a vizsgálati eredmények megerősítésére.

E. **SZAKIRODALOM**

Ezeknek a módszereknek a többségét a Vizsgálati irányelvek elnevezésű OECD-program keretében fejlesztették ki, és azokat a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat alapelveivel összhangban kell alkalmazni, az „adatok kölcsönös elfogadásának” széles körű biztosítása érdekében.

További tájékoztatás található az OECD-irányelvekben megadott szakirodalom jegyzékekben, illetve az egyéb helyeken kiadott vonatkozó irodalomban.

▼B

B.1a. **AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – RÖGZÍTETT DÓZISÚ ELJÁRÁS**

1. **MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 420 (2001) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Az akut toxicitás megállapítására szolgáló hagyományos módszerek esetében a vizsgálat végpontját az állatok elpusztulása jelenti. A Brit Toxikológiai Társaság 1984-ben új megközelítést javasolt az akut toxicitás vizsgálatára, amely egy sor rögzített nagyságú dózis beadásán alapul (1). Ennél a megközelítésnél nem az állatok elpusztulása jelenti a vizsgálat végpontját, hanem a rögzített nagyságú dózisok valamelyikénél megfigyelt egyértelmű mérgezési tünetekre támaszkodtak. Az Egyesült Királyságban (2) és nemzetközileg (3) végzett *in vivo* validálási vizsgálatok után az eljárást 1992-ben hagyták jóvá mint vizsgálati módszert. Ezt követően egy vizsgálati sorozat (4)(5)(6) keretében matematikai modellek segítségével megvizsgálták a rögzített dózisú eljárás statisztikai tulajdonságait. Az *in vivo* és a modellvizsgálatok együttesen igazolták, hogy az eljárás reprodukálható, kevesebb kísérleti állatra van szükség hozzá, és kevesebb szenvedést okoz, mint a hagyományos módszerek, továbbá hasonló módon képes minősíteni az anyagokat, mint az egyéb akut toxicitási vizsgálati módszerek.

Arról, hogy egy adott célra melyik a legmegfelelőbb vizsgálati módszer, az Akut Orális Toxicitási Vizsgálatok Útmutatójában (7) található iránymutatás. Ez az útmutató további információkat is tartalmaz az 1Ba. vizsgálati módszer alkalmazásával és értelmezésével kapcsolatosan.

A módszer egyik alapelve, hogy a fő vizsgálatban csak közepesen toxikus dózisokat alkalmaznak, és hogy kerülni kell az olyan dózisok alkalmazását, amelyek várhatóan letálisak. Nincs szükség továbbá olyan dózisok alkalmazására sem, amelyek korróziós vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt kifejezett fájdalmat vagy szorongást okoznak. Az elhullás közelében lévő állatokat vagy azokat, amelyek nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködnek, vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutatják, humánus módon exterminálni kell, és ugyanúgy kell figyelembe venni őket a vizsgálati eredmények értelmezésekor, mint azokat az állatokat, amelyek elhullottak a vizsgálatok során. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok exterminálására vonatkozó döntési kritériumok egy másik útmutatóban (8) találhatók.

A módszer adatokat szolgáltat az anyag veszélyes tulajdonságairól és lehetővé teszi, hogy az anyagot az akut toxicitást okozó anyagok besorolására szolgáló Globálisan harmonizált rendszer (Globally Harmonised System, GHS) szerint minősítsék és sorolják be (9).

A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk az anyag megjelölése és kémiai szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, az anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei; szerkezetileg rokon anyagok toxikológiai adatai és az anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a megfelelő kezdődózis kiválasztását.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut orális toxicitás: a vizsgálandó anyag egyszeri vagy 24 órán belül többszöri dózisának szájon át történő beadását követően jelentkező káros hatások.

Késleltetett elhullás: egy állat 48 órán belül nem hull el, illetve nem tűnik elhullásközeli állapotban lévőnek, de később, a 14 napos megfigyelési időszak során elpusztul.

Dózis: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (pl. mg/kg) fejezik ki.

Nyilvánvaló toxicitás: a vizsgálandó anyag beadását követően jól látható mérgezési tüneteket leíró általános kifejezés (a példákat lásd a (3) hivatkozásban), amelynél a következő legmagasabb rögzített dózis esetében a legtöbb állatnál súlyos fájdalom vagy súlyos szorongás tartós jelei, elhullásközeli állapot (az ezzel kapcsolatos kritériumok a Humane Endpoints Guidance Documentben (8) szerepelnek), vagy valószínű elhullás várható.

GHS: Globálisan harmonizált osztályozási rendszer vegyi anyagokhoz és keverékekhez. Az OECD (emberi egészség és környezet), az ENSZ Veszélyes Anyagok Szállításának Szakértői Bizottsága (fizikai-kémiai tulajdonságok) és az ILO (veszély nyilvánosságra hozatala) közös tevékenysége, amelyet a Szervezetek közötti program a vegyi anyagok helyes kezelésére (Interorganisation Programme of the Sound Management of Chemicals, IOMC) koordinál.

Közeli elhullás: amikor a legközelebbi tervezett megfigyelés időpontja előtt elhullásközeli állapot kialakulása vagy elhullás várható. Rágcsálók esetében erre utaló jelek lehetnek a görcsök, az oldalhelyzet, a fekvőhelyzet és a remegés. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (8)).

LD_{50}: (közepes letális dózis): a vizsgálandó anyag statisztikailag levezetett egyszeri olyan dózisa, amely orálisan beadva az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50}-értéket a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

Határdózis: egy, a vizsgálhatóság felső határánál lévő dózis (2 000 vagy 5 000 mg/kg).

Elhullásközeli állapot: az esetleges kezelés ellenére is az elhullás közelében lévő állapot vagy túlélésre való képtelenség. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (8)).

Megjósolható elhullás: a kísérlet tervezett vége előtt, a jövőben egy ismert időpontban való elhullásra utaló klinikai tünetek megléte, például: a víz vagy az élelem elérésére való képtelenség. (A további részleteket lásd Humane Endpoints Guidance Documentben (8)).

▼B

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Azonos ivarba tartozó állatok csoportjainak egy lépcsőzetes eljárás során 5, 50, 300 és 2 000 mg/kg-os rögzített dózisok alkalmazásával kell beadni a vizsgálandó anyagot (kivételes esetben egy további, 5 000 mg/kg-os rögzített dózis is alkalmazható; lásd az 1.6.2. szakaszt). A kiindulási dózist a dózisbehatároló vizsgálat alapján kell megválasztani úgy, hogy az várhatóan mérgezési tüneteket eredményezzen, de ne okozzon súlyos mérgezést vagy elhullást. A fájdalomhoz, szenvedéshez és közeli elhulláshoz társuló klinikai tüneteket és állapotot részletesen egy külön OECD Útmutató (8) ismerteti. A mérgezési tünetek megjelenésétől vagy az elhullás bekövetkeztétől vagy ezek elmaradásától függően további állatcsoportok is kezelhetők magasabb vagy alacsonyabb rögzített dózissal. Az eljárást folytatni kell, amíg meg nem találják azt a dózist, amely nyilvánvaló toxicitást vagy legfeljebb egy elhullást okoz, vagy ha a legmagasabb dózisnál nem figyelnek meg semmilyen hatást, vagy ha a legalacsonyabb dózisnál elhullanak állatok.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általában nőstényeket használnak (7). Ennek az az oka, hogy a hagyományos LD_{50}-vizsgálatokra vonatkozó szakirodalom áttekintése alapján általában kicsi a különbség a nemek érzékenysége között, de azokban az esetekben, amikor megfigyelhető különbség, a nőstények általában valamivel érzékenyebbek (10). Azonban ha a szerkezetileg rokon vegyületek toxikológiai vagy toxikokinetikai tulajdonságaival kapcsolatos adatok szerint a hímek nagyobb érzékenysége valószínűsíthető, akkor hímeket kell alkalmazni. Megfelelően meg kell indokolni, ha a vizsgálatot hímekkel végzik.

Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolás megkezdésekor az állatoknak 8–12 hetesnek kell lenniük, és testtömegük nem térhet el ± 20 %-nál többel az esetlegesen korábban kezelt állatok testtömegének átlagától.

1.4.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti állatokat 22 °C (± 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. Az állatokat lehet vizsgált dózisonként egy ketrecben tartani, de az egy ketrecben lévő állatok számát úgy kell megválasztani, hogy az ne zavarja az egyes állatok megfigyelését.

1.4.3. **Az állatok előkészítése**

Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, majd egyedi azonosítóval kell ellátni, és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben kell tartani őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

▼B

1.4.4. **A dózisok előkészítése**

A vizsgálandó anyagokat általában a vizsgálandó dózistartományon belül állandó térfogatban kell beadni úgy, hogy a dóziskészítmény koncentrációját változtatják. Azonban ha folyékony végterméket vagy keveréket vizsgálnak, a vizsgálatot követő kockázatértékelés szempontjából megfelelőbb lehet, ha a vizsgálandó anyagot hígítatlanul, azaz állandó koncentrációban alkalmazzák, illetve egyes szabályozó hatóságok ezt írják elő. A maximálisan beadható dózistérfogatot azonban egyik esetben sem szabad túllépni. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, a kísérleti állat méretétől függ. Rágcsálók esetében a térfogat általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt: vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömegarány is megfontolható. A dóziskészítmény formulázásakor – ahol lehet – a vizes oldatok/-szuszpenziók/emulziók alkalmazása javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatok/szuszpenziók/emulziók, és harmadsorban esetlegesen más vivőanyagokban elkészített oldatok. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A dózisokat a beadás előtt rövid idővel kell elkészíteni, kivéve, ha ismert és igazoltan elfogadható a készítmény stabilitása az alkalmazás időtartama alatt.

1.5. ELJÁRÁS

1.5.1. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban, gyomorszondán vagy egy megfelelő intubációs kanülön át történő táplálással kell beadni. Abban a rendkívüli esetben, ha nem lehetséges egyetlen dózist alkalmazni, a dózis egy 24 órát nem meghaladó időtartam alatt kisebb részletekben is beadható.

A kezelés előtt az állatokat éheztetni kell (pl. patkány esetében egy éjszakán át meg kell vonni a táplálékot, de a vizet nem; egér esetében 3–4 órára kell megvonni a táplálékot, de a vizet nem). A koplaltatási időszakot követően meg kell mérni az állatok testtömegét, majd be kell adni a vizsgálandó anyagot. Az anyag beadása után a táplálékot újra meg lehet vonni -patkány esetében 3–4 órára, egér esetében 1–2 órára. Ha egy dózist részletekben adnak be, a beadás időtartamától függően menet közben szükség lehet arra, hogy az állatoknak táplálékot és vizet adjanak.

1.5.2. **Dózisbehatároló vizsgálat**

A dózisbehatároló vizsgálat célja, hogy ki lehessen választani a megfelelő kezdődózist a fő vizsgálathoz. A vizsgálandó anyagot az 1. függelékben bemutatott folyamatábra szerint egymás után kell beadni egy-egy állatnak. A dózisbehatároló vizsgálat akkor fejeződik be, amikor meghozható a döntés a fő vizsgálatban alkalmazandó kezdődózisról (vagy ha a legalacsonyabb rögzített dózisnál elhullás történik).

A dózisbehatároló vizsgálatban a kezdődózist a következő rögzített dózisok közül választják ki: 5, 50, 300 és 2 000 mg/kg aszerint, hogy a lehetőleg ugyanezzel az anyaggal vagy szerkezetileg rokon anyagokkal kapott *in vivo* vagy *in vitro* adatok alapján várhatóan melyik eredményez nyilvánvaló toxicitást. Ilyen információk hiányában a kezdődózist 300 mg/kg-ban kell megállapítani.

Az egyes állatok kezelése között legalább 24 órának el kell telnie. Minden állatot legalább 14 napig megfigyelés alatt kell tartani.

▼B

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha konkrét jogszabályi követelmény indokolja, megfontolás tárgyává lehet tenni egy további, 5 000 mg/kg-os felső rögzített dózis alkalmazását (lásd a 3. függeléket). Az állatok kímélete érdekében a GHS 5. kategóriában (2 000–5 000 mg/kg tartomány) nem ajánlott állatokkal kísérletezni, és csak abban az esetben szabad ilyet tervezni, ha nagy a valószínűsége, hogy egy ilyen vizsgálat eredményei közvetlen jelenőséggel bírnak az emberi vagy állati egészség, illetve a környezet védelme szempontjából.

Olyan esetekben, amikor a dózisbehatároló vizsgálatban a legalacsonyabb rögzített dózissal (5 mg/kg) kezelt állat elhullik, az általános eljárás szerint be kell fejezni a vizsgálatot és az anyagot a GHS 1. kategóriába kell besorolni (ahogyan az az 1. függelékben látható). Ha azonban szükség van a besorolás további megerősítésére, az alábbiak szerinti opcionális kiegészítő eljárás alkalmazható. Egy második állatnak is beadjuk az 5 mg/kg-os dózist. Ha ez is elhullik, akkor az megerősíti a GHS 1. kategóriába való besorolást, és a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha a második állat életben marad, akkor legfeljebb három további állaton kell elvégezni az 5 mg/kg-os dózissal történő vizsgálatot. Mivel nagy az elhullás kockázata, az állatok kímélete érdekében egymás után kell őket kezelni. Az egyes állatok kezelése között eltelt időt úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen annak megállapítására, hogy az előzőleg kezelt állat valószínűleg életben marad. Ha egy második állat is elhullik, azonnal be kell fejezni a kezeléseket, és több állatnak már nem szabad beadni az anyagot. Mivel a második elhullás bekövetkezte miatt (függetlenül attól, hogy a vizsgálatok befejezéséig hány állatot kezeltek) az „A” eredményhez jutnak (legalább 2 elhulláseset), a 2. függelék 5 mg/kg-os rögzített dózisánál érvényes besorolási szabályt kell követni (ha legalább 2 elhullás történt, akkor 1. kategória, ha legfeljebb 1 elhullás történt, akkor 2. kategória). A 4. függelékben pedig azzal kapcsolatos útmutatást tartalmaz, hogy az új GHS bevezetéséig az anyagokat hogyan kell az EU-rendszer szerinti kategóriákba besorolni.

1.5.3. **Fő vizsgálat**

1.5.3.1. *Az állatok száma és a dózisok*

A kezdődózissal történő vizsgálat utáni teendőket a 2. függelékben található folyamatábra mutatja. Három lehetséges alternatíva létezik: vagy le kell állítani a vizsgálatot, és be kell sorolni az anyagot a megfelelő veszélyességi kategóriába, vagy magasabb rögzített dózissal kell folytatni a vizsgálatot, vagy alacsonyabb rögzített dózissal. Az állatok védelme érdekében azonban a fő vizsgálatban már nem szabad olyan dózissal kísérletezni, amely a dózisbehatároló vizsgálatban elhullást okozott (lásd a 2. függeléket). A tapasztalatok azt mutatják, hogy a kezdődózissal végzett vizsgálatok legvalószínűbb eredménye, hogy az anyagot be lehet valamilyen kategóriába sorolni és nincs szükség további vizsgálatokra.

Általában összesen öt-öt, azonos ivarú állatnak kell beadni az egyes vizsgált dózisokat. Ebből az öt állatból egyet a dózisbehatároló vizsgálat során kezelnek az adott dózissal, és ehhez járul a további négy állat (kivéve abban a szokatlan esetben, ha a fő vizsgálatban használt dózist nem alkalmazták a dózisbehatároló vizsgálatban).

Az egyes dózisok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő dózissal történő kezelését nem szabad megkezdeni mindaddig, amíg meg nem bizonyosodtak arról, hogy az előzőleg kezelt állatok életben maradnak. Szükség esetén ajánlott ez egyes dózisokkal való kezelések között 3 vagy 4 napos szünetet tartani, hogy meg lehessen figyelni a késleltetett toxicitást. Ennek időtartama szükség esetén – pl. nem meggyőző válasz esetében –módosítható.

▼B

Ha egy felső, 5 000 mg/kg-os dózis alkalmazást is tervbe vesznek, a 3. függelékben vázolt eljárást kell követni (lásd még az 1.6.2. szakaszt).

1.5.3.2. *Határérték-vizsgálat*

Határérték-vizsgálatot elsősorban olyan helyzetekben kell végezni, ha a kísérletet végzőnek olyan információi vannak, amelyek szerint a vizsgálandó anyag valószínűleg nem toxikus, azaz csak a hatósági határértékdózisok felett toxikus. A vizsgálandó anyag toxicitásával kapcsolatban hasonló vegyületek vagy keverékek vagy termékek vizsgálataiból szerezhető információ, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, illetve azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

Ezen iránymutatás céljára határérték-vizsgálatként a normál eljárás alkalmazásával történő, 2 000 mg/kg-os (vagy kivételes esetben 5 000 mg/kg-os) kezdődózissal végzett dózisbehatároló vizsgálat, majd ezt követően további négy állat ugyanezzel a dózissal történő kezelése szolgál.

1.6. MEGFIGYELÉSEK

Az állatokat a dózis beadása után egyedileg kell megfigyelni, legalább az első 30 percben, azután az első 24 órában rendszeres időközönként, amelynek során különös figyelemmel kell őket kísérni az első 4 órában, majd ezt követően naponta, összesen 14 napon át, kivéve, ha az állatot állatjóléti okok miatt ki kell venni a vizsgálatból, és humánus módon exterminálni kell, vagy ha az állat elhullik. A megfigyelés időtartamát azonban nem szabad mereven meghatározni. Ezt a mérgezési reakciók, illetve a gyógyulás kezdete és időtartama alapján kell meghatározni, és ilyen módon szükség esetén meg lehet hosszabbítani. Fontos a mérgezési tünetek megjelenésének, illetve megszűnésének időpontja, különösen, ha a mérgezési tünetek inkább késleltetve jelentkeznek (11). Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort vesznek fel.

Ha a mérgezési tünetek tartósak, további megfigyelésekre van szükség. Meg kell figyelni a bőr és a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák, valamint a légzési és a keringési rendszer, az autonóm és a központi idegrendszer, illetve a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési mintázatok változásait. Figyelemmel kell lenni remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma előfordulására is. A Humane Endpoints Guidance Documentben összefoglalt alapelveket és követelményeket is figyelembe kell venni (8). Humánus módon exterminálni kell az elhullásközeli állapotban lévő állatokat, illetve azokat, amelyek súlyos fájdalom vagy tartós szorongás jeleit mutatják. Ha az állatokat humánus okok miatt exterminálni kell, vagy elhullanak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját is.

1.6.1. **Testtömeg**

Röviddel a vizsgálandó anyag beadása előtt és legalább egy héttel utána minden állat testtömegét egyenként meg kell mérni. A testtömeg-változást ki kell számítani és fel kell jegyezni. A vizsgálat végén az életben maradt állatokat újra meg kell mérni, majd humánus módon exterminálni kell őket.

▼B

1.6.2. **Kórbonctani vizsgálat**

Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni (azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt ki kellett venni a vizsgálatból). Minden állat esetében az összes makroszkópos kórtani elváltozást fel kell jegyezni. A kezdődózis beadása után legalább 24 óráig túlélő állatok esetében tervbe lehet venni a makroszkópos kórtani elváltozást mutató szervek mikroszkópos vizsgálatát is, mivel abból hasznos információk nyerhetők.

2. **ADATOK**

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden vizsgálati csoportra vonatkozóan mutassa a csoportban lévő kísérleti állatok számát, valamint azoknak a számát, amelyeknél mérgezési tünetek láthatók, amelyek a vizsgálat során elhullottak vagy humánus módon exterminálásra kerültek, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek megfelelő módon a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai megjelenés, tisztaság és ha releváns, a fizikai-kémiai tulajdonságok (ezen belül az izomerizáció is),

— azonosító adatok, ezen belül a CAS-szám.

Vivőanyag (szükség esetén):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs,

— az állatok mikrobiológiai státusza, feltéve, hogy ismert,

— az állatok száma, életkora és ivara (ezen belül adott esetben annak oka, hogy nőstények helyett miért hímeket alkalmaztak),

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.

Kísérleti körülmények:

— a vizsgálandó anyag formulázására vonatkozó információk, ezen belül a beadott anyag fizikai formájával kapcsolatos adatok,

— a vizsgálandó anyag beadására vonatkozó információk, ezen belül a beadott térfogat és a beadás időpontja,

— a táplálék és a víz minősége (ezen belül a takarmány típusa/-forrása, a víz forrása),

— a kezdődózis kiválasztásának indoklása.

▼B

Eredmények:

— a válaszadatok és a dózisok táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és elhullt állatokra; a hatások jellege, súlyossága és időtartama),

— a testtömegadatok és a testtömegváltozások táblázatos formában történő megadása,

— az egyes állatok testtömege a dózis beadásának napján, azt követően hetente, valamint az elhullás vagy exterminálás időpontjában,

— a tervezett exterminálás előtti elhullás napja és ideje,

— a mérgezési tünetek megjelenése és időbeli lefolyása, valamint esetleges visszafordíthatósága minden egyes állatra vonatkozóan,

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények diszkussziója és értelmezése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (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., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 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 procedure. 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 Assessment N. 19.

▼B

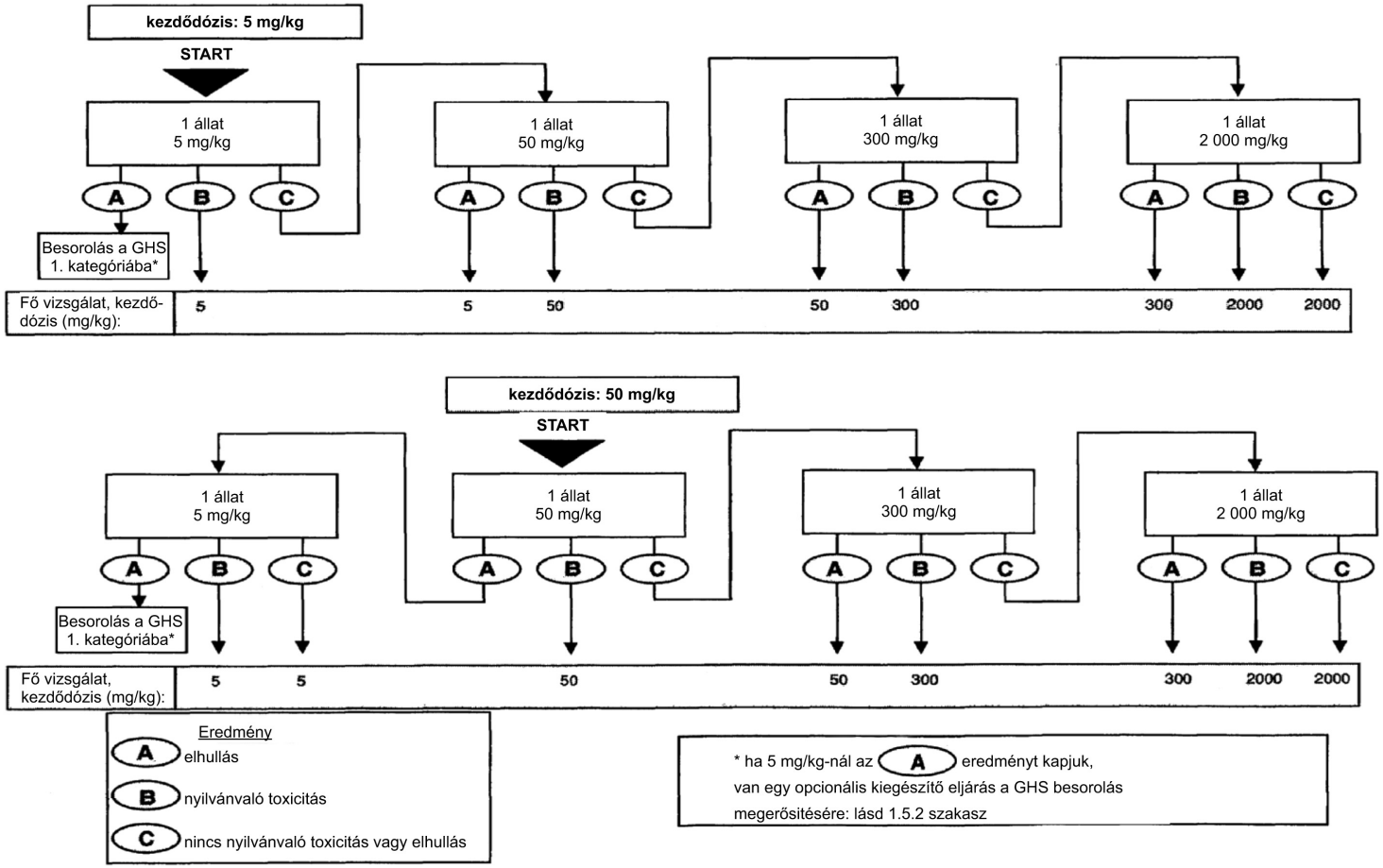
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/-pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

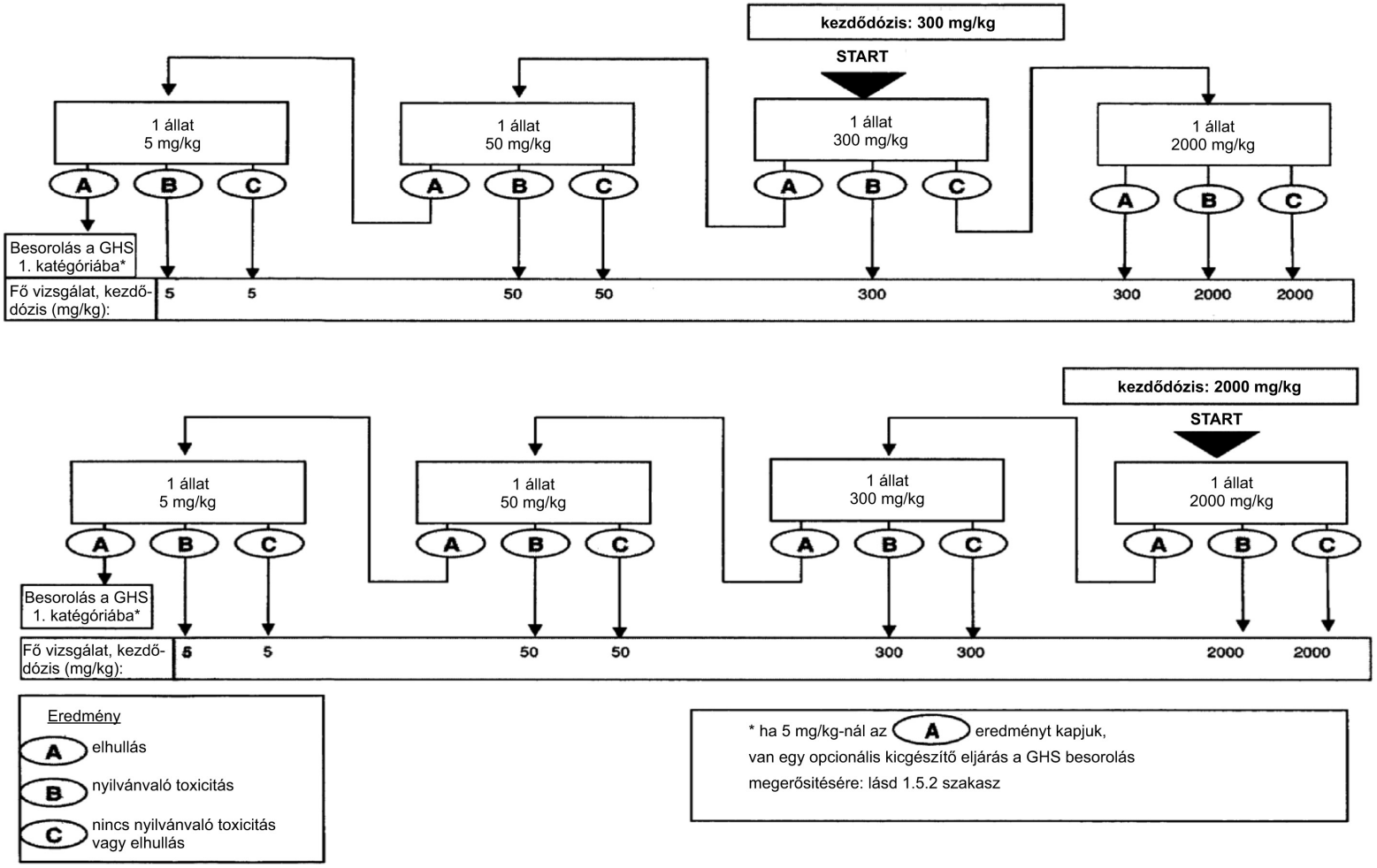
(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I. Goddard, M., Segal, L., Springer, J. A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33,223-231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (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.

1. FÜGGELÉK

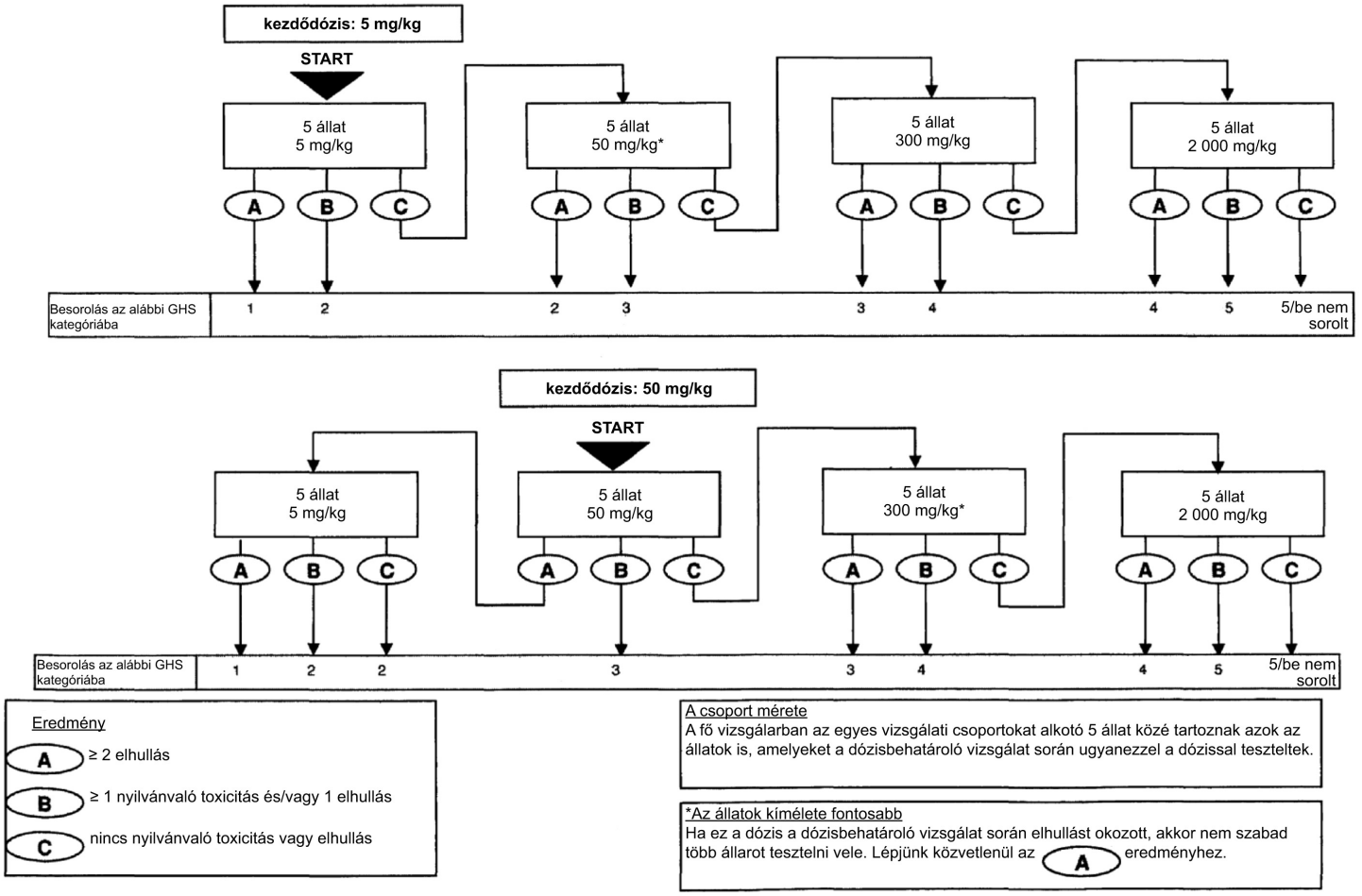
A DÓZISBEHATÁROLÓ VIZSGÁLAT FOLYAMATÁBRÁJA

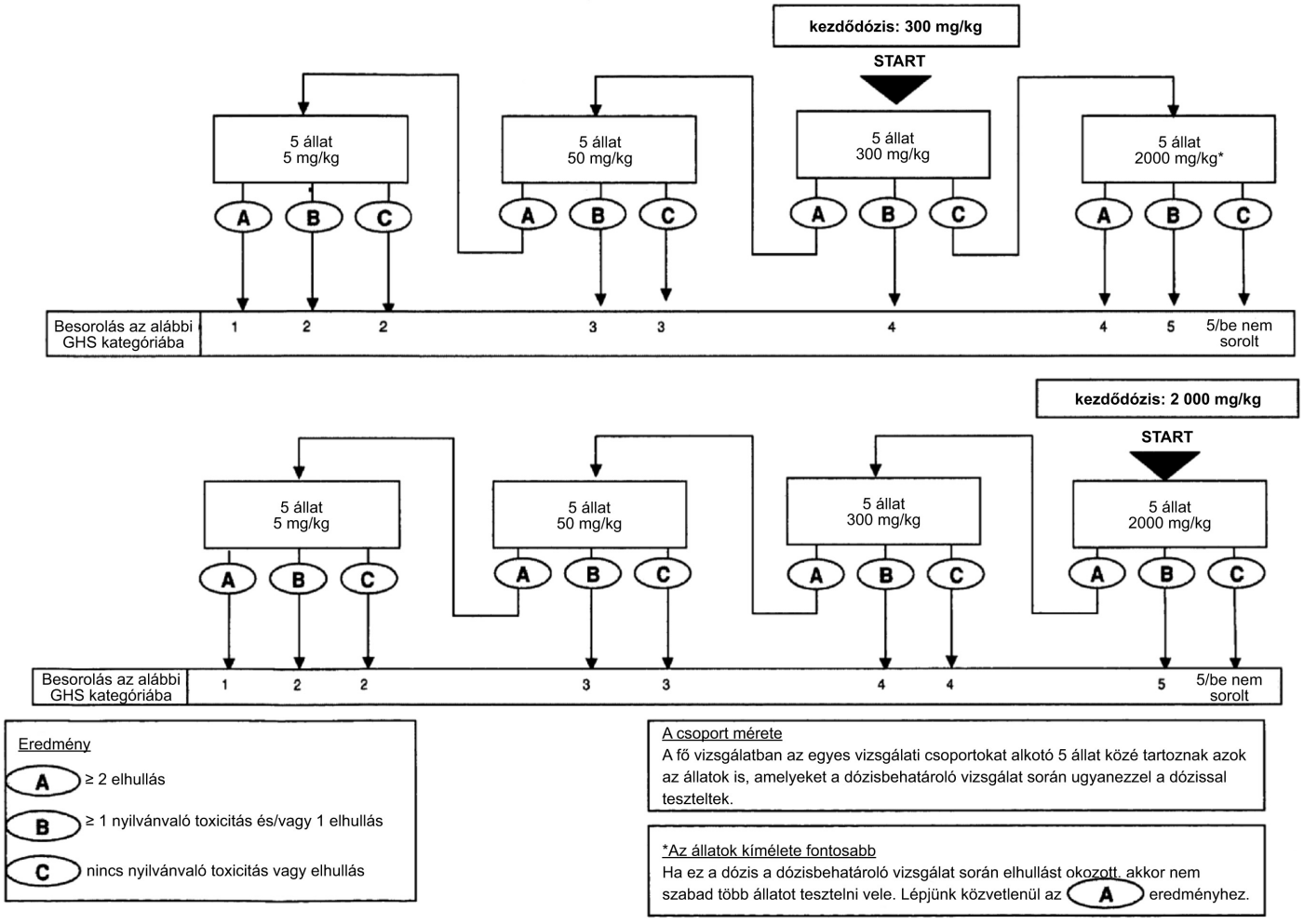



kezdődózis: 300 mg/kg
START
1 állat
5 mg/kg
1 állat
50 mg/kg
1 állat
300 mg/kg
1 állat
2000 mg/kg
A
B
C
Besorolás a GHS
1. katégóriába*
Fő vizsgálat, kezdő-
dózis (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
kezdődózis: 2000 mg/kg
START
1 állat
5 mg/kg
1 állat
50 mg/kg
1 állat
300 mg/kg
1 állat
2000 mg/kg
A
B
C
Besorolás a GHS
1. katégóriába*
Fő vizsgálat, kezdő-
dózis (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Eredmény
A elhullás
B nyilvánvaló toxicitás
C nincs nyilvánvaló toxicitás
vagy elhullás
* ha 5 mg/kg-nál az A eredményt kapjuk,
van egy opcionális kicgészítő eljárás a GHS besorolás
megerősitésére: lásd 1.5.2 szakasz

2. FÜGGELÉK:

A FŐ VIZSGÁLAT FOLYAMATÁBRÁJA




kezdődózis: 300 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2000 mg/kg*
A
B
C
Besorolás az alábbi GHS kategóriába
1
2
2
3
3
4
4
5
5/be nem sorolt
kezdődózis: 2 000 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2000 mg/kg
Besorolás az alábbi GHS kategóriába
1
2
2
3
3
4
4
5
5/be nem sorolt
Eredmény
A ≥ 2 elhullás
B ≥ 1 nyilvánvaló toxicitás és/vagy 1 elhullás
C nincs nyilvánvaló toxicitás vagy elhullás
A csoport mérete
A fő vizsgálatban az egyes vizsgálati csoportokat alkotó 5 állat közé tartoznak azok az állatok is, amelyeket a dózisbehatároló vizsgálat során ugyanezzel a dózissal teszteltek.
*Az állatok kímélete fontosabb
Ha ez a dózis a dózisbehatároló vizsgálat során elhullást okozott, akkor nem szabad több állatot tesztelni vele. Lépjünk közvetlenül az A eredményhez.

▼B

3. FÜGGELÉK

A VÁRHATÓAN 2 000 MG/KG FELETTI LD_{50}-ÉRTÉKKEL RENDELKEZŐ VIZSGÁLANDÓ ANYAGOK VIZSGÁLATOK NÉLKÜLI OSZTÁLYOZÁSÁNAK KRITÉRIUMAI

Az 5. veszélyességi kategória kritériumait úgy állapították meg, hogy lehetővé tegyék azoknak a vizsgálandó anyagoknak a meghatározását, amelyek akut toxicitási kockázata viszonylag alacsony, de bizonyos körülmények között veszélyt jelenthetnek az érzékeny populációkra. Az ilyen anyagok orális vagy dermális LD50-értéke várhatóan 2 000 és 5 000 mg/kg közötti tartományban van, vagy ezzel egyenértékű dózisoknak megfelelő az egyéb beadási módok esetében. A vizsgálandó anyagokat az alábbi esetekben lehet a 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg veszélyességi kategóriába (GHS 5. kategória) sorolni:

a) ha a 2. függelékben bemutatott, az elhullási gyakoriságon alapuló vizsgálati sémák bármelyike szerint ebbe a kategóriába kell sorolni;

b) ha hitelt érdemlő bizonyíték van már arra, hogy az anyag LD50-értéke az 5. kategóriában megadott tartományba esik; vagy más állatkísérletek vagy humán toxikus hatások akut jellegű humán egészségügyi veszélyt jeleznek;

c) adatok extrapolálásával, becslésével vagy mérésével, ha egy veszélyesebb osztályba való besorolás nem indokolt, és

   — hitelt érdemlő információk állnak rendelkezésre, amelyek emberben jelentős toxikus hatásokra utalnak, vagy

   — a legfeljebb a 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett, orális beadási móddal történő vizsgálatok során elhullás történt, vagy

   — ha legfeljebb a 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett vizsgálat alapján a szakértők véleménye megerősíti a toxicitás szignifikáns klinikai tüneteit, kivéve a hasmenést, szőrmeredezést vagy gondozatlan megjelenést, vagy

   — ha a szakértők véleménye megerősíti azokat a hitelt érdemlő információkat, amelyek más állatkísérletekben tapasztalt szignifikáns akut hatásokat valószínűsítenek.

2 000 MG/KG FELETTI DÓZISOKKAL TÖRTÉNŐ VIZSGÁLAT

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha ezt konkrét jogszabályi követelmény indokolja, tervbe lehet venni egy további felső, 5 000 mg/kg-os rögzített dózis alkalmazást. Az állatok jólétének védelme iránti igényt elismerve nem ajánlott az 5 000 mg/kg-os dózis alkalmazása, és csak akkor szabad fontolóra venni, ha nagy a valószínűsége, hogy az ilyen vizsgálatok eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az állati vagy emberi egészség védelme szempontjából (9).

Dózisbehatároló vizsgálat

Az 1. függelékben bemutatott lépcsőzetes eljárás során irányadó döntési szabályokat ki lehet terjeszteni úgy, hogy 5 000 mg/kg-os dózisszintet is lehessen alkalmazni. Ha tehát a dózisbehatároló vizsgálathoz 5 000 mg/kg-os kezdődózist alkalmaznak, az „A” eredmény (elhullás) esetén egy második állatnak 2 000 mg/kg-os dózist kell beadni. „B” vagy „C” eredmény esetén (nyilvánvaló toxicitás vagy nincs toxicitás) a fő vizsgálatban 5 000 mg/kg-os kezdődózis is alkalmazható. Hasonló módon, ha az 5 000 mg/kg-os dózistól eltérő kezdődózist alkalmaznak, a 2 000 mg/kg-os dózis alkalmazásakor kapott „B” vagy „C” eredmény esetén a vizsgálatot 5 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha ezt követően az „A” eredményhez jutnak, a fő vizsgálatban 2 000 mg/kg-os kezdődózist kell alkalmazni, „B” vagy „C” eredmény esetén pedig 5 000 mg/kg-os kezdődózist.

▼B

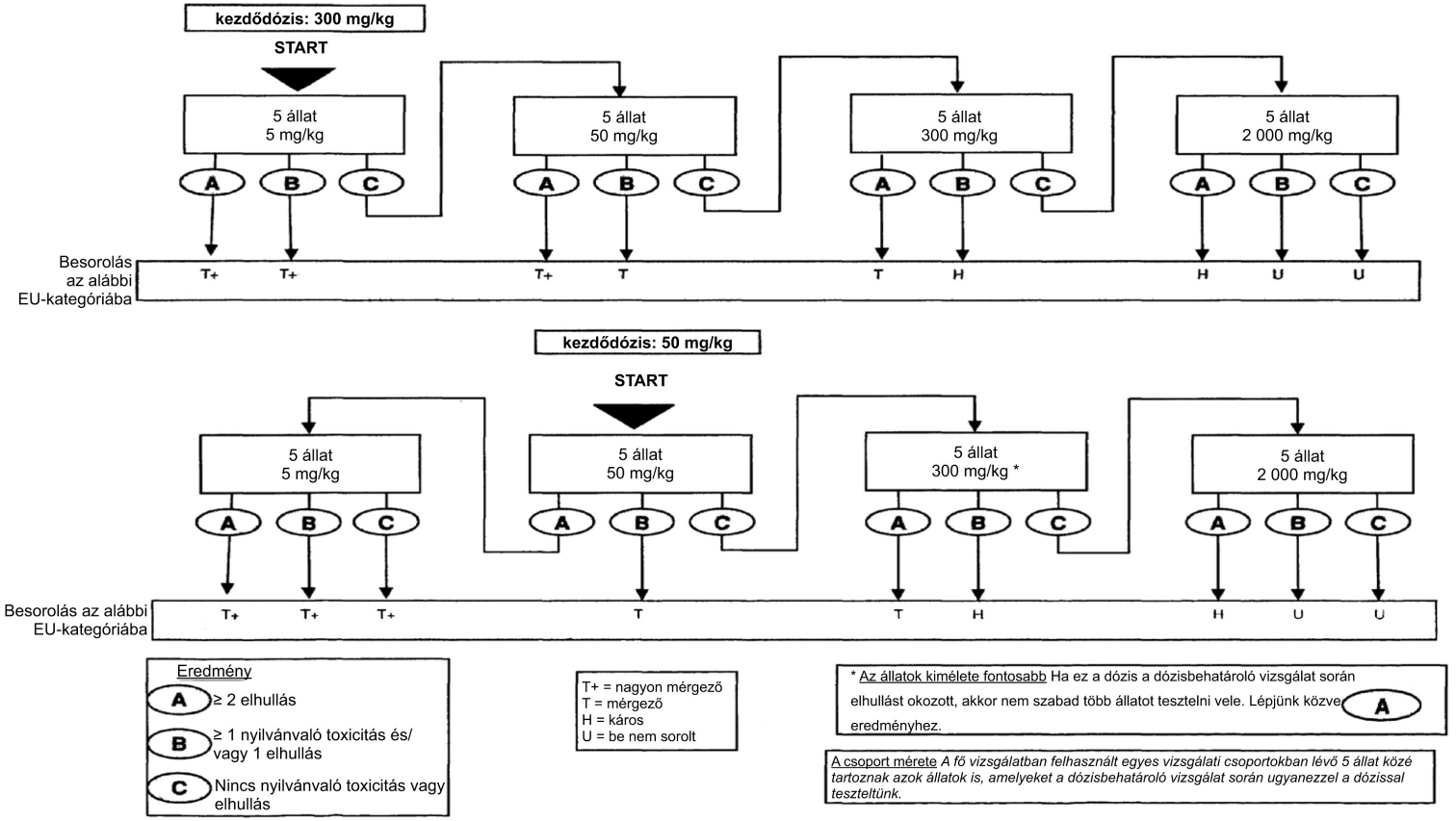
Fő vizsgálat

A 2. függelékben bemutatott lépcsőzetes eljárás során irányadó döntési szabályokat ki lehet terjeszteni úgy, hogy 5 000 mg/kg-os dózisszintet is lehessen alkalmazni. Ha tehát a fő vizsgálathoz 5 000 mg/kg-os kezdődózist alkalmaznak, az „A” eredmény (> 2 elhullás) esetén egy második csoportnak 2 000 mg/kg-os dózist kell beadni. „B” eredmény (nyilvánvaló toxicitás és/vagy < 1 elhullás) vagy „C” eredmény (nincs toxicitás) esetén az anyagot a GHS rendszer szerint be nem soroltnak kell tekinteni. Hasonló módon, ha az 5 000 mg/kg-os dózistól eltérő kezdődózist alkalmaznak, a 2 000 mg/kg-os dózis alkalmazásakor kapott „C” eredmény esetén a vizsgálatot 5 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha ezt követően az „A” eredményhez jutnak, az anyagot a GHS 5. kategóriába kell sorolni, „B” vagy „C” eredmény esetén pedig be nem soroltnak kell tekinteni.

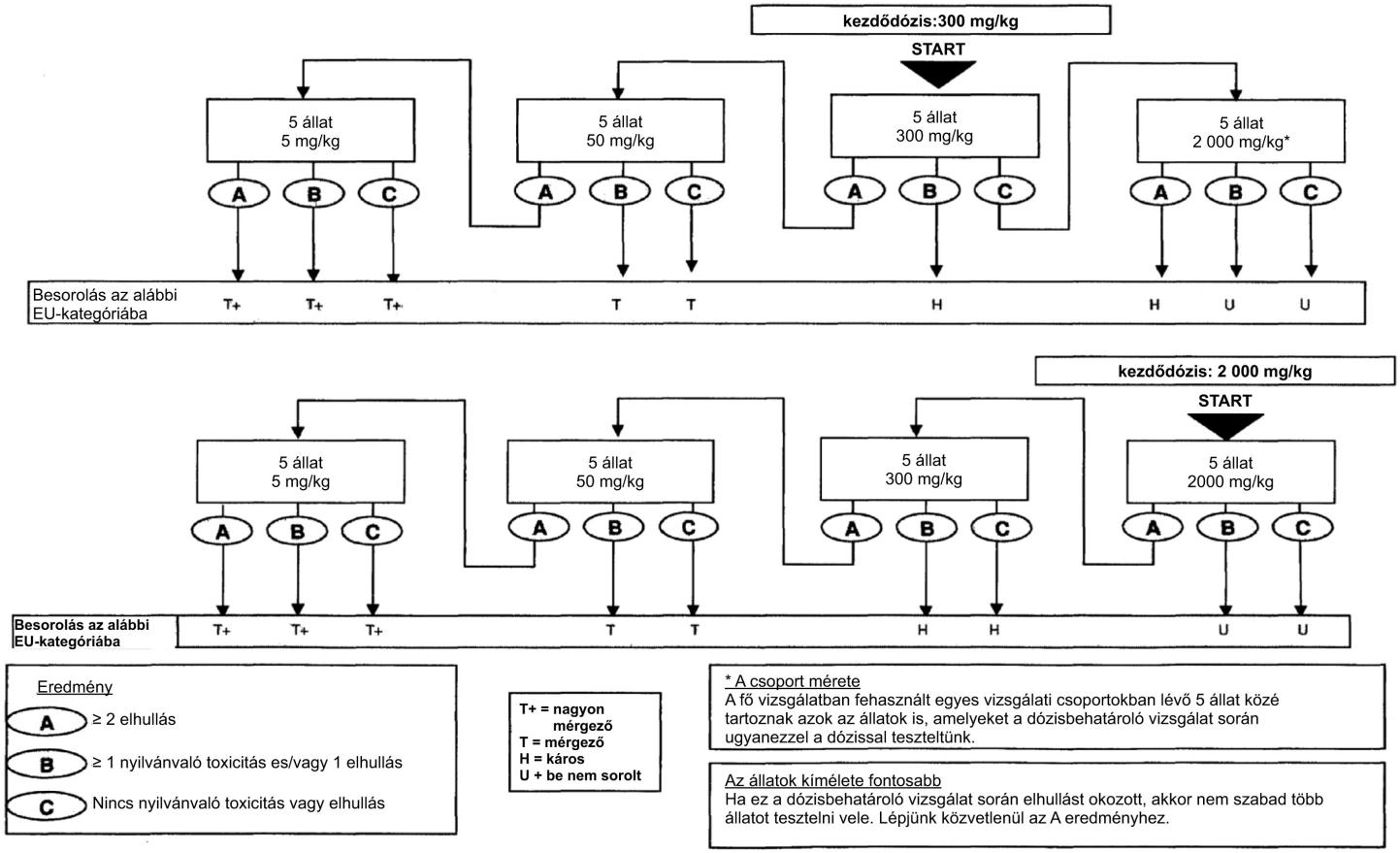
4. FÜGGELÉK

B.la. VIZSGÁLATI MÓDSZER

Útmutató az EU-rendszer szerinti besoroláshoz a Globálisan harmonizált osztályozási rendszer (GHS) teljes körű bevezetéséig tartó átmeneti időszakban (a (8) hivatkozásból)



▼B


kezdődózis:300 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2 000 mg/kg*
A B C
Besorolás az alábbi
EU-kategóriába
T+ T+ T+ T T H H U U
kezdődózis: 2 000 mg/kg
START
5 állat
5 mg/kg
5 állat
50 mg/kg
5 állat
300 mg/kg
5 állat
2000 mg/kg
Besorolás az alábbi
EU-kategóriába
T+ T+ T+ T T H H U U
Eredmény
A ≥ 2 elhullás
B ≥ 1 nyilvánvaló toxicitás es/vagy 1 elhullás
C Nincs nyilvánvaló toxicitás vagy elhullás
T+ = nagyon mérgező
T = mérgező
H = káros
U + be nem sorolt
* A csoport mérete
A fő vizsgálatban fehasznált egyes vizsgálati csoportokban lévő 5 állat közé tartoznak azok az állatok is, amelyeket a dózisbehatároló vizsgálat során ugyanezzel a dózissal teszteltünk.
Az állatok kímélete fontosabb
Ha ez a dózisbehatároló vizsgálat során elhullást okozott, akkor nem szabad több állatot tesztelni vele. Lépjünk közvetlenül az A eredményhez.

▼B

B.1b. **AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER**

1. **MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 423 (2001) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Az itt ismertetett akut toxikus osztály módszer (1) egy lépcsőzetes eljárás, amelyben lépésenként három azonos ivarú állatot használnak. Az elhullási aránytól és/vagy az állatok elhullásközeli állapotától függően átlagosan 2–4 lépésre lehet szükség a vizsgálandó anyag akut toxicitásának megítéléséhez. Az eljárás reprodukálható, nagyon kevés állatot kell használni hozzá, és hasonló módon lehet vele minősíteni az anyagokat, mint a többi akut toxicitás vizsgálati módszerrel. Az akut toxikus osztály módszer rögzített dózisokkal végzett biometriai vizsgálatokon (2)(3)(4)(5) alapul, amelyek megfelelően el vannak választva egymástól, hogy lehetővé tegyék az anyag besorolási és veszélyfelmérési célokra történő minősítését. Az 1996-ban jóváhagyott módszert széles körben validálták a szakirodalomból vett *in vivo* LD_{50}-adatokkal szemben mind nemzeti (6), mind pedig nemzetközi (7) szinten.

Arról, hogy egy adott célra melyik a legmegfelelőbb vizsgálati módszer, az Akut Orális Toxicitási Vizsgálatok Útmutatójában (8) található iránymutatás. Ez az útmutató további információkat is tartalmaz a B.1c. vizsgálati módszer alkalmazásával és értelmezésével kapcsolatosan.

Nincs szükség a vizsgálandó anyagok olyan dózisokban történő alkalmazására, amelyek korróziós vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt kifejezett fájdalmat vagy szorongást okoznak. Az elhullásközeli állapotban lévő állatokat vagy azokat, amelyek nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködnek, vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutatják, humánus módon exterminálni kell, és ugyanúgy kell figyelembe venni őket az eredmények értelmezésekor, mint azokat az állatokat, amelyek elhullottak a vizsgálatok során. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok exterminálására vonatkozó döntési kritériumok egy másik útmutatóban (9) találhatók.

A módszer előre meghatározott dózisok alkalmazásán alapul, és a kapott eredmények lehetővé teszik, hogy az anyagot az akut toxicitást okozó anyagok besorolására szolgáló Globálisan harmonizált rendszer (GHS) szerint minősítsük és soroljuk be (10).

A módszer elvben nem alkalmas az LD_{50} pontos kiszámítására, de lehetővé teszi azoknak az expozíciós tartományoknak a meghatározását, amelyeknél letalitás várható, mivel a fő végpont ebben a vizsgálatban is az állatok egy részének elhullása. Ez a módszer csak akkor teszi lehetővé az LD_{50}-érték meghatározását, ha legalább két dózis 0 %-nál magasabb, de 100 %-nál alacsonyabb elhullási arányt eredményez. A vizsgálandó anyagtól függetlenül az előre meghatározott dózisok alkalmazása és a kifejezetten a különféle állapotokban megfigyelt állatok számához kötődő besorolás növeli a laboratóriumok által készített jelentések egységességét és a vizsgálatok ismételhetőségét.

▼B

A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk az anyag megjelölése és kémiai szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, az anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei; szerkezetileg rokon anyagok toxikológiai adatai; valamint az anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a legmegfelelőbb kezdődózis kiválasztását.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut orális toxicitás: a vizsgálandó anyag egyszeri vagy 24 órán belül többszöri dózisának szájon át történő beadását követően jelentkező káros hatások.

Késleltetett elhullás: egy állat 48 órán belül nem hull el vagy nem tűnik elhullásközeli állapotban lévőnek, de később, a 14 napos megfigyelési időszak során elpusztul.

Dózis: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

GHS: Globálisan harmonizált osztályozási rendszer vegyi anyagokhoz és keverékekhez. Az OECD (emberi egészség és környezet), az ENSZ Veszélyes Anyagok Szállításának Szakértői Bizottsága (fizikai-kémiai tulajdonságok) és az ILO (veszély nyilvánosságra hozatala) közös tevékenysége, amelyet a Szervezetek Közötti Program a Vegyi Anyagok Helyes Kezelésére (IOMC) koordinál.

Közeli elhullás: amikor a legközelebbi tervezett megfigyelés időpontja előtt elhullásközeli állapot kialakulása vagy elhullás várható. Rágcsálók esetében erre utaló jelek lehetnek a görcsök, az oldalhelyzet, a fekvőhelyzet és a remegés. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)).

LD_{50} (közepes letális orális dózis): a vizsgálandó anyag statisztikailag levezetett egyszeri olyan dózisa, amely orálisan beadva az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50}-értéket a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömegegységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

Határdózis: egy, a vizsgálhatóság felső határánál lévő dózis (2 000 vagy 5 000 mg/kg).

Elhullásközeli állapot: az esetleges kezelés ellenére is elhullás közelében lévő állapot vagy túlélésre való képtelenség. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)).

Megjósolható elhullás: a kísérlet tervezett vége előtt, a jövőben egy ismert időpontban való elhullásra utaló klinikai tünetek megléte, például: a víz vagy az élelem elérésére való képtelenség. (A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)).

▼B

1.3. A VIZSGÁLAT ELVE

A vizsgálat alapelve, hogy a lépésenként minimális számú állatot alkalmazó lépcsőzetes eljárás alapján elegendő információ nyerhető a vizsgálandó anyag akut toxicitásáról ahhoz, hogy be lehessen azt sorolni. Az anyagot szájon át és a meghatározott dózisok egyikét alkalmazva adják be a kísérleti állatok egy csoportjának. Az anyagot lépcsőzetes eljárással vizsgálják, ahol minden lépésben három azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak. A kezelt állatokban az anyaggal összefüggő elhullás vagy annak hiánya határozza meg a következő lépést, azaz:

— nincs szükség további vizsgálatra,

— további három állat vizsgálata történik ugyanazzal a dózissal,

— további három állat vizsgálata történik a következő nagyobb vagy kisebb dózissal.

A vizsgálati eljárás további részletei az 1. függelékben találhatók. A módszer alkalmazásával döntést lehet hozni arról, hogy a vizsgálandó anyag a rögzített LD_{50}-határértékek segítségével megállapított toxicitási osztályok melyikébe sorolható be.

1.4. A MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általában nőstényeket használnak (9). Ennek az az oka, hogy a hagyományos LD_{50}-vizsgálatokra vonatkozó szakirodalom áttekintése alapján általában kicsi a különbség a nemek érzékenysége között, de azokban az esetekben, amikor megfigyelhető különbség, a nőstények általában valamivel érzékenyebbek (11). Azonban ha a szerkezetileg rokon vegyületek toxikológiai vagy toxikokinetikai tulajdonságaival kapcsolatos adatok szerint a hímek nagyobb érzékenysége valószínűsíthető, akkor hímeket kell alkalmazni. Megfelelően meg kell indokolni, ha a vizsgálatot hímekkel végzik.

Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolás megkezdésekor az állatoknak 8–12 hetesnek kell lenniük, és testtömegük nem térhet el ± 20 %-nál többel az esetlegesen korábban kezelt állatok testtömegének átlagától.

1.4.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti állatokat 22 °C (± 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. Az állatokat lehet vizsgált dózisonként egy ketrecben tartani, de az egy ketrecben lévő állatok számát úgy kell megválasztani, hogy az ne zavarja az egyes állatok megfigyelését.

▼B

1.4.3. **Az állatok előkészítése**

Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, majd egyedi azonosítóval kell ellátni, és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben kell tartani őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.4. **A dózisok előkészítése**

A vizsgálandó anyagokat általában a vizsgálandó dózistartományon belül állandó térfogatban kell beadni úgy, hogy a dóziskészítmény koncentrációját változtatják. Ha azonban egy folyékony végterméket vagy keveréket vizsgálnak, a vizsgálatot követő kockázatértékelés szempontjából megfelelőbb lehet, ha a vizsgálandó anyagot hígítatlanul, azaz állandó koncentrációban alkalmazzák, illetve egyes hatóságok ezt írják elő. A maximálisan beadható dózistérfogatot azonban egyik esetben sem szabad túllépni. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, a kísérleti állat méretétől függ. Rágcsálók esetében a térfogat általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt: vizes oldatok esetében azonban 2 ml/-100 g testtömegarány is megfontolható. A dóziskészítmény formulázása tekintetében – ahol lehet – a vizes oldatok/szuszpenziók/-emulziók alkalmazása javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatok/szuszpenziók/emulziók, és harmadsorban esetlegesen más vivőanyagokban elkészített oldatok. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A dózisokat a beadás előtt rövid idővel kell elkészíteni, kivéve, ha ismert és igazoltan elfogadható a készítmény stabilitása az alatt az alkalmazás időtartama alatt.

1.5. ELJÁRÁS

1.5.1. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban, gyomorszondán vagy egy megfelelő intubációs kanülön át történő táplálással kell beadni. Abban a rendkívüli esetben, ha nem lehetséges egyetlen dózist alkalmazni, a dózis egy 24 órát nem meghaladó időtartam alatt kisebb részletekben is beadható.

A kezelés előtt az állatokat éheztetni kell (pl. patkány esetében egy éjszakán át meg kell vonni a táplálékot, de a vizet nem; egér esetében 3–4 órára kell megvonni a táplálékot, de a vizet nem). A koplaltatási időszakot követően meg kell mérni az állatok testtömegét, majd be kell adni a vizsgálandó anyagot. Az anyag beadása után a táplálékot újra meg lehet vonni –patkány esetében 3–4 órára, egér esetében 1–2 órára. Ha egy dózist részletekben adnak be, a beadás időtartamától függően menet közben szükség lehet arra, hogy az állatoknak táplálékot és vizet adjanak.

1.5.2. **Az állatok száma és a dózisok**

Minden lépésben három állatot kell alkalmazni. A kezdődózist az 5, 50, 300 és 2 000 mg/testtömeg-kg-os négy rögzített dózis közül kell kiválasztani. Azt a dózist kell kezdődózisként kiválasztani, amelyiknél a legvalószínűbb, hogy a kezelt állatok egy részénél elhullást okoz. Az 1. függelékben látható folyamatábrák ismertetik az egyes kezdődózisok esetén követendő eljárást. A 4. függelék pedig azzal kapcsolatosan ad iránymutatást, hogy a GHS bevezetéséig hogyan kell az EU-rendszer szerint elvégezni a besorolást.

▼B

Ha a rendelkezésre álló információ alapján a legmagasabb kezdődózis (2 000 mg/testtömeg-kg) valószínűleg nem okoz elhullást, akkor határérték-vizsgálatot kell végezni. Ha a vizsgálandó anyagról nincs információ, állatjóléti okokból a 300 mg/testtömeg-kg-os kezdődózis alkalmazása javasolt.

Az egyes dózisok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő dózissal történő kezelését nem szabad megkezdeni mindaddig, amíg meg nem győződnek arról, hogy az előzőleg kezelt állatok életben maradnak.

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha konkrét szabályozási hatósági követelmények indokolják, megfontolás tárgyává lehet tenni egy további, 5 000 mg/kg-os felső dózis alkalmazását (lásd a 2. függeléket). Az állatok kímélete érdekében a GHS 5. kategóriában (2 000–5 000 mg/kg) nem ajánlott állatokkal kísérletezni, és csak abban az esetben szabad ilyet tervezni, ha nagy a valószínűsége, hogy egy ilyen vizsgálat eredményei közvetlen jelenőséggel bírnak az emberi vagy állati egészség vagy a környezet védelme szempontjából.

1.5.3. **Határérték-vizsgálat**

Határérték-vizsgálatot elsősorban olyan helyzetekben kell végezni, ha a kísérletet végzőnek olyan információi vannak, amelyek szerint a vizsgálandó anyag valószínűleg nem toxikus, azaz csak a hatósági határértékdózisok felett toxikus. A vizsgálandó anyag toxicitásával kapcsolatban információ hasonló vegyületek vagy keverékek vagy termékek vizsgálataiból szerezhető, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, illetve azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

Végezhető határérték-vizsgálat egyetlen, 2 000 mg/testtömeg-kg-os dózissal, összesen hat (lépésenként három-három) állat alkalmazásával. Kivételes esetben végezhető határértékvizsgálat egyetlen, 5 000 mg/kg-os dózissal is, amikor összesen három állatot alkalmaznak (lásd a 2. függeléket). A vizsgálandó anyaggal összefüggő elhullás esetén szükséges lehet a következő alacsonyabb dózissal tovább folytatni a vizsgálatokat.

1.6. MEGFIGYELÉSEK

Az állatokat a dózis beadása után egyedileg kell megfigyelni, legalább az első 30 percben, azután az első 24 órában rendszeres időközönként, amelynek során különös figyelemmel kell őket kísérni az első 4 órában, majd ezt követően naponta, összesen 14 napon át, kivéve, ha az állatot állatjóléti okok miatt ki kell venni a vizsgálatból, és humánus módon exterminálni kell, vagy ha az állat elhullik. A megfigyelés időtartamát azonban nem szabad mereven meghatározni. Ezt a mérgezési reakciók, illetve a gyógyulás kezdete és időtartama alapján kell meghatározni, és ilyen módon szükség esetén meg lehet hosszabbítani. Fontos a mérgezési tünetek megjelenésének, illetve megszűnésének időpontja, különösen, ha a mérgezési tünetek inkább késleltetve jelentkeznek (12). Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell úgy, hogy minden állat esetében önálló adatsort kell felvenni.

▼B

Ha a mérgezési tünetek tartósak, további megfigyelésekre van szükség. Meg kell figyelni a bőr és a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák, valamint a légzési és a keringési rendszer, az autonóm és a központi idegrendszer, illetve a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési mintázatok változásait. Figyelemmel kell lenni remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma előfordulására is. A Humane Endpoints Guidance Documentben összefoglalt alapelveket és követelményeket is figyelembe kell venni (9). Humánus módon exterminálni kell az elhullásközeli állapotban lévő állatokat, illetve azokat, amelyek súlyos fájdalom vagy tartós szorongás jeleit mutatják. Ha az állatokat humánus okok miatt exterminálni kell, vagy elhullanak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját is.

1.6.1. **Testtömeg**

Röviddel a vizsgálandó anyag beadása előtt és legalább egy héttel utána minden állat testtömegét egyenként meg kell mérni. A testtömegváltozást ki kell számítani, és rögzíteni kell. A vizsgálat végén az életben maradt állatokat újra meg kell mérni, majd humánus módon exterminálni kell őket.

1.6.2. **Kórbonctani vizsgálat**

Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni (azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt ki kellett venni a vizsgálatból). Minden egyes állat esetében minden makroszkópos kórtani elváltozást fel kell jegyezni. A kezdődózis beadása után legalább 24 óráig túlélő állatok esetében tervbe lehet venni a makroszkópos kórtani elváltozást mutató szervek mikroszkópos vizsgálatát is, mivel abból hasznos információk nyerhetők.

2. **ADATOK**

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden vizsgálati csoportra vonatkozóan mutassa a csoportban lévő kísérleti állatok számát, valamint azoknak a számát, amelyeknél mérgezési tünetek láthatók, amelyek a vizsgálat során elhullottak, vagy amelyeket humánus módon exterminálták, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

3. **JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek megfelelő módon a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai megjelenés, tisztaság és ha releváns, a fizikai-kémiai tulajdonságok (ezen belül az izomerizáció is),

— azonosító adatok, ezen belül a CAS-szám.

Vivőanyag (ha szükséges):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs,

▼B

— az állatok mikrobiológiai státusza, feltéve, hogy ismert,

— az állatok száma, életkora és ivara (ezen belül adott esetben annak indoklása, hogy nőstények helyett miért hímeket alkalmaztak),

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.

Kísérleti körülmények:

— a vizsgálandó anyag formulázására vonatkozó információk, ezen belül a beadott anyag fizikai formájával kapcsolatos adatok,

— a vizsgálandó anyag beadására vonatkozó információk, ezen belül a beadott térfogat és a beadás időpontja,

— a táplálék és a víz minősége (ezen belül a takarmány típusa/-forrása, a víz forrása),

— a kezdődózis kiválasztásának indoklása.

Eredmények:

— a válaszadatok és a dózisok táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató, ezen belül elhullt állatokra; a hatások jellege, súlyossága és időtartama),

— a testtömegadatok és a testtömegváltozások táblázatos formában történő megadása,

— az egyes állatok testtömege a dózis beadásának napján, azt követően hetente, valamint az elhullás vagy exterminálás időpontjában,

— a tervezett exterminálás előtti elhullás napja és ideje,

— a mérgezési tünetek megjelenése és időbeli lefolyása, valamint esetleges visszafordíthatósága minden egyes állatra vonatkozóan,

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények diszkussziója és értelmezése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von 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-Toxic-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) Harmonized 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,FRF.html]

(11) 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 LD50, 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 and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

1. FÜGGELÉK

AZ EGYES KEZDŐDÓZISOK ESETÉBEN KÖVETENDŐ ELJÁRÁS

ÁLTALÁNOS MEGJEGYZÉSEK

Minden egyes kezdődózis esetén az ebben a függelékben bemutatott megfelelő vizsgálati sémák határozzák meg a követendő eljárást.

— 1A. függelék: a kezdődózis 5 mg/testtömeg-kg,

— 1B. függelék: a kezdődózis 50 mg/testtömeg-kg,

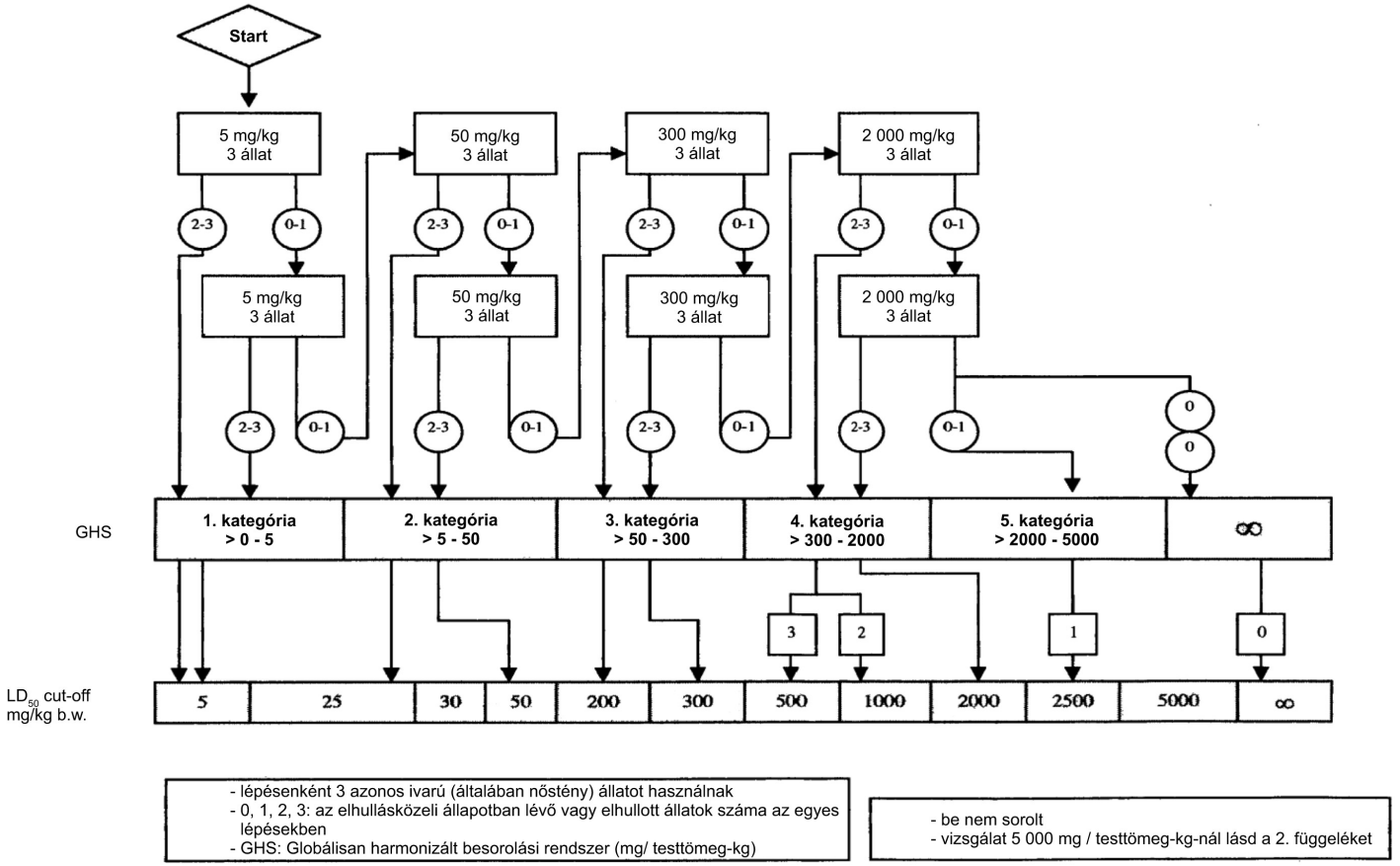
— 1C. függelék: a kezdődózis 300 mg/testtömeg-kg,

— 1D. függelék: a kezdődózis 2 000 mg/testtömeg-kg.

A humánus módon exterminált vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a jelzett nyilakat követi

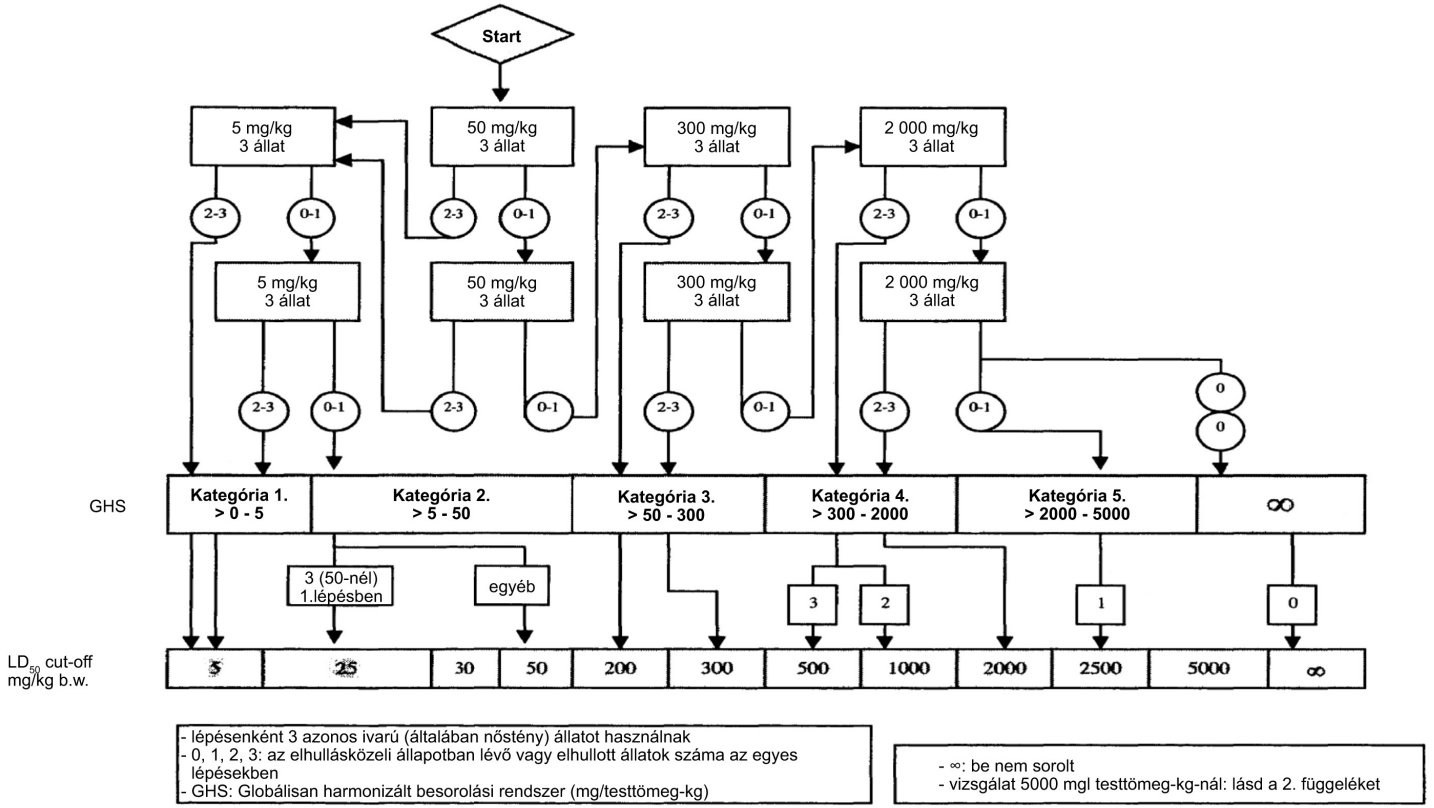
1A. FÜGGELÉK

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 5 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



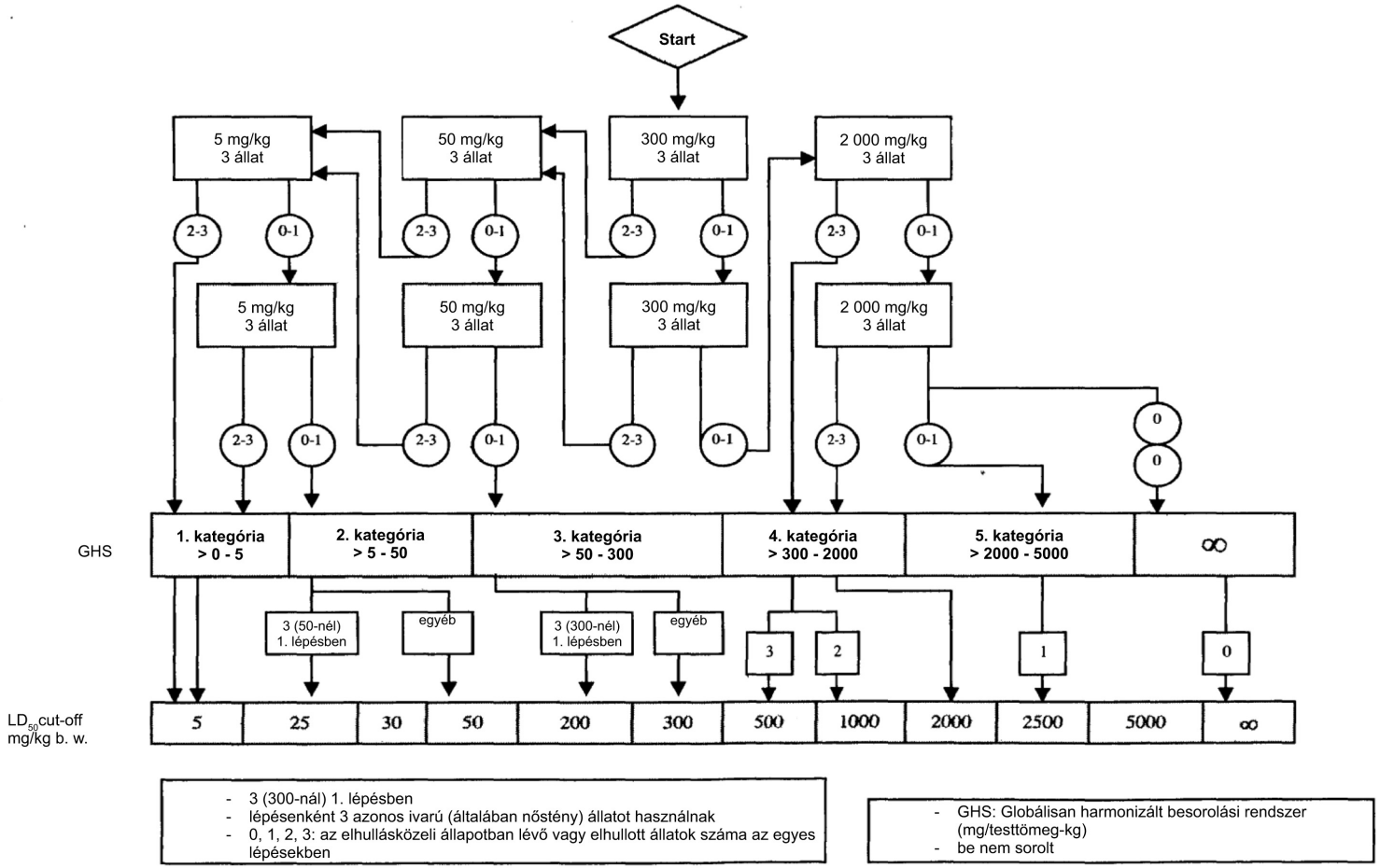
1B. Függelék

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 50 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



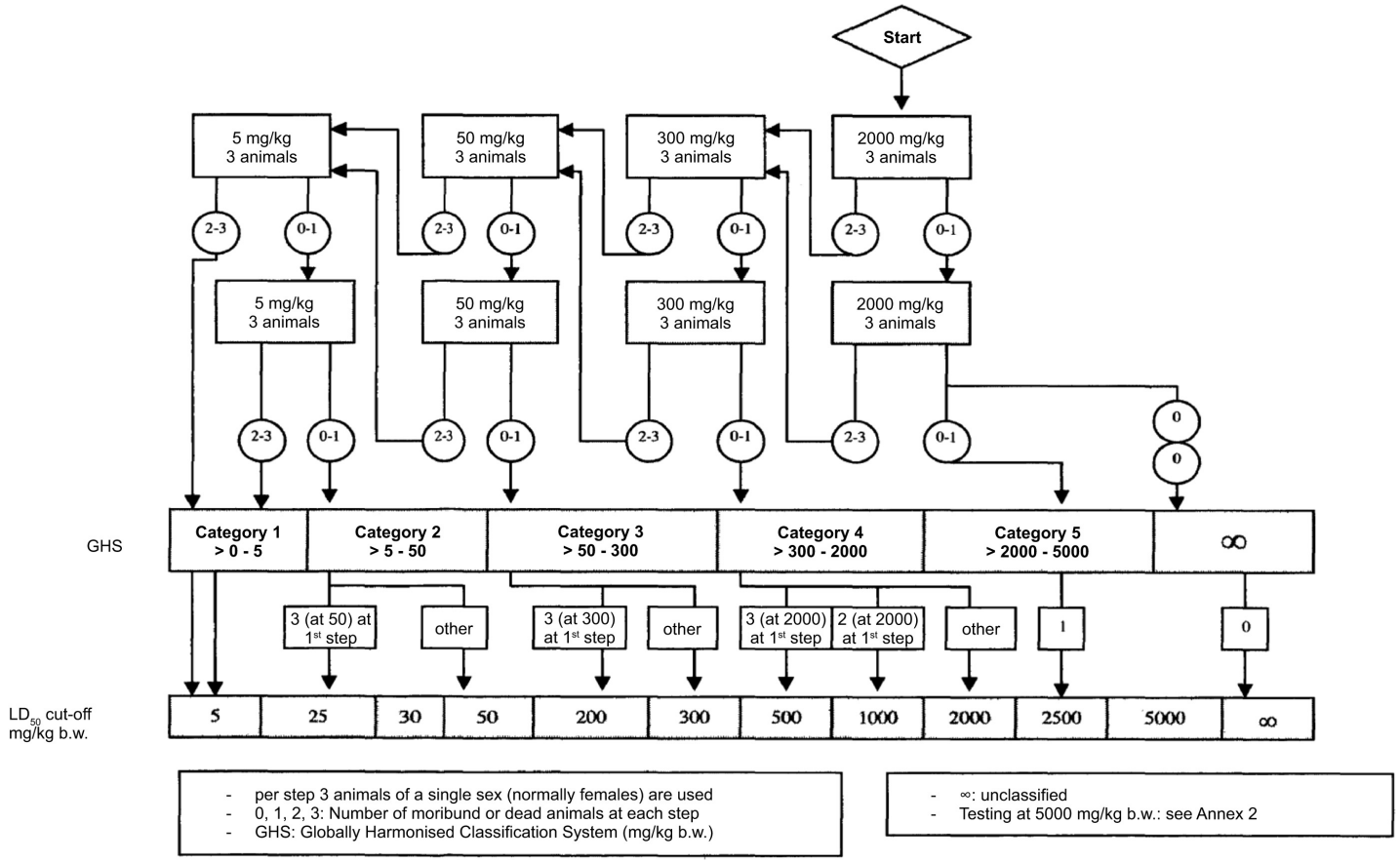
1C. FÜGGELÉK

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 300 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



1D. FÜGGELÉK

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS 2 000 MG/TESTTÖMEG-KG KEZDŐDÓZIS ESETÉN



▼B

2. FÜGGELÉK

A VÁRHATÓAN 2 000 MG/KG FELETTI LD_{50}-ÉRTÉKKEL RENDELKEZŐ VIZSGÁLANDÓ ANYAGOK VIZSGÁLATOK NÉLKÜLI OSZTÁLYOZÁSÁNAK KRITÉRIUMAI

Az 5. veszélyességi kategória kritériumait úgy állapították meg, hogy tegyék lehetővé azoknak a vizsgálandó anyagoknak a meghatározását, amelyek akut toxicitási kockázata viszonylag alacsony, de bizonyos körülmények között veszélyt jelenthetnek az érzékeny populációkra. Az ilyen anyagok orális vagy dermális LD_{50}-értéke várhatóan 2 000 és 5 000 mg/kg közötti tartományban található, vagy ezzel egyenértékű dózisoknak megfelelő az egyéb beadási módok esetében. A vizsgálandó anyagokat az alábbi esetekben kell a 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg veszélyességi kategóriába (GHS 5. kategória) sorolni:

a) ha az 1A–1D. függelékben bemutatott, az elhullási gyakoriságon alapuló vizsgálati sémák bármelyike szerint ebbe a kategóriába kell sorolni;

b) ha hitelt érdemlő bizonyíték van már arra, hogy az anyag LD_{50}-értéke az 5. kategóriában megadott tartományba esik; vagy más állatkísérletek vagy humán toxikus hatások szerint a humán egészségügyi veszély akut jellegű;

c) adatok extrapolálásával, becslésével vagy mérésével, ha egy veszélyesebb osztályba való besorolás nem indokolt, és

   — hitelt érdemlő információk emberben jelentős toxikus hatásokra utalnak, vagy

   — a legfeljebb 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett orális beadási móddal történő vizsgálatok során elhullás történt, vagy

   — ha a legfeljebb 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett vizsgálat alapján a szakértők véleménye megerősíti a toxicitás szignifikáns klinikai tüneteit, kivéve a hasmenést, szőrmeredezést vagy gondozatlan megjelenést, vagy

   — ha a szakértők véleménye megerősíti azokat a hitelt érdemlő információkat, amelyek más állatkísérletekben tapasztalt szignifikáns akut hatásokat valószínűsítenek.

2 000 MG/KG FELETTI DÓZISOKKAL TÖRTÉNŐ VIZSGÁLAT

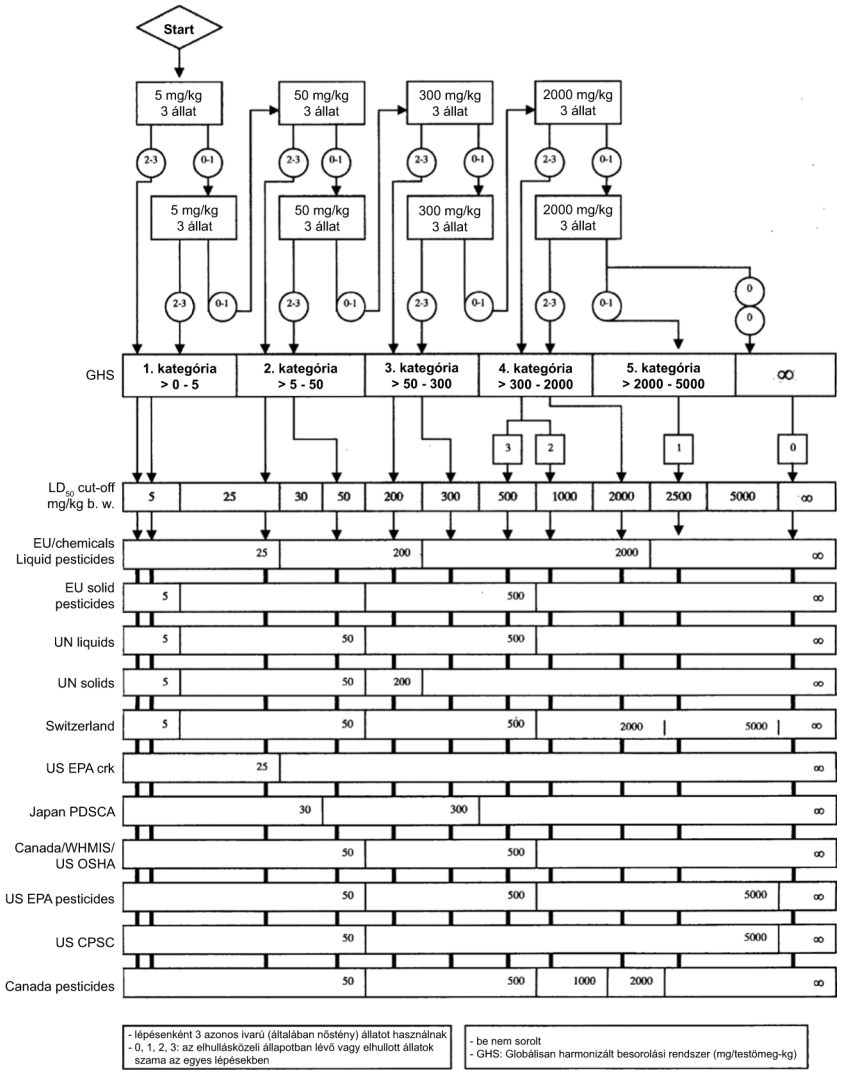
Az állatok jólétének védelme iránti igényt elismerve nem ajánlott, hogy állatokat az 5. kategória tartományában (5 000 mg/kg) vizsgálják, és csak akkor szabad fontolóra venni, ha nagy a valószínűsége, hogy az ilyen vizsgálatok eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az állati vagy emberi egészség védelme szempontjából (10). Nem szabad további vizsgálatokat végezni ennél magasabb dózisokkal.

Ha vizsgálatot kell végezni, csak egy lépés (azaz három állat), az 5 000 mg/kg-os dózis alkalmazása szükséges. Ha az első kezelt állat elhullik, akkor az 1. függelékben bemutatott folyamatábrának megfelelően a kezelést a 2 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha az első állat életben marad, két további állatot kell kezelni. Ha a három állat közül csak egy hullik el, az LD_{50}-érték várhatóan meghaladja az 5 000 mg/kg-ot. Ha mindkét állat elhullik, akkor a vizsgálatot a 2 000 mg/kg-os dózissal kell folytatni.

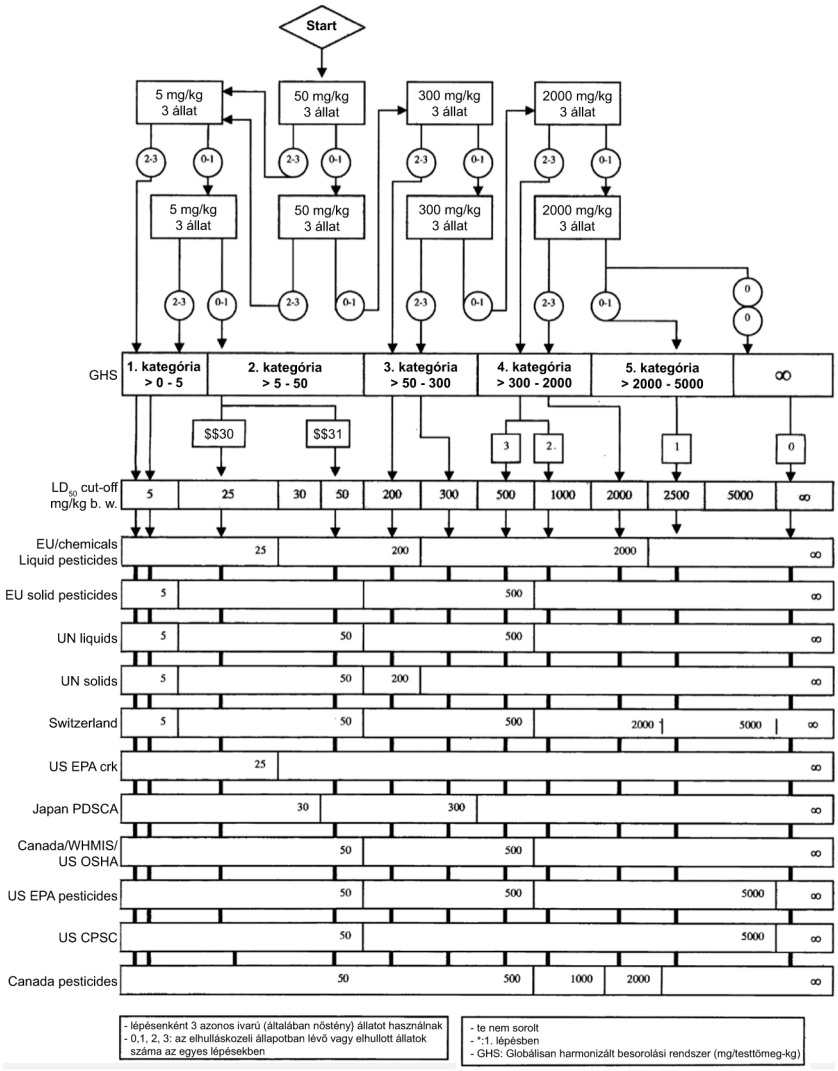
▼B

3. FÜGGELÉK

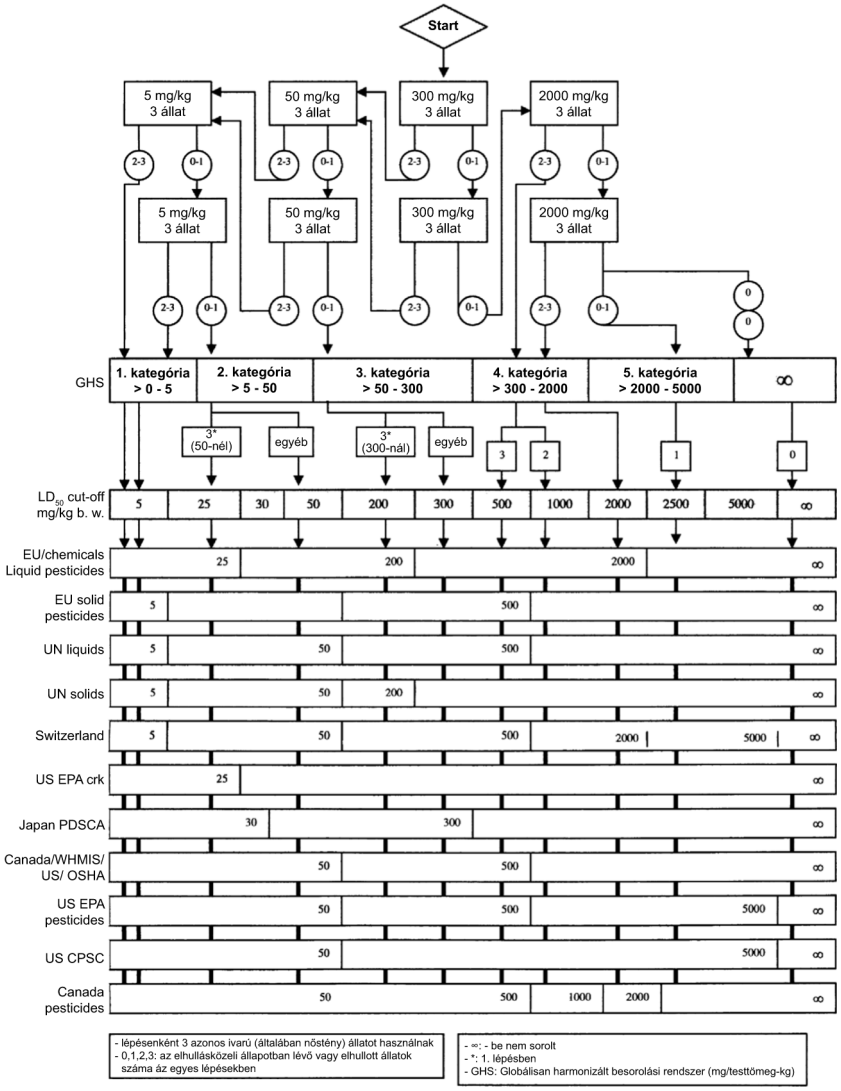
B1c. VIZSGÁLATI MÓDSZER: Útmutató az EU-rendszer szerinti besoroláshoz a Globálisan harmonizált osztályozási rendszer (GHS) teljes körű bevezetéséig tartó átmeneti időszakban (a (8) hivatkozásból)



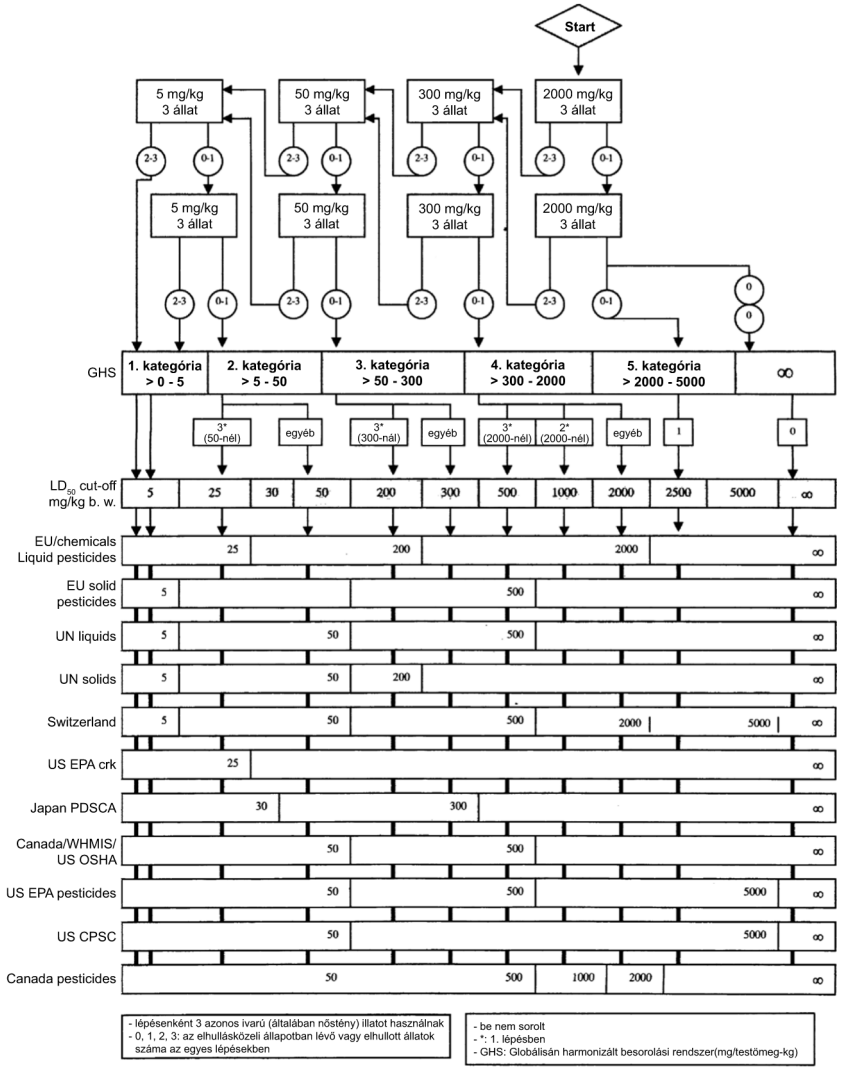
▼B


Start
5 mg/kg 3 állat
50 mg/kg 3 állat
300 mg/kg 3 állat
2000 mg/kg 3 állat
2-3
0-1
0
GHS
1. kategória > 0 - 5
2. kategória > 5 - 50
3. kategória > 50 - 300
4. kategória > 300 - 2000
5. kategória > 2000 - 5000
∞
$$30
$$31
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5
25
30
50
200
300
500
1000
2000
2500
5000
EU/chemicals Liquid pesticides
EU solid pesticides
UN liquids
UN solids
Switzerland
US EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
- 0,1, 2, 3: az elhulláskozeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma az egyes lépésekben
- te nem sorolt
- *:1. lépésben
- GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg/testtömeg-kg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 állat
50 mg/kg 3 állat
300 mg/kg 3 állat
2000 mg/kg 3 állat
2-3
0-1
0
GHS
1. kategória > 0 - 5
2. kategória > 5 - 50
3. kategória > 50 - 300
4. kategória > 300 - 2000
5. kategória > 2000 - 5000
∞
3* (50-nél)
egyéb
3* (300-nál)
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/chemicals Liquid pesticides
EU solid pesticides
UN liquids
UN solids
Switzerland
US EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US/ OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
- 0,1,2,3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma az egyes lépésekben
- ∞: - be nem sorolt
- *: 1. lépésben
- GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg/testtömeg-kg)

▼B


Start
5 mg/kg 3 állat
50 mg/kg 3 állat
300 mg/kg 3 állat
2000 mg/kg 3 állat
2-3
0-1
0
GHS
1. kategória > 0 - 5
2. kategória > 5 - 50
3. kategória > 50 - 300
4. kategória > 300 - 2000
5. kategória > 2000 - 5000
∞
3* (50-nél)
egyéb
3* (300-nál)
3* (2000-nél)
2* (2000-nél)
1
LD50 cut-off mg/kg b. w.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EU/chemicals Liquid pesticides
EU solid pesticides
UN liquids
UN solids
Switzerland
US EPA crk
Japan PDSCA
Canada/WHMIS/ US OSHA
US EPA pesticides
US CPSC
Canada pesticides
- lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
- 0, 1, 2, 3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma az egyes lépésekben
- be nem sorolt
- *: 1. lépésben
- GHS: Globálisán harmonizált besorolási rendszer(mg/testömeg-kg)

▼M4

B.2. AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 403. vizsgálati iránymutatásban (2009) (1) leírt módszerrel. Az akut inhalációs toxicitásra vonatkozó eredeti 403. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen felülvizsgált B.2. vizsgálati módszert (a felülvizsgált 403. vizsgálati iránymutatás megfelelőjeként) a nagyobb rugalmasságot, az állatkísérletek csökkentését és a szabályozási igények kielégítését szem előtt tartva dolgozták ki. A felülvizsgált vizsgálati módszer kétféle tanulmányt foglal magában: egy hagyományos LC_{50}-protokollt és egy koncentráció x idő (C x t) protokollt. E vizsgálati módszer fő jellemzői, hogy alkalmas a nem halálostól a halálos kimenetelig terjedő koncentráció-hatás összefüggésnek a medián halálos koncentráció (LC_{50}), a nem halálos küszöbérték-koncentráció (például LC01) és a meredekség levezetése érdekében történő meghatározására, valamint a nemek szerint esetlegesen eltérő érzékenység megállapítására. A C x t protokoll abban az esetben alkalmazandó, ha meghatározott szabályozási vagy tudományos igény miatt, így többek között veszélyhelyzeti intézkedések tervezéséhez (például akut expozíciós iránymutatási szintek [AEGL], vészhelyzeti intézkedési tervezési iránymutatások [ERPG] vagy akut expozíciós küszöbértékek [AETL] levezetéséhez) vagy területrendezési célból van szükség több időtartamon át végzett állatkísérletekre.

2. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálatok végrehajtásával és értelmezésével kapcsolatos útmutatás az akut inhalációs toxicitási vizsgálatokra vonatkozó (39. számú) iránymutatásban (2) található.

3. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén, valamint a 39. iránymutatásban (2) található.

4. Ez a vizsgálati módszer lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyag jellemzését és mennyiségi kockázatértékelését, valamint a vizsgált anyagoknak az 1272/2008/EK rendelet (3) szerinti rangsorolását és osztályozását. A megfelelő vizsgálati módszer akut hatások vizsgálatához történő kiválasztásához a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás. Ha csak osztályozással és címkézéssel kapcsolatos információk szükségesek, általában e melléklet B.52. fejezetét (4) javasolt alkalmazni (lásd a 39. iránymutatást (2)). A jelen B.2. vizsgálati módszer nem kifejezetten különleges anyagok – például alacsony oldhatóságú izometrikus vagy rostos anyagok, illetve mesterséges nanoanyagok – vizsgálatára szolgál.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

5. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálatok elvégzésének mérlegelése előtt a vizsgálati laboratóriumnak az állatkísérletek minimalizálása érdekében figyelembe kell vennie a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló összes információt, beleértve az olyan meglévő tanulmányokat (például az e melléklet B.52. fejezetében (4) leírtakat), amelyek adatai a további vizsgálatok elvégzésének mellőzését támasztják alá. A legalkalmasabb faj, törzs, nem, expozíciós mód és a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztását esetlegesen segítő információk közé tartozik a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási területek és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok (lásd a 39. iránymutatást (2)).

▼M4

6. Amennyire csak lehet, kerülendő a maró vagy irritáló hatású vegyi anyagok olyan koncentrációban történő vizsgálata, amely előreláthatóan súlyos fájdalmat és/vagy szorongást okozna. Annak megállapítása érdekében, hogy a további vizsgálatoktól el lehet-e tekinteni, szakértői megítélés alapján értékelni kell a lehetséges maró, illetve irritáló hatást, olyan bizonyítékokra támaszkodva, mint az embereknél és állatoknál (például nem maró, illetve nem irritáló koncentráció mellett ismételt dózisokkal végzett vizsgálatok során) tapasztalt hatások, meglévő *in vitro* adatok (például az e melléklet B.40. (5) és B.40A. fejezetében (6) vagy az OECD 435. vizsgálati iránymutatásában (7) leírtak), pH-értékek, hasonló anyagokra vonatkozó adatok vagy bármely egyéb kapcsolódó adat. A jelen vizsgálati módszer meghatározott szabályozási igények esetén (például vészhelyzeti tervezési célokból) alkalmazható állatok ilyen anyagoknak való expozíciójára, mivel a vizsgálatvezető vagy a vezető kutató számára irányítást biztosít a célkoncentrációk kiválasztása felett. A célkoncentrációk azonban nem okozhatnak súlyos irritáló, illetve maró hatást, ugyanakkor elegendőnek kell lenniük ahhoz, hogy a koncentráció-hatás görbét a vizsgálat szabályozási és tudományos céljának megfelelő szintekre kiterjesszék. Ezeket a koncentrációkat eseti alapon kell kiválasztani, és a választást indokolni kell (lásd a 39. iránymutatást (2)).

A VIZSGÁLAT ELVE

7. A jelen felülvizsgált B.2. vizsgálati módszert a vizsgált vegyi anyag akut toxicitására vonatkozó elegendő, az anyag osztályozását lehetővé tevő információ megszerzése, valamint a mennyiségi kockázatértékelés elvégzéséhez szükséges, az egyik vagy mindkét nemre vonatkozó letalitási adatok (például LC_{50}, LC_{01} és meredekség) biztosítása érdekében dolgozták ki. A vizsgálati módszer két módszert foglal magában. Az első egy hagyományos protokoll, amelynek során állatok csoportjait tesszük ki egy határkoncentrációnak (határérték-vizsgálat) vagy fokozatosan növekedő koncentrációk sorozatának előre meghatározott, általában 4 órás időtartamra. Meghatározott szabályozási célok elérése érdekében más expozíciós időtartamok is alkalmazhatók. A másik módszer egy (C x t) protokoll, amelynek során állatok csoportjait tesszük ki egy határkoncentrációnak vagy fokozatosan növekedő koncentrációk sorozatának több időtartamon keresztül.

8. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani, és a vizsgálat eredményeinek értelmezésekor a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló 19. OECD-iránymutatásban (8) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

9. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A javasolt állatfaj a patkány, más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

10. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az expozíció napján az állatoknak 8–12 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük, a testsúlyuk pedig a korábbi expozíciókkal érintett, azonos életkorú állatok nemenkénti átlagos testsúlyától legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, és egyedi azonosítás céljából meg kell jelölni. Az állatokat a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig tartsuk a ketrecükben. Az állatokat a vizsgálatot megelőzően rövid ideig szoktatni kell a vizsgálati eszközökhöz, mivel ezzel csökkenthető az új környezet okozta stressz.

▼M4

Az állatok tartása

11. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használunk. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet (hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

Inhalációs kamrák

12. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok össztérfogata nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveit, valamint azok különös előnyeit és hátrányait a 39. iránymutatás (2) ismerteti.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

13. Csak orron át történő expozíció esetén az expozíció időtartama patkányoknál 6 óráig terjedhet. Egerek csak orron át történő expozíciója esetén az expozíciós időtartam általában nem haladhatja meg a 4 órát. Amennyiben hosszabb vizsgálati időtartam szükséges, a döntést indokolni kell (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamrában aeroszoloknak kitett állatokat külön ketrecben kell tartani, hogy az állatok egymás tisztogatása során ne nyelhessék le a vizsgált vegyi anyagot. Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

14. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációtól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére.

▼M4

Részecskeméret-eloszlás

15. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 4 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (2) (9) (10). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek lehetnek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék, a rostok és a higroszkopikus anyagok (amelyek részecskemérete a légzőrendszer nedves környezetében nő) meghaladhatják azt.

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

16. A vizsgált vegyi anyag megfelelő légköri koncentrációjának és részecskeméretének eléréséhez vivőanyag alkalmazható. Főszabályként a víz részesítendő előnyben. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a szükséges részecskeméret-eloszlás elérése érdekében, ugyanakkor ügyelni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag ne induljon bomlásnak és ne módosuljon. Amennyiben úgy véljük, hogy a mechanikai folyamatok (például a túlzott őrlésből adódó súrlódás miatt kialakult szélsőséges hőmérséklet) megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételét analitikai úton ellenőrizni kell. Kellő figyelmet kell fordítani a vizsgált vegyi anyag szennyeződésének elkerülésére. A nem morzsálódó, szándékosan belélegezhetetlen összetétellel készült szemcsés anyagokat nem szükséges vizsgálni. Kopásvizsgálattal kell igazolni, hogy a szemcsés anyag kezelése során nem keletkeznek belélegezhető részecskék. Ha a kopásvizsgálat során belélegezhető anyagok keletkezését észleljük, inhalációs toxicitási vizsgálatot kell végezni.

Kontrollállatok

17. Negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata nem szükséges. Amennyiben a vizsgálati légkör létrehozása során víztől eltérő vivőanyagot alkalmazunk, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra csak akkor van szükség, ha nem állnak rendelkezésre múltbeli inhalációs toxicitási adatok. Ha a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag a toxicitási vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, tehát nincs szükség vivőanyaggal kezelt kontrollra.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

18. A kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy stabilitás) nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt a légkör előállítása szempontjából lényeges összes dinamikus paraméter szabályozására. Különös figyelmet kell fordítani a csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére, amennyiben az expozíciós rendszeren keresztüli légáramlás nem elegendő a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó légkör dinamikus áramlásának biztosítására. Előírt módszerek állnak rendelkezésre annak igazolására, hogy a választott működési körülmények között nem történik újbóli belélegzés (2) (11). Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben bármilyen okból feltételezhető, hogy ezek a szabványok nem teljesíthetők, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell.

▼M4

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

19. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt nyomon kell követni, és legfeljebb 4 órás időtartamú expozíciók esetén legalább háromszor, rövidebb időtartamok esetén pedig óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

20. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk a kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

21. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában fennálló koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát. A cél-, a névleges és a tényleges koncentrációt fel kell tüntetni a vizsgálati jegyzőkönyvben, azonban a letális koncentráció értékének kiszámításához csak a tényleges koncentrációkat kell felhasználni.

22. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel meghatározott molekulatömeg, illetve más becslések. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) meggyőződni a megbízó által adott jellemzés helytállóságáról.

23. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani, továbbá az analitikai módszertől függően folyamatosan és/vagy időszakosan ellenőrizni kell. Időszakos mintavétel esetén a kamrából a négyórás vizsgálat során legalább kétszer kell légköri mintát venni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, a teljes expozíciós időszak alatt egy mintavétel végezhető. Ha jelentős ingadozás figyelhető meg az egyes minták között, a következőnek vizsgált koncentrációkat expozíciónként négy minta alapján kell vizsgálni. Az egyes kamrakoncentrációminták gázok és gőzök esetében legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy

▼M4

szilárd aeroszolok esetében pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el az átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és fel kell jegyezni. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét, utóbbihoz pedig figyelembe kell venni a t_{95} eléréséhez szükséges időt. A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

24. A nagyon összetett, gázokból/gőzökből és aeroszolokból álló keverékek (például égésterekből származó, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában, ezért mindegyik fázishoz (gáz/gőz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a keverék, nem pedig csak a hatóanyag vagy összetevő (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (2).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

25. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik 4 órás expozíció során legalább kétszer meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázbuborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának ellenőrzésére. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (2)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában egyezés mutatható ki, a további ellenőrző mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni az expozíció eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében. Gőzök esetében a részecsekeméret-eloszlást mesterségesen kell beállítani, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában (lásd a 15. bekezdést).

ELJÁRÁS

26. Az alábbiakban kétféle vizsgálatot ismertetünk: a hagyományos és a C × t protokollt. Mindkét protokoll magában foglalhat egy dózisbehatároló vizsgálatot, egy fő vizsgálatot és/vagy egy határérték-vizsgálatot (hagyományos protokoll) vagy egy határkoncentráció mellett végzett vizsgálatot (C × t). Ha ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált anyagra, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy a vizsgálatokat csak az érzékenyebb nemen kell elvégezni. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A vizsgálat megkezdése előtt minden rendelkezésre álló adatot figyelembe kell venni az állatkísérletek számának minimalizálására. Az e melléklet B.52. fejezetét (4) alkalmazva előállított adatok például szükségtelenné tehetik a dózisbehatároló vizsgálat elvégzését, valamint azt is kimutathatják, hogy valamelyik nem érzékenyebb-e a vizsgált anyagra (lásd a 39. iránymutatást (2)).

▼M4

HAGYOMÁNYOS PROTOKOLL:

Általános megfontolások: hagyományos protokoll

27. A hagyományos vizsgálat keretében állatok csoportjait tesszük ki meghatározott (általában 4 órás) időtartamra a vizsgált vegyi anyagnak, vagy csak orron keresztüli, vagy az egész testfelületen át történő expozícióra szolgáló kamrában. Az állatokat vagy határkoncentrációnak (határérték-vizsgálat), vagy legalább három, fokozatosan növekvő koncentrációnak tesszük ki (fő vizsgálat). A fő vizsgálat előtt dózisbehatároló vizsgálat végezhető, hacsak nem állnak már rendelkezésre bizonyos információk a vizsgált vegyi anyagról, például egy korábbi, a B.52. fejezet szerint végzett vizsgálat alapján (lásd a 39. iránymutatást (2)).

Dózisbehatároló vizsgálat: hagyományos protokoll

28. A dózisbehatároló vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag hatóképességének becslése, a vegyi anyagra való érzékenység tekintetében a nemek között fennálló különbségek meghatározása, valamint a fő vizsgálat és a határérték-vizsgálat során alkalmazott koncentrációszintek kiválasztásának elősegítése. A dózisbehatároló vizsgálat során alkalmazandó koncentrációszintek kiválasztásakor fel kell használni minden rendelkezésre álló információt, beleértve a rendelkezésre álló (Q)SAR-adatokat és a hasonló vegyi anyagok adatait. Mindegyik koncentrációnak legfeljebb három hím és három nőstény tehető ki (a nemek közötti különbség megállapításához nemenként 3 állat vizsgálatára lehet szükség). A dózisbehatároló vizsgálat vonatkozhat egyetlen koncentrációra, de szükség esetén több koncentráció is vizsgálható. A dózisbehatároló vizsgálat során nem vizsgálható annyi állat és koncentráció, hogy az már egy fő vizsgálathoz legyen hasonló. Dózisbehatároló vizsgálat helyett alkalmazhatók egy, a B.52. módszer (4) szerint elvégzett korábbi vizsgálat adatai (lásd a 39. iránymutatást (2)).

Határérték-vizsgálat: hagyományos protokoll

29. Határérték-vizsgálatot akkor kell végezni, ha a vizsgált vegyi anyagról ismert vagy várható, hogy gyakorlatilag nem mérgező, azaz csak a hatóságilag előírt határkoncentráció felett idéz elő toxikus reakciót. A határérték-vizsgálat során egyetlen, három hímből és három nőstényből álló csoportot teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak határkoncentráció mellett. A vizsgált vegyi anyag toxicitásával kapcsolatban hasonló vizsgált vegyi anyagokra vonatkozó adatokból nyerhetők információk, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, valamint azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó vegyi anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

30. A határkoncentrációk kiválasztását általában a szabályozási követelmények határozzák meg. Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l (vagy az elérhető legnagyobb koncentráció) (3). Bizonyos vizsgált vegyi anyagok, különösen a gőzök és az aeroszolok határkoncentrációjának előállítása technikai szempontból kihívást jelenthet. Aeroszolok vizsgálata esetén az elsődleges cél a belélegezhető részecskeméret (1–4 μm-es MMAD) elérése. Ez a legtöbb vizsgált vegyi anyag esetén 2 mg/l koncentrációnál érhető el. Aeroszolok 2 mg/l feletti koncentrációnál történő vizsgálatát csak akkor szabad megkísérelni, ha ezzel elérhető a belélegezhető részecskeméret (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az 1272/2008/EK rendelet szerint az állatok jóléte érdekében a határkoncentráció felett végzett vizsgálatok ellenjavallottak (3). A határkoncentráció alkalmazását csak abban az esetben szabad kilátásba helyezni, ha egy ilyen vizsgálat eredménye nagy valószínűséggel közvetlen jelentőséggel bírna az emberi egészség védelme szempontjából (3), továbbá ha mindezt a vizsgálati jegyzőkönyvben indokoljuk. Robbanásveszélyes vizsgált vegyi anyagok esetén ügyelni kell a robbanást elősegítő körülmények elkerülésére. A szükségtelen állatkísérletek elkerülése végett a határérték-vizsgálatot megelőzően állatok nélküli próbavizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy a kamrában elérhetők legyenek a határérték-vizsgálathoz szükséges körülmények.

▼M4

31. Ha a határkoncentrációnál állatok elhullását vagy elhullásközeli állapotát figyeljük meg, a határérték-vizsgálat eredményei dózisbehatároló vizsgálatként használhatók más koncentrációknál végzett további vizsgálatokhoz (lásd a fő vizsgálatról szóló részt). Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai vagy kémiai tulajdonságaiból adódóan a határkoncentráció nem érhető el, a legmagasabb elérhető koncentrációt kell vizsgálni. Ha az elhullási arány az elérhető legnagyobb koncentráció mellett 50 %-nál alacsonyabb, nincs szükség további vizsgálatok elvégzésére. Ha a határkoncentrációt nem sikerült elérni, a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell ennek magyarázatát, valamint az alátámasztó adatokat. Ha egy gőz legnagyobb elérhető koncentrációja nem vált ki toxikus reakciót, a vizsgált vegyi anyag folyékony aeroszoljának előállítására lehet szükség.

Fő vizsgálat: hagyományos protokoll

32. A fő vizsgálatot általában koncentrációszintenként öt hímen és öt nőstényen végezzük el (vagy a vizsgált anyagra érzékenyebb nem 5 egyedén, amennyiben az ismert) legalább három koncentrációszinten. A megalapozott statisztikai elemzés érdekében elegendő számú koncentrációszintet kell alkalmazni. Az egyes expozíciós csoportok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját addig kell halasztani, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az előzőleg vizsgált állatok túlélése. Ez lehetővé teszi a vizsgálatvezető számára a következő expozíciós csoport célkoncentrációjának kiigazítását. Mivel mindez összetett technológiát igényel, inhalációs vizsgálatok esetén nem feltétlenül praktikus, ezért az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját korábbi tapasztalatokra és tudományos mérlegelésre kell alapozni. Keverékek vizsgálata esetén a 39. iránymutatás (2) alkalmazandó.

KONCENTRÁCIÓ × IDŐ (C × T) PROTOKOLL

Általános megfontolások: C × t protokoll

33. Az inhalációs toxicitás értékeléséhez a hagyományos protokoll helyett megfontolható egy fokozatos C x t vizsgálat elvégzése (12) (13) (14). Ez a módszer lehetővé teszi az állatok vizsgált vegyi anyagnak több koncentrációszinten és több időtartamon keresztül történő expozícióját. Minden vizsgálatot csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában végzünk el (az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamrák alkalmazása ennél a protokollnál nem praktikus). A protokollt az 1. függelékben található folyamatábra szemlélteti. Szimulációs elemzéssel megállapították, hogy mind a hagyományos, mind a C × t protokoll alkalmas megalapozott LC_{50} értékek meghatározására, azonban a megalapozott LC_{01} és LC_{10} értékek meghatározására általában alkalmasabb a C × t protokoll (15).

34. Szimulációs elemzéssel igazolták, hogy C × t-intervallumonként két állat (mindkét nem vizsgálata estén nemenként egy, vagy a vizsgált anyagra érzékenyebb nemből két példány) általában elegendő, ha a fő vizsgálat során 4 koncentrációt és 5 expozíciós időtartamot vizsgálunk. Bizonyos körülmények között a vizsgálatvezető döntése alapján minden C × t-intervallumhoz nemenként két patkány alkalmazható (15). Ha minden koncentrációhoz és időponthoz nemenként 2 állatot alkalmazunk, csökkenhet a becslések torzítása és variabilitása, nőhet a sikeres becslések aránya, és javulhat a konfidenciaintervallum lefedettsége. A becsléshez használt adatokhoz való nem kellően szoros illeszkedés esetén azonban (amennyiben nemenként egy állatot vagy az adott anyagra érzékenyebb nemből két példányt vizsgálunk) egy 5. expozíciós koncentráció használata is elég lehet. A C × t vizsgálat során használandó állatok és koncentrációk számával kapcsolatban a 39. iránymutatás tartalmaz további útmutatást (2).

▼M4

Dózisbehatároló vizsgálat: C × t protokoll

35. A dózisbehatároló vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag hatóképességének becslése és a fő vizsgálat során alkalmazott koncentrációszintek kiválasztásának elősegítése. A fő vizsgálat során alkalmazandó megfelelő kiindulási koncentráció kiválasztása, valamint a vizsgált állatok számának minimalizálása érdekében nemenként és koncentrációnként legfeljebb három állatot alkalmazó dózisbehatároló vizsgálatra lehet szükség (részleteket lásd a 39. iránymutatás III. függelékében (2)). A nemek közötti eltérés megállapításához nemenként három állat vizsgálata lehet szükséges. Ezeket az állatokat egyetlen, általában 240 perces időtartamra kell kitenni a vizsgált anyagnak. A megfelelő vizsgálati légkörök előállításának megvalósíthatóságát az állatok nélkül végzett előzetes műszaki vizsgálatok során kell felmérni. Általában nem szükséges dózisbehatároló vizsgálatot végezni, ha elhullási adatok állnak rendelkezésre egy, a B.52. módszer szerint végzett vizsgálat alapján (4). A kiindulási célkoncentráció B.2. módszer szerinti vizsgálat során való kiválasztásakor a vizsgálatvezetőnek figyelembe kell vennie az esetlegesen rendelkezésre álló, B.52. módszer szerinti vizsgálatok (4) során mindkét nem és minden vizsgált koncentráció tekintetében megfigyelt elhullási mintákat (lásd a 39. iránymutatást (2)).

Kiindulási koncentráció: C × t protokoll

36. Kiindulási koncentrációként (I. expozíciós szakasz) (1. függelék) vagy határkoncentrációt, vagy egy, a vizsgálatvezető által a dózisbehatároló vizsgálat alapján kiválasztott koncentrációt alkalmazunk. Ennek a koncentrációnak nemenként 1 állatot teszünk ki több időtartamra (például 15, 30, 60, 120 vagy 240 percre), így az állatok teljes száma 10 (ezt nevezik az I. expozíciós szakasznak) (1. függelék).

37. A határkoncentrációk kiválasztását általában a szabályozási követelmények határozzák meg. Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l (vagy az elérhető legnagyobb koncentráció) (3). Bizonyos vizsgált vegyi anyagok, különösen a gőzök és az aeroszolok határkoncentrációjának előállítása technikai szempontból kihívást jelenthet. Aeroszolok vizsgálata esetén a cél a belélegezhető részecskeméret (azaz 1–4 μm-es MMAD) elérése 2 mg/l határkoncentráció mellett. Ez a legtöbb vizsgált vegyi anyag esetén elérhető. Aeroszolok 2 mg/l feletti koncentrációnál történő vizsgálatát csak akkor szabad megkísérelni, ha ezzel elérhető a belélegezhető részecskeméret (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az 1272/2008/EK rendelet szerint az állatok jóléte érdekében a határkoncentráció felett végzett vizsgálatok ellenjavallottak (3). A határkoncentráció feletti vizsgálatot csak abban az esetben szabad kilátásba helyezni, ha egy ilyen vizsgálat eredménye nagy valószínűséggel közvetlen jelentőséggel bírna az emberi egészség védelme szempontjából (3); a vizsgálati jegyzőkönyvben mindezt indokolni kell. Robbanásveszélyes vizsgált vegyi anyagok esetén ügyelni kell a robbanást elősegítő körülmények elkerülésére. A szükségtelen állatkísérletek elkerülése végett a kiindulási koncentráció melletti vizsgálatot megelőzően állatok nélküli próbavizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy a kamrában elérhetők legyenek az e koncentrációhoz szükséges körülmények.

38. Ha a kiindulási koncentrációnál állatok elhullását vagy elhullásközeli állapotát figyeljük meg, az e koncentráció mellett kapott eredmények felhasználhatók más koncentrációk mellett végzett további vizsgálatok kiindulópontjaként (lásd a fő vizsgálatról szóló részt). Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai vagy kémiai tulajdonságaiból adódóan a határkoncentráció nem érhető el, a legmagasabb elérhető koncentrációt kell vizsgálni. Ha az elhullási arány az elérhető legnagyobb koncentráció mellett 50 %-nál alacsonyabb, nincs szükség további vizsgálatok elvégzésére. Ha a határkoncentrációt nem sikerült elérni, a vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell ennek magyarázatát, valamint az alátámasztó adatokat. Ha egy gőz legnagyobb elérhető koncentrációja nem vált ki toxikus reakciót, a vizsgált vegyi anyag folyékony aeroszoljának előállítására lehet szükség.

▼M4

Fő vizsgálat: C x t protokoll

39. A fő vizsgálat során vizsgált kiindulási koncentrációként (I. expozíciós szakasz) (1. függelék) vagy határkoncentrációt, vagy egy, a vizsgálatvezető által a dózisbehatároló vizsgálat alapján kiválasztott koncentrációt alkalmazunk. Ha az I. expozíciós szakasz során vagy azt követően állatok elhullását figyeljük meg, az elhullást okozó minimális koncentrációt (C x t) kell alapul venni a II. expozíciós szakasz során alkalmazandó koncentrációk és expozíciós időtartamok meghatározásához. Minden soron következő expozíciós szakaszt az azt megelőző szakasz határoz meg (lásd az 1. függeléket).

40. Számos vizsgált vegyi anyag esetében a kiindulási koncentráció mellett kapott eredmények, valamint három további, kisebb időbeli távolságú (azaz az expozíciós időtartamok közötti, két egymást követő időtartam – általában $\sqrt{2}$ értékű – tényezője által kifejezett geometriai távolságú) expozíciós szakasz eredményei elegendők a C x t és az elhullás közötti összefüggés meghatározására (15), azonban egy 5. expozíciós koncentráció alkalmazása előnyökkel járhat (lásd az 1. függeléket és a 39. iránymutatást (2)). A C x t protokoll eredményeinek matematikai feldolgozását az 1. függelék ismerteti.

MEGFIGYELÉSEK

41. Az expozíció időtartama alatt az állatokat gyakori klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az expozíciót követően az expozíció napján legalább kétszer, vagy – amennyiben az állatok kezelésre adott reakciója ezt indokolja – annál gyakrabban, az azt követő 14 nap során pedig naponta legalább egyszer klinikai megfigyeléseket kell végezni. A megfigyelés időtartama nem rögzített, hanem a klinikai tünetek jellege és jelentkezésének ideje, valamint a felépülés időtartama alapján határozandó meg. Fontos a toxicitási tünetek megjelenésének és megszűnésének időpontja, különösen, ha fennáll a toxicitási tünetek késleltetett megjelenésének tendenciája. Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Állatjóléti okokból humánus módon el kell pusztítani az elhullásközeli állapotban lévő, valamint súlyos fájdalom és/vagy tartós és súlyos szorongás jeleit mutató állatokat. A toxicitás klinikai tünetei előfordulásának vizsgálata során ügyelni kell arra, hogy az expozíciós eljárás okozta kezdeti beteges megjelenést és átmeneti légúti változásokat ne azonosítsuk tévesen a vizsgált vegyi anyaggal összefüggő, az állatok idő előtti elpusztítását szükségessé tevő toxicitásként. A humánus végpontokról szóló (19. számú) iránymutatásban összegzett elveket és követelményeket is figyelembe kell venni (7). Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

42. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszer, továbbá a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Lehetőség szerint fel kell jegyezni, ha különbséget lehet tenni a helyi és szisztémás hatások között. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára.

Testsúly

43. Az egyes állatok súlyát a szoktatási időszak során egy alkalommal, az expozíció napján (0. nap) az expozíció előtt, valamint legalább az 1., 3. és 7. napon (azt követően pedig hetente) egy-egy alkalommal, továbbá az 1. napon túli elhullás vagy elpusztítás időpontjában fel kell jegyezni. A testsúly a toxicitás kulcsfontosságú indikátorának számít, ezért a vizsgálat előtti értékekhez képest legalább 20 %-os tartós súlycsökkenést mutató állatokat szorosan figyelemmel kell kísérni. Az expozíciót követő időszak végén az életben maradt állatokat újra megmérjük, majd humánus módon elpusztítjuk.

▼M4

Patológia

44. Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni, azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett pusztítani és ki kellett vonni a vizsgálatból. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevettük, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

45. A vizsgálat értelmező értékének fokozása érdekében előzetesen, terv szerint kilátásba helyezhetők olyan további vizsgálatok, mint az életben maradt patkányok tüdeje súlyának megmérése és/vagy az irritációnak a légzőrendszer mikroszkópos vizsgálatával való igazolása. Megvizsgálhatók azok a szervek is, amelyek makroszkopikus patológia jeleit mutatják 24 óráig vagy annál tovább életben maradt állatoknál, valamint olyan szervek, amelyekről ismert vagy várható, hogy a vizsgált anyag hatást gyakorolt azokra. A teljes légzőrendszer mikroszkópos vizsgálata hasznos információkkal szolgálhat a vízzel könnyen reagáló vizsgált vegyi anyagokról, például a savakról és higroszkópos vegyi anyagokról.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

46. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyával és boncolási eredményeivel kapcsolatos adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

Vizsgálati jegyzőkönyv

47. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— a ketrecben való tartás körülményei, beleértve a következőket: az állatok ketrecenkénti száma (vagy számának változása), az alom anyaga, környezeti hőmérséklet és relatív páratartalom, a megvilágítás időtartama, valamint a takarmány meghatározása,

— a vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása,

— az állatok száma, kora és neme,

— a véletlen kiválasztás módszere,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányt, a karantént és a betegség kezelését,

▼M4

Vizsgált vegyi anyag

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt),

— azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám),

Vivőanyag

— a vivőanyag használatának, valamint kiválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz),

— múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét,

Inhalációs kamra

— az inhalációs kamra leírása, beleértve annak méreteit és térfogatát,

— az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása,

— a hőmérséklet, páratartalom, részecskeméret és tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések,

— a levegő forrása és a bevitt/elszívott levegő kezelése, valamint a kondicionáló rendszer,

— az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek,

— nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív),

— expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a rendszerben (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— a vizsgálati légkör időbeli homogenitása/stabilitása,

— a hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában,

— légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— adott esetben az oxigén és a szén-dioxid mérésére használt eszközökre vonatkozó információk,

— az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t_{95}),

— a térfogatváltozások óránkénti száma,

— mérőberendezések (ha vannak),

Expozíciós adatok

— a fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása,

— névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával),

— a vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő keverékek esetén mindegyik külön elemezhető,

▼M4

— minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (például mg/l, mg/m^3 stb.) kell megadni; zárójelben a térfogategységekben (például ppm, ppb stb.) kifejezett értékek is feltüntethetők;

— részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σg), beleértve azok kiszámításának módját. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket,

Vizsgálati körülmények

— a vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak készítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit. Amennyiben a mechanikai folyamatok megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételének ellenőrzése érdekében végzett elemzések eredményeit is fel kell tüntetni,

— a vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való kitételére alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal),

— az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát),

— a vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása,

Eredmények

— a kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás táblázatos összefoglalása,

— a kamra névleges és tényleges koncentrációs adatainak táblázatos összefoglalása,

— részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait,

— a válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és köztük az elhullt állatok, a hatások jellege, súlyossága, megjelenésének időpontja és időtartama),

— az egyes állatok vizsgálat során mért testsúlya, az elhullás dátuma és időpontja, amennyiben az a tervszerű elpusztítást megelőzően történt, a toxicitási tünetek megjelenésének időbeli alakulása, valamint annak megjelölése, hogy azok visszafordíthatók voltak-e az egyes állatoknál,

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan,

— letalitási becslések (például LC_{50}, LD_{01}), beleértve a 95 %-os konfidenciahatárokat és a meredekséget (amennyiben az értékelési módszerrel meghatározható),

— statisztikai reláció, beleértve az n exponens becslését (C × t protokoll). Fel kell tüntetni az alkalmazott statisztikai szoftver nevét,

▼M4

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszer feltételeinek – például a határkoncentrációnak vagy a részecskeméretnek – való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására,

— ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltétel nem teljesült,

— magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (8) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat,

— amennyiben az e melléklet B.52. fejezete (4) szerinti vizsgálatot felfüggesztettük, hogy helyette a jelen B.2. vizsgálati módszert alkalmazzuk, a döntést indokolni kell,

— a vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek konzisztenciáját, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést,

— ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi).

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [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, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

(4) E melléklet B.52., Akut inhalációs toxicitás – Akut toxikus osztály (ATC) módszer című fejezete.

(5) E melléklet B.40., In vitro bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia vizsgálat (TER) című fejezete.

(6) E melléklet B.40A., In vitro bőrkorrózió: emberi bőrmodellen végzett vizsgálat című fejezete.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [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, OECD, Paris. Available at: [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. AppéldáulToxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. AppéldáulToxicol. 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 and 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 x t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

1. függelék

C × t PROTOKOLL

1. Az inhalációs toxicitás értékeléséhez a hagyományos protokoll helyett megfontolható egy fokozatos koncentráció × idő (C × t) vizsgálat elvégzése (12) (13) (14). Ez a vizsgálat lehetőség szerint abban az esetben végzendő el, ha meghatározott szabályozási vagy tudományos igény miatt, például veszélyhelyzeti intézkedések tervezéséhez vagy területrendezéshez több időtartamon át végzett állatkísérletekre van szükség. A módszer általában egy határkoncentráción végzett vizsgálattal kezdődik (I. expozíciós szakasz), amelynek során az állatokat a vizsgált anyagnak öt időtartamra (például 15, 30, 60, 120 és 240 percre) tesszük ki úgy, hogy egyetlen expozíciós szakasz során több időtartamot vizsgálunk (lásd az 1. ábrát). Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l. Ezek a szintek kizárólag akkor léphetők túl, ha az adott szinteken történő vizsgálatot szabályozási vagy tudományos igény indokolja (lásd a B.2. fejezet fő szövegének 37. bekezdését).

2. Amennyiben kevés a vizsgált vegyi anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, dózisbehatároló vizsgálatot kell végezni, amelynek során nemenként legfeljebb 3 állatból álló csoportokat teszünk ki a vizsgálatvezető által kiválasztott célkoncentrációknak, általában 240 percre.

3. Ha az I. expozíciós szakasz során határkoncentrációt vizsgálunk, és az elhullási arány 50 % alatti, nincs szükség további vizsgálatokra. Amennyiben szabályozási vagy tudományos igény mutatkozik a koncentráció, az idő és a válasz közötti összefüggésnek a megjelölt határkoncentrációt meghaladó szinten történő meghatározására, a következő expozíciót magasabb szinten, például határkoncentráció kétszeresénél kell végrehajtani (lásd az 1. ábrán a 2L szintet).

4. Ha a határkoncentrációnál toxicitást figyelünk meg, további vizsgálat (fő vizsgálat) elvégzése szükséges. Ezeket a további expozíciókat vagy alacsonyabb koncentrációk mellett (az 1. ábrán a II., III. vagy IV'. expozíciós szakasz), vagy magasabb koncentrációk mellett, rövidebb időtartamon át (az 1. ábrán a IV. expozíciós szakasz) kell elvégezni, kiigazított és egymástól kevésbé távoli időtartamok alkalmazásával.

5. A vizsgálatot (kiindulási koncentráció és további koncentrációk mellett) nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1 állaton, vagy koncentrációnként és időpontonként a vizsgált anyagra érzékenyebb nem 2 példányán végezzük el. Bizonyos körülmények között a vizsgálatvezető nemenként, koncentrációnként és időpontonként 2 patkány (vagy koncentrációnként és időpontonként a vizsgált anyagra érzékenyebb nem 4 példányának) vizsgálata mellett is dönthet (15). Ha minden koncentrációhoz és időponthoz nemenként 2 állatot alkalmazunk, általában csökkenthető a becslések torzítása és variabilitása, növelhető a sikeres becslések aránya, és javítható a konfidenciaintervallum lefedettsége az itt ismertetett protokollhoz viszonyítva. További részletek a 39. iránymutatásban (2) olvashatók.

6. Ideális esetben mindegyik expozíciós szakaszt ugyanazon a napon hajtjuk végre. Ez lehetővé teszi, hogy a következő expozíciót addig halasszuk, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az állatok túlélése, valamint a vizsgálatvezető számára lehetőséget biztosít a következő expozíciós szakasz célkoncentrációjának kiigazítására. Javasolt mindegyik expozíciós szakaszt azzal a csoporttal kezdeni, amelynek expozíciója a leghosszabb ideig fog tartani, például a 240 perces expozíciós csoporttal, folytatva a 120 perces expozíciós csoporttal stb. Ha például a 240 perces csoportban vizsgált állatok 90 perc elteltével elpusztulnak vagy a toxicitás súlyos tüneteit mutatják (például a légzésritmus szélsőséges változásait, beleértve a nehéz légzést), a következő csoportot nem volna célszerű 120 perces expozíciónak kitenni, mivel az elhullási arány feltehetően 100 %-os lenne. A vizsgálatvezetőnek javasolt tehát rövidebb (például 90, 65, 45, 33 és 25 perces) expozíciós időtartamokat választania az adott koncentrációhoz.

▼M4

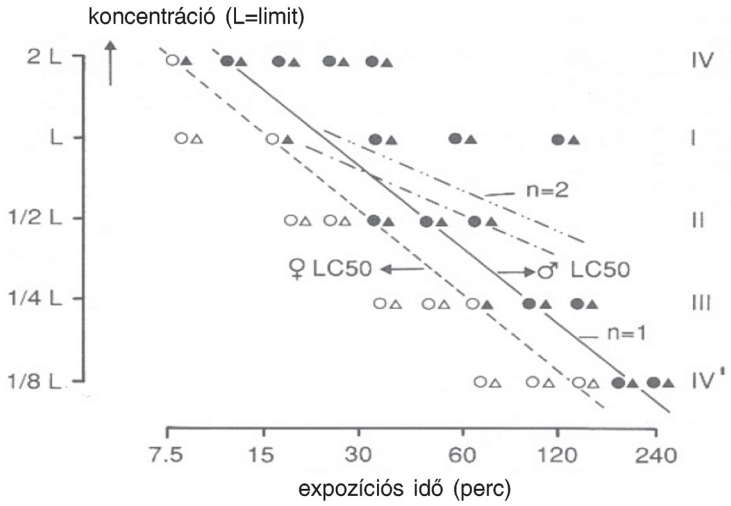
7. A kamrabeli koncentrációt gyakran kell mérni az egyes expozíciós időtartamok időarányosan súlyozott átlagkoncentrációjának meghatározása érdekében. Lehetőség szerint minden egyes állat elhullásának időpontját (nem pedig az expozíciós időtartamot) kell a statisztikai elemzés során felhasználni.

8. Az első négy expozíciós szakasz eredményeit megvizsgálva meg kell határozni a koncentráció-idő görbe azon részét, amelyen az adatok hiányosak (lásd az 1. ábrát). Nem megfelelő illeszkedés esetén egy további (5. koncentráció melletti) expozíció végezhető. Az 5. expozícióhoz használt koncentrációt és időtartamokat úgy kell megválasztani, hogy lefedjék e hiányzó adatokat.

9. Mindegyik expozíciós szakaszt (beleértve az elsőt is) felhasználjuk a koncentráció-idő-válasz összefüggés statisztikai elemzés útján történő meghatározására (16). Lehetőség szerint minden egyes C × t-intervallumhoz az időarányosan súlyozott átlagkoncentrációt és (amennyiben az elhullás az expozíció során következik be) az elhullásig eltelt expozíciós időt kell felhasználni.

1. ábra

Patkányoknál megfigyelt koncentráció-idő-elhullás összefüggés hipotetikus ábrája



Üres szimbólumok = életben maradt állatok; teli szimbólumok = elhullott állatok

Háromszög = nőstény; kör = hím

Összefüggő vonal = LC_{50} értékek (tartomány: 7,5–240 perc) n = 1 értékű hímeknél

Szaggatott vonal = LC_{50} értékek (tartomány: 7,5–240 perc) n = 1 értékű nőstényeknél

Pontozott vonal = hipotetikus LC_{50} értékek vonala hímek és nőstények vonatkozásában, ha az n értéke 2 lett volna (12).

Glosszárium

koncentráció:

expozíciós idő:

▼M4

10. Az alábbi példa egy lépésenkénti folyamatot szemléltet:

I. expozíciós szakasz – határkoncentrációnál végzett vizsgálat (lásd az 1. ábrát)

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat ([a])

— Célkoncentráció ([b]) = határkoncentráció.

— Állatok öt csoportját tesszük ki a célkoncentrációnak 15, 30, 60, 120, illetve 240 percre.

↓

II. expozíciós szakasz ([c]) – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki alacsonyabb koncentrációnak ([d]) (1/2L), némileg hosszabb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

↓

III. expozíciós szakasz – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki alacsonyabb koncentrációnak ([d]) (1/4L), némileg hosszabb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

↓

IV'. expozíciós szakasz – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki alacsonyabb koncentrációnak ([d]) (1/8L), némileg hosszabb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

↓ vagy

([a]) Amennyiben nem áll rendelkezésre információ az anyagra való érzékenység tekintetében a nemek között fennálló különbségről, mindkét nemhez tartozó patkányokat, azaz nemenként és koncentrációnként 1 állatot vizsgálunk. Meglévő információk alapján, vagy ha ezen expozíciós szakasz során nyilvánvalóvá válik, hogy az egyik nem érzékenyebb a vizsgált anyagra, a további vizsgálatok során mindegyik koncentrációszintnél az érzékenyebb nem 10 egyedét vizsgáljuk (koncentrációnként és időpontonként 2 állatot).

([b]) Az 1272/2008/EK rendelet alkalmazása esetén a gázok, gőzök és aeroszolok határkoncentrációja rendre 20 000 ppm, 20 mg/l és 5 mg/l. Várható toxicitás esetén vagy a dózisbehatároló vizsgálat eredményei alapján alacsonyabb kiindulási koncentrációkat kell választani. Szabályozási vagy tudományos igény esetén magasabb koncentráció is alkalmazható.

([c]) Az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját ideális esetben addig kell halasztani, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az előzőleg kezelt állatok túlélése. Ez lehetővé teszi a vizsgálatvezető számára a következő expozíciós szakasz célkoncentrációjának és időtartamainak kiigazítását.

([d]) A kiindulási koncentráció mellett (az I. expozíciós szakaszban) elhullást okozó legalacsonyabb dózist (koncentráció × idő) vesszük alapul a koncentráció és az expozíciós időtartamok következő kombinációjának meghatározásakor. A koncentrációt általában felezzük (1/2L), és az állatokat új, az első expozíció során megfigyelt minimális halálos dózisszint (idő × koncentráció) ideje körül 1,4-es tényező (√2, lásd a 11. hivatkozást) alapján geometriailag elosztott expozíciós időtartamokból álló, sűrűbb felosztású időtartomány folyamán tesszük ki a vizsgált anyagnak. Ezen az ábrán (1. ábra) az I. expozíciós szakaszban először 15 percnél figyeltek meg elhullást; a II. szakasz időtartamait ezért a 30 perces időtartam körül határozzák meg 15, 21, 30, 42 és 60 percben. Az első két expozíciót követően határozottan javasolt az adatokat egy, a fentihez hasonló grafikonon ábrázolni, és ellenőrizni, hogy a koncentráció és az idő közötti összefüggés 45 fokos szöget zár be (n = 1), vagy a koncentráció-idő-válasz összefüggés meredeksége kisebb (például n = 2), illetve nagyobb (például n = 0,8). Az utóbbi esetekben erősen javasolt a következő koncentrációkat és időtartamokat ennek megfelelően kiigazítani.

▼M4

IV. expozíciós szakasz – fő vizsgálat

— Nemenként, koncentrációnként és időpontonként 1, összesen 10 állat.

— Állatok öt csoportját tesszük ki magasabb koncentrációnak ([e]) (2L), némileg rövidebb (√2 tényezővel elválasztott) expozíciós időtartamokra (lásd az 1. ábrát).

A C × t protokoll eredményeinek matematikai feldolgozása

11. Egy 4 vagy 5 expozíciós koncentrációra és 5 időtartamra kiterjedő C × t eljárással 20 vagy 25 adatpont kapható. Ezen adatpontok alapján statisztikai elemzéssel (16) kiszámítható a C × t összefüggés:

1. egyenlet:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

ahol C = koncentráció; t = az expozíció időtartama, vagy

2. egyenlet:

$$Response = f(C^n t)$$

ahol $n = b_1/b_2$.

Az 1. egyenlettel kiszámítható az LC_{50} értéke egy adott időtartamra (például 4 órára, 1 órára, 30 percre vagy a vizsgált időtartamok tartományán belüli bármely időtartamra) a P = 5 (50 %-os válasz) értéket alkalmazva. Megjegyzendő, hogy a Haber-szabály csak akkor alkalmazható, ha n = 1. Az LC_{01} a P = 2,67 érték segítségével számítható ki.

([e]) Bizonyos esetekben a koncentráció növelésére (2L) lehet szükség új, az első expozíció során megfigyelt minimális halálos koncentrációszint ideje körül 1,4-es tényező (√2) alapján geometriailag elosztott expozíciós időtartamokból álló, még sűrűbb felosztású időtartományt alkalmazva. Az expozíció minimális időtartamának lehetőség szerint meg kell haladnia az 5 percet, az expozíció maximális időtartama nem lehet több 8 óránál.

▼B

B.3. **AKUT TOXICITÁS (DERMÁLIS)**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta, a bőrre kell adagolni fokozatos adagokban több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként egy adagot használva. Ezt követően megfigyelik a hatásokat és a halálesetek előfordulását. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon el lehet pusztítani. A vizsgált anyagokat nem szabad olyan módon adagolni, amelyről ismert, hogy jelentős szenvedést és fájdalmat okoz maró vagy irritatív tulajdonsága miatt.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással csoportokba kell osztani. A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani a szőrzetet az állatok törzsének hátulsó területéről nyírással vagy borotválással. A szőrzet nyírásakor vagy borotválásakor óvatosan kell eljárni, nehogy olyan bőrsérülést okozzanak, ami a felszívódást befolyásolhatja. A testfelület legalább 10 %-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Ha szilárd anyagot vizsgálnak, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy jól tapadjon a bőrhöz. Vivőanyag használatakor figyelembe kell venni a vivőanyag hatását a vizsgált anyag bőrbe való behatolására. A folyékony vizsgált anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Kifejlett patkány vagy nyúl használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni. Kísérleti célokra tenyésztett, laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20 %-kal térhet el egymástól.

▼B

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden koncentrációnál legalább öt állatot kell vizsgálni. Az állatoknak azonos neműnek kell lenniük. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Amennyiben rendelkezésre áll olyan információ, amely szerint valamelyik nem lényegesen érzékenyebben reagál, akkor ilyen nemű állatokat kell alkalmazni.

Megjegyzés: A rágcsálóknál magasabb rendű állatokkal végrehajtott akuttoxicitás-vizsgálatokban meg kell fontolni kisebb számú állat használatának lehetőségét. A dózisokat gondosan kell kiválasztani, és minden erőfeszítést meg kell tenni arra, hogy azok ne lépjék túl a közepesen toxikus dózisokat. Ilyen vizsgálatoknál el kell kerülni a vizsgált anyag letális dózisának beadását.

1.6.2.3. *Dózisok*

E szinteknek elegendő számúaknak, legalább háromnak, és megfelelően elosztottnak kell lenniük ahhoz, hogy a vizsgált csoportokban toxikus hatások és halálozási arányok egész sorát hozzák létre. Minden irritatív vagy maró hatást figyelembe kell venni a dózisok megállapításakor. Az adatoknak elegendőnek kell lenniük a koncentráció/hatás görbe létrehozására, és ahol lehetséges, lehetővé kell tenniük az LD_{50} elfogadható meghatározását.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

A határérték-vizsgálatot el lehet végezni egyetlen, legalább 2 000 mg/testsúly kg dózissal adagolt 5 hím és 5 nőstény rágcsálóból álló csoporttal a fent leírt eljárások végrehajtásával. Ha a vizsgált anyaggal kapcsolatos halálozás figyelhető meg, akkor szükség lehet a teljes körű vizsgálat elvégzésére.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. Azonban a megfigyelés időtartamát nem kell szigorúan értelmezni. Ezt a toxikus reakciók megjelenésének módja, a tünetek megjelenésének időpontja és a felépülési időtartam hosszúsága alapján kell meghatározni; ebből következően ezen időtartam szükség esetén meghosszabbítható. Fontos az az időpont, amikor a toxicitás jelei megjelennek és eltűnnek, valamint a halál bekövetkezésének ideje, különösen, ha tendencia figyelhető meg a halál késedelmes bekövetkezésére.

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10 %-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

A 24 órás expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel porózus gézkötés és nem irritáló ragtapasszal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni, azért hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt.

▼B

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

A megfigyeléseket szisztematikusan fel kell jegyezni. Külön feljegyzést kell vezetni minden egyes állatról. Az első nap során gyakran kell végrehajtani a megfigyeléseket. Minden munkanapon legalább egyszer gondos klinikai vizsgálatot kell végrehajtani, más megfigyeléseket naponta kell végezni, azon megfelelő tevékenységek végrehajtása mellett, amelyek célja a vizsgálatban részt vevő állatok elhullásának minimalizálása, ilyen például a holtan talált állatok boncolása vagy lehűtése, vagy a gyenge vagy haldokló állatok elkülönítése vagy elpusztítása.

A megfigyeléseknek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a kezelt bőrfelület, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző- és keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és viselkedési minta változásaira. Külön figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A halál időpontját a lehető legpontosabban kell feljegyezni. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat befejezéséig életben maradt állatokat fel kell boncolni. Fel kell jegyezni minden jelentős patológiás elváltozást. Amennyiben szükséges, szövetmintákat kell venni a kórszövettani vizsgálathoz.

Toxicitás meghatározása a másik nemnél

Az egyik nemmel végzett vizsgálat befejezése után a másik nemből kiválasztott, legalább öt állatból álló csoport számára kell adagolni az anyagot annak megállapítására, hogy az e nemhez tartozó állatok nem érzékenyebbek-e jelentősebb mértékben a vizsgált anyagra. Bizonyos esetekben indokolható lehet kevesebb állat használata. Ahol megfelelő információ áll rendelkezésre annak bizonyítására, hogy a vizsgált nemhez tartozó állatok jelentősen érzékenyebbek, elhagyható a másik nemhez tartozó állatokkal végzett vizsgálat.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva minden egyes csoportnál az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, az egyes állatok halálának időpontját, a toxicitás más jeleit mutató állatok számát, a toxikus hatások leírását és a boncolási leleteket. Egyenként meg kell határozni az állatok tömegét, és fel kell ezt jegyezni röviddel a vizsgált anyag beadása előtt, ezután minden héten és a halál bekövetkeztekor; ki kell számítani és fel kell jegyezni a tömegváltozásokat, ha az állat egy napnál tovább maradt életben. A vizsgált anyaggal összefüggő szenvedés és fájdalom miatt humánusan elpusztított állatok halálát az anyaggal kapcsolatos halálként kell feljegyezni. Az LD_{50} valamely elismert módszer segítségével határozható meg.

Az értékelésnek tartalmaznia kell – amennyiben ez lehetséges – a dózis és a rendellenességek fellépése és súlyossága közötti kapcsolatot, ideértve a magatartási rendellenességeket, a klinikai tüneteket, a jelentős sérüléseket, testsúlyváltozásokat, a halálozást és minden más toxikus tünetet is.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

▼B

— a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet stb.,

— a vizsgálati körülményeket (beleértve a bőrtisztítás módszerét és a kötszer típusát: zárt vagy nem zárt),

— a dózisokat (beleértve a vivőanyagot is, ha van és koncentrációk),

— a kezelt állatok nemét,

— az adatok táblázatos összefoglalását nem és koncentráció szerint (azaz a vizsgálat során elhullott vagy elpusztított állatok száma; a toxicitás jeleit mutató állatok száma; az exponált állatok száma),

— az anyag adagolása során vagy azt követően bekövetkező halál időpontját, az állatok humánus elpusztításának okait és kritériumait,

— minden megfigyelést,

— a 14 napban meghatározott teljes vizsgálat alá vont nemnél kapott LD_{50}- érték (az alkalmazott számítási módszer megadásával),

— az LD_{50}-hez tartozó 95 %-os konfidenciaintervallumot (ahol ez megadható),

— a dózis/mortalitás görbét és ennek meredekségét (ahol ezt megengedi a meghatározás módszere),

— a boncolási leleteket,

— a kórszövettani vizsgálatok eredményeit,

— a másik nemmel végrehajtott vizsgálatok eredményeit,

— az eredmények kiértékelését (külön figyelmet kell szentelni annak a hatásnak, amelyet a vizsgálat során az állatok humánus leölése gyakorolhat a kiszámított LD_{50}-értékre),

— az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

▼B

B.4. AKUT TOXICITÁS: BŐRIRRITÁCIÓ/BŐRKORRÓZIÓS HATÁS

1. MÓDSZER

Ez a módszer egyenértékű az OECD TG 404 (2002) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Ennek a továbbfejlesztett módszernek a kidolgozása során külön figyelmet szenteltek az állatjóléti szempontokkal kapcsolatos lehetséges javító beavatkozásoknak és a vizsgálandó anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló összes információ kiértékelésének, hogy ezáltal elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés. A módszer ajánlást fogalmaz meg arra nézve, hogy az anyag korrorróziós vagy irritáló hatásának vizsgálatára előírt *in vivo* kísérlet elvégzése előtt el kell végezni a rendelkezésre álló adatok bizonyító erejének elemzését (weight-of-the-evidence analysis). Ha nem áll rendelkezésre elegendő adat, akkor ezek mennyisége lépcsőzetes vizsgálatok alkalmazásával növelhető (1). A vizsgálati stratégia részét képezi validált és elfogadott *in vitro* vizsgálatok végzése, amelyek a módszerhez csatolt függelékben kerülnek ismertetésre. Emellett javasolt, hogy – ahol lehet – a kiindulási *in vivo* vizsgálat során az állatra ne egyszerre, hanem időben egymás után helyezzék fel a három teszttapaszt.

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg az anyag potenciális korróziós/bőrirritáló hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adaton el nem végezték azok bizonyító erejének elemzését. Ilyen adatok az embereken és/vagy laboratóriumi állatokon elvégzett vizsgálatok eredményei, a szerkezetileg rokon anyagok vagy elegyeik korróziós/irritáló hatásaival kapcsolatos bizonyítékok, az anyag erős savasságát vagy lúgosságát igazoló adatok (2)(3), valamint a validált és elfogadott *in vitro* vagy ex vivo vizsgálatokból kapott eredmények (4)(5)(5a). Az elemzésnek csökkentenie kell az *in vivo* bőrkorróziós/bőrirritációs vizsgálatok iránti igényt azoknak az anyagoknak az esetében, amelyekre az említett két végpont tekintetében más vizsgálatokból elegendő bizonyíték áll rendelkezésre.

A preferált lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely validált és elfogadott *in vitro* vagy ex vivo korróziós/irritációs vizsgálatok elvégzését is magában foglalja, a módszerhez csatolt függelékben kerül ismertetésre. A stratégiát egy OECD-munkaértekezlet (6) résztvevői dolgozták ki, javasolták egyhangúlag, majd fogadták el mint a Globálisan harmonizált rendszer (GHS) a vegyi anyagok osztályozására (7) ajánlott vizsgálati stratégiáját. Az *in vivo* vizsgálatok elvégzése előtt ezt a vizsgálati stratégiát javasolt követni. Új anyagok esetében ez az ajánlott lépcsőzetes vizsgálati megközelítés a tudományos szempontból megfelelő adatok gyűjtésére az anyag korróziós/-irritáló hatásaival kapcsolatosan. Ismert anyagok esetében, ha nem áll rendelkezésre elegendő adat a bőrkorróziós/bőrirritáló hatásokról, ennek a stratégiának az alkalmazásával kell pótolni a hiányzó adatokat. Megfelelően meg kell indokolni az ettől eltérő vizsgálati stratégia vagy eljárás alkalmazását, vagy ha úgy döntenek, hogy nem használják a lépcsőzetes vizsgálati megközelítést.

Ha a korróziós vagy irritáló hatásokat nem lehet meghatározni az adatok bizonyító erejének elemzésével, a lépcsőzetes vizsgálati stratégiával összhangban fontolóra kell venni *in vivo* vizsgálatok elvégzését (lásd a függelékben).

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Bőrirritáció: a vizsgálandó anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás.

Bőrkorróziós hatás: a vizsgálandó anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámon át az irhára is átterjedő látható szövetelhalás. A korróziós reakciót fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szőrtelen területek és hegek jellemzik. A problémás léziók kiértékelése érdekében fontolóra kell venni kórszövettani vizsgálatok elvégzését.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat bőrén; a vizsgált állat nem kezelt bőrfelületei szolgálnak kontrollként. Az irritáció/korrózió mértékét meghatározott időközönként kell ellenőrizni és értékelni, továbbá a hatások teljes kiértékelése érdekében részletesebben is ismertetni. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a megfigyelt hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.

A vizsgálat bármely fázisában tartós súlyos szorongás és/vagy fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell, és az anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok humánus módon történő exterminálásáról szóló döntéssel kapcsolatos kritériumok a (8) hivatkozásban találhatók.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az *in vivo* vizsgálat előkészítése**

1.4.1.1. *Az állatfaj kiválasztása*

A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Más fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

1.4.1.2. *Az állatok előkészítése*

A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani az állat szőrzetét úgy, hogy teljesen le kell nyírni az állat törzsének dorzális területét. Vigyázni kell arra, hogy eközben ne dörzsöljék ki az állat bőrét, és csak olyan állatokat szabad alkalmazni, amelyek bőre ép és egészséges.

Egyes nyúltörzsek szőrzete sűrű foltokban nő, amelyek az év egyes szakaszaiban még szembetűnőbbek. Nem szabad vizsgálati területként használni az ilyen sűrű szőrzetnövekedéssel jellemzett részeket.

1.4.1.3. *Az állatok tartásának és etetésének körülményei*

Az állatokat egyedileg kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 20 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

▼B

1.4.2. **A vizsgálati eljárás**

1.4.2.1. *A vizsgálandó anyag alkalmazása*

A vizsgálandó anyagot egy kis (körülbelül 6 cm^2-es) bőrterületre kell kijuttatni, majd egy géztapasszal le kell takarni, és nem irritáló ragasztószalaggal kell a helyén rögzíteni. Olyan esetekben, amikor a közvetlen alkalmazás nem megoldható (pl. folyadékok vagy egyes masszák esetében), a vizsgálandó anyagot először a géztapaszra kell felvinni, és azután azt kell a bőrre tenni. Az expozíciós idő tartamára a tapaszt lazán kell a bőrre rögzíteni egy megfelelő félig záró kötés alkalmazásával. Amennyiben a vizsgálandó anyagot a tapaszra viszik fel, úgy kell a bőrre rögzíteni, hogy megfelelő legyen a kontaktus, és az anyag egyenletesen oszoljon el a bőrön. Gondoskodni kell arról, hogy az állat ne férjen hozzá a tapaszhoz és ne nyelje le vagy lélegezze be a vizsgálandó anyagot.

A folyékony vizsgálandó anyagokat általában hígítatlanul kell alkalmazni. Szilárd anyagok vizsgálatakor (amelyeket szükség esetén porrá lehet őrölni) a vizsgálandó anyagot a lehető legkisebb, de a bőrrel való megfelelő kontaktus biztosításához elegendő mennyiségű vízzel (vagy ha szükséges, más megfelelő vivőanyaggal) meg kell nedvesíteni. Ha víztől eltérő vivőanyagot alkalmaznak, a vivőanyag legfeljebb minimális mértékben befolyásolhatja a vizsgálandó anyag által gyakorolt irritáló hatást.

Ha megoldható, az általában 4 órás expozíciós idő végén az adott esetben megmaradt vizsgálandó anyagot vízzel vagy más megfelelő oldószerrel el kell távolítani, de vigyázni kell arra, hogy ezzel ne legyenek hatással a meglévő válaszreakciókra vagy a felhám épségére.

1.4.2.2. *A dózisok*

A vizsgálati helyre 0,5 ml folyadékot vagy 0,5 g szilárd anyagot vagy masszát kell felvinni.

1.4.2.3. *Kiindulási vizsgálat (*in vivo *bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálat egy állat felhasználásával)*

Nyomatékosan ajánlott, hogy az *in vivo* vizsgálatot először egy állaton végezzék el, különösen akkor, ha az anyag gyaníthatóan korróziós hatású. Ez összhangban áll a lépcsőzetes vizsgálati stratégiával (lásd az 1. függeléket).

Ha az adatok bizonyító erejének elemzése alapján az anyag korróziós hatásúnak minősül, nincsen szükség további állatkísérletekre. A legtöbb gyaníthatóan korróziós hatású anyag esetében általában szükségtelen további *in vivo* vizsgálatokat végezni. Ha azonban nincs elegendő bizonyíték, és emiatt indokoltnak látszik a további adatgyűjtés, az alábbi eljárás alkalmazásával korlátozott állatkísérletek végezhetők: az állatra egymást követően legfeljebb három tapaszt kell felhelyezni. Az első tapaszt három perc után el kell távolítani, és ha nem láthatók súlyos bőrreakciók, a második tapaszt is fel kell helyezni, majd egy óra elteltével ezt is el kell távolítani. Ha a megfigyelések ebben a szakaszban azt mutatják, hogy humánusan megengedhető az expozíció négy órára történő meghosszabbítása, egy harmadik tapaszt is fel lehet helyezni, majd négy óra múlva eltávolítani és kiértékelni a válaszreakciót.

Ha a három egymás utáni expozíció bármelyike után korróziós hatást tapasztalható, a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha az utolsó tapasz eltávolítása után sem figyelhető meg korróziós hatás, az állatot 14 napon át meg kell figyelni, kivéve, ha előbb jelentkezik korróziós hatás.

▼B

Azokban az esetekben, amikor a vizsgálandó anyag várhatóan nem okoz korróziós hatást, de irritáló lehet, négy órára kell felhelyezni egyetlen tapaszt egy állatra.

1.4.2.4. *Ellenőrző vizsgálat (*in vivo *bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálat további állatok alkalmazásával)*

Ha a kiindulási vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós hatás, legfeljebb további két állaton egy-egy tapasz és négyórás expozíciós idő alkalmazásával meg kell erősíteni az irritációt vagy a negatív válaszreakciókat. Ha a kiindulási vizsgálat során irritációs választ figyeltek meg, az ellenőrző vizsgálatok lépcsőzetesen is elvégezhetők, vagy úgy, hogy két további állatot egyszerre kezelnek. Abban a kivételes esetben, ha nem végeznek kiindulási vizsgálatot, két vagy három állatot lehet kezelni egy-egy tapasszal, amelyet négy óra után távolítanak el. Ha két állatot használnak, és mindkettő ugyanolyan válaszreakciót mutat, nincs szükség további vizsgálatokra. Egyéb esetben egy harmadik állatot is be kell vonni a vizsgálatba. A nem egyértelmű válaszokat esetleg további állatok alkalmazásával kell értékelni.

1.4.2.5. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A vizsgálatot azonban azonnal meg kell szakítani, ha az állat tartósan súlyos fájdalom vagy szorongás jeleit mutatja. A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat a tapaszok eltávolítása után legfeljebb 14 napig meg kell figyelni. Ha a visszafordíthatóság a 14 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor kell befejezni.

1.4.2.6. *Klinikai megfigyelések és a bőrreakciók értékelése*

Minden állatnál meg kell vizsgálni a bőrpír (eritéma) vagy vizenyő (ödéma) jeleit, továbbá a tapasz eltávolítása után 60 perccel, majd 24, 48 és 72 órával értékelni kell a válaszreakciókat. Az egy állattal végzett kiindulási vizsgálatban a vizsgálati területet a tapasz eltávolítása után azonnal is meg kell vizsgálni. A bőrreakciókat a csatolt táblázatban megadottak szerint kell értékelni és jegyzőkönyvezni. Ha 72 óránál sem irritációként, sem korrózióként nem értékelhető bőrkárosodás látható, a hatások visszafordíthatóságának meghatározásához szükség lehet arra, hogy a megfigyeléseket a 14. napig folytassák. Az irritáció megfigyelésén kívül minden lokális toxikus hatást, mint például a bőr zsírtartalmának csökkentését, és bármely káros szisztémás hatást (pl. a mérgezés klinikai tüneteire és a testtömegre gyakorolt hatást) részletesen le kell írni, és fel kell jegyezni. A nem egyértelmű eredmények tisztázása érdekében fontolóra kell venni kórszövettani vizsgálatok elvégzését is.

A bőrreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A bőrreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelő rendszer (lásd a csatolt táblázatot) használatára. Hasznos lehet egy, a bőrirritációk és más léziók értékelését ismertető, illusztrált útmutató is (9).

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK BEMUTATÁSA

A végleges vizsgálati jelentésben a vizsgálatok eredményeit táblázatos formában kell összefoglalni, amelynek a 3.1 szakaszban felsorolt tételek mindegyikét tartalmaznia kell.

▼B

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A bőrirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságával vagy visszafordíthatatlanságával összefüggésben kell értékelni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát egy anyag irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálandó anyag egyéb hatásait is értékelni kell. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeket a vizsgálat során tett összes egyéb megfigyeléssel együttesen kell értékelni.

Az irritációs válaszok értékelésekor figyelembe kell venni a bőrléziók visszafordíthatóságát. Ha az olyan válaszok, mint a szőrhiány (korlátozott területen), kóros elszarusodás (hiperkeratózis), a szövetszaporodás (hiperplázia) vagy a hámlás a 14 napos megfigyelési időszak végére sem múlnak el, a vizsgálandó anyagot irritálónak kell tekinteni.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Az *in vivo* vizsgálatok indoklása: a korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok, ezen belül a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatok bizonyító erejének elemzése:

— a korábbi vizsgálatból rendelkezésre álló adatok ismertetése,

— a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok,

— az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgálandó anyaggal és a referenciaanyagokkal a kapott eredmények részleteinek ismertetése,

— az adatok bizonyító erejének elemzése az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálandó anyag:

— azonosító adatok (pl. CAS-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. pH, illékonyság, oldhatóság, stabilitás),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya.

Vivőanyag:

— megjelölés, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat,

— a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs, adott esetben az albínó nyúltól eltérő faj alkalmazásának indoklása,

— az állatok száma ivaronként,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és után,

— életkor a vizsgálat kezdetén,

— az állatok származása, tartásuk körülményei, takarmánya stb.

▼B

Kísérleti körülmények:

— a tapasz helyének előkészítésére alkalmazott technika,

— a tapasz anyagának és a felhelyezési technika részletes ismertetése,

— a vizsgálandó anyagból előállított készítménynek, az alkalmazás és az eltávolítás a részletes ismertetése.

Eredmények:

— az irritációs/korróziós válaszok pontszámainak táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra és minden egyes mérési időpontra vonatkozóan,

— az összes megfigyelt lézió ismertetése,

— a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének, illetve az esetleges kórszövettani eredmények leíró jellegű ismertetése,

— a bőrirritáción és korróziós hatáson kívüli egyéb káros hatások (pl. a bőr zsírtartalmának csökkenése) és szisztémás hatások ismertetése.

Az eredmények diszkussziója.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., 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) 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, M. (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, Brussels.

(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, pp. 483-524.

(5a) B40. vizsgálati módszer, Bőrkorrózió.

(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. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(7) OECD (1998) Harmonized 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, November 1998 (http://www1.oecd.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 Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www1.oecd.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.

(Kérésre az OECD Titkárságon rendelkezésre áll.)

▼B

I. táblázat

A BŐRREAKCIÓK ÉRTÉKELÉSE

Bőrpír (eritéma) és pörkképződés

Nincs bőrpír	0
Nagyon enyhe bőrpír (alig észlelhető)	1
Jól kifejezett bőrpír	2
Közepes-súlyos mértékű bőrpír	3
Pörkképződésig fokozódó súlyos bőrpír (céklavörös szín), amely lehetetlenné teszi a bőrpír osztályozását	4

Lehetséges maximum: 4

Vizenyőképződés

Nincs vizenyő	0
Nagyon enyhe vizenyő (alig észlelhető)	1
Enyhe vizenyő (a terület szélei az egyértelmű kiemelkedések miatt jól kifejezettek)	2
Közepes súlyosságú vizenyő (körülbelül 1 mm-re emelkedik ki)	3
Súlyos vizenyő (több mint 1 mm-re emelkedik ki és nagyobb, mint az expozíciós terület)	4

Lehetséges maximum: 4 A

Nem egyértelmű válaszokat kórszövettani vizsgálattal lehet tisztázni.

▼B

FÜGGELÉK

Lépcsőzetes vizsgálati stratégia bőrirritációs és bőrkorróziós vizsgálatokhoz

ÁLTALÁNOS MEGFONTOLÁSOK

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében fontos, hogy elkerülhető legyen az állatokkal való szükségtelen kísérletezés, illetve minimálisra lehessen csökkenteni azokat a vizsgálatokat, amelyek valószínűleg súlyos válaszreakciókat váltanak ki a kísérleti állatokban. Az *in vivo* vizsgálatok fontolóra vétele előtt minden, az anyag potenciális bőrkorróziós/bőrirritáló hatásával összefüggő információt ki kell értékelni. Lehet, hogy elegendő bizonyíték van a vizsgálandó anyag bőrkorróziós és bőrirritációs potenciál alapján történő besorolására anélkül, hogy laboratóriumi állatokon kísérleteket kellene végezni. Az adatok bizonyító erejének elemzésével és a lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával tehát minimálisra csökkenthető az *in vivo* vizsgálatok iránti igény, különösen, ha az anyag valószínűleg súlyos reakciókat okoz.

Az anyagok bőrirritáló és bőrkorróziós hatásával kapcsolatban rendelkezésre álló információk értékelésére célszerű elvégezni az adatok bizonyító erejének elemzését annak érdekében, hogy meg lehessen határozni, hogy az *in vivo* bőrvizsgálatokon kívül szükség van-e egyéb vizsgálatokra az irritáló/korróziós potenciál jellemzéséhez. Ha további vizsgálatokra van szükség, a kísérleti adatok összegyűjtéséhez, a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát javasolt alkalmazni. Az olyan anyagok esetében, amelyeket korábban nem vizsgáltak, az anyag bőrkorróziós/-bőrirritáló potenciáljának értékeléséhez szükséges adatsor előállításához a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát kell alkalmazni. Az ebben a függelékben ismertetett vizsgálati stratégiát egy OECD-munkaértekezleten (1) dolgozták ki, majd később jóváhagyták, és a Harmonizált integrált veszélyosztályozási rendszer a vegyi anyagok humán egészségügyi és környezeti hatásainak osztályozására keretében kibővítették, és 1998 novemberében a Vegyi Anyag Bizottság és a Vegyi Anyag Munkacsoport 28. együttes ülésén jóváhagyták (2).

Bár ez a lépcsőzetes vizsgálati stratégia nem képezi szerves részét a B4. vizsgálati módszernek, kifejezésre juttatja a bőrirritáció/bőrkorrózió jellemzőinek meghatározására ajánlott megközelítést. Ez a megközelítés testesíti meg a legjobb gyakorlatot, és etikai szempontból is irányadó az *in vivo* bőrirritációs/-bőrkorróziós vizsgálatokhoz. A vizsgálati módszer útmutatást ad az *in vivo* vizsgálatok elvégzéséhez, és összefoglalja azokat a tényezőket, amelyeket az ilyen vizsgálatok megkezdése előtt fontolóra kell venni. A stratégia megközelítést biztosít a vizsgálandó anyag bőrirritáló/bőrkorróziós tulajdonságaival kapcsolatos meglévő adatok értékeléséhez, és lépcsőzetes megközelítést jelent az olyan anyagokra vonatkozó adatok összegyűjtéséhez, amelyekhez további vizsgálatokra van szükség, vagy amelyeket korábban egyáltalán nem vizsgáltak. Javaslatot tesz továbbá validált és elfogadott *in vitro* vagy ex vivo bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatok meghatározott körülmények esetén történő elvégzésére.

AZ ÉRTÉKELÉSI ÉS VIZSGÁLATI STRATÉGIA ISMERTETÉSE

A vizsgálatoknak a lépcsőzetes vizsgálati stratégia (ábra) keretében történő elvégzése előtt minden rendelkezésre álló információt ki kell értékelni annak meghatározása érdekében, hogy szükség van-e *in vivo* bőrvizsgálatokra. Bár egy-egy paraméter (pl. szélsőséges pH-érték) vizsgálatából is jelentős mennyiségű információ nyerhető, az összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell venni. A kérdéses anyag vagy analógjai hatásaival kapcsolatos összes adatot értékelni kell azok bizonyító erejéről való döntés meghozatalakor, és meg is kell indokolni ezt a döntést. Elsődleges hangsúlyt kell fektetni az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatokra, ezt követően az *in vitro* vagy ex vivo vizsgálatok eredményére. Lehetőség szerint kerülni kell a korróziós hatású anyagok *in vivo* vizsgálatát. A vizsgálati stratégia során figyelembe veendő tényezők a következők:

▼B

A rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatok értékelése (1. lépés). Első lépésben a rendelkezésre álló humán adatokat, pl. klinikai vagy munka-egészségügyi vizsgálatokat, valamint esettanulmányokat és/vagy állatkísérletes adatokat, pl. egyszeri vagy ismételt bőrexpozíciós toxicitási vizsgálatokat kell kiértékelni, mivel ezek a bőrre gyakorolt hatásokra közvetlenül vonatkozó információkat szolgáltatnak. Az ismerten irritáló vagy korróziós hatású anyagokat, illetve azokat, amelyek esetében egyértelműen bizonyítható az ilyen hatások hiánya, nem szükséges *in vivo* vizsgálni

A szerkezetaktivitási összefüggések (SAR) elemzése (2. lépés). Ha vannak, fontolóra kell venni szerkezetileg rokon anyagok vizsgálatát. Ha a szerkezetileg rokon anyagokkal vagy elegyeikkel kapcsolatban elegendő olyan humán és/vagy állatkísérletes adat áll rendelkezésre, amely valószínűsíti a bőrkorróziós/bőrirritációs potenciált, feltételezhető, hogy az értékelés alatt álló vizsgálandó anyag ugyanilyen válaszreakciókat vált ki. Ilyen esetekben előfordulhat, hogy a vizsgálandó anyagot nem kell megvizsgálni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia értelmében a szerkezetileg rokon anyagok vagy elegyeik vizsgálatából származó negatív adatok nem jelentenek elegendő bizonyítékot arra nézve, hogy az anyag nem korróziós hatású vagy nem irritáló. A bőrkorróziós és bőrirritáló potenciál meghatározására validált és elfogadott SAR-megközelítéseket kell alkalmazni.

Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reaktivitás (3. lépés). A szélsőséges, például pH < 2,0 és > 11,5 kémhatású anyagok erőteljes lokális hatást gyakorolhatnak. Ha a szélsőséges pH-érték az alapja annak, hogy egy anyagot korróziós hatásúnak minősítsünk, akkor az anyag sav/alkáli tartalékát (vagy pufferkapacitását) is figyelembe lehet venni (3)(4). Ha a pufferkapacitás alapján valószínűsíthető, hogy az anyag nem bőrkorróziós hatású, akkor ennek megerősítésére további vizsgálatokat kell végezni, lehetőleg validált és elfogadott *in vitro* vagy ex vivo módszerek alkalmazásával (lásd az 5. és 6. lépést).

Dermális toxicitás (4. lépés). Ha egy vegyültről kiderül, hogy dermális alkalmazás esetén nagyon toxikus, előfordulhat, hogy az anyag *in vivo* bőrirritációs/-bőrkorróziós vizsgálata nem oldható meg, mivel a vizsgálandó anyag szokásosan alkalmazott mennyisége meghaladhatja a nagyon mérgező dózist, és ennek következtében az állatok elhullását vagy súlyos szenvedését okozhatja. Emellett, ha a 2 000 mg/testtömeg-kg-os határdózisig vagy annál magasabb dózisok alkalmazásával korábban már végeztek albínó nyulakban *in vivo* dermális toxicitási vizsgálatokat, és nem tapasztaltak bőrirritációt vagy bőrkorróziót, előfordulhat, hogy nem lesz szükség további bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatokra. A korábbi vizsgálatok akut dermális toxicitási eredményeinek értékelésekor egy sor megfontolást kell figyelembe venni. Előfordulhat például, hogy a bőrléziókkal kapcsolatos adatok hiányosak. Esetleg nem nyúlon végezték a vizsgálatokat és a megfigyeléseket, és a különböző állatfajokban nagyon eltérő lehet a válaszreakciók érzékenysége. Illetve lehetséges, hogy az állatokon alkalmazott vizsgálandó anyag formája nem volt alkalmas a bőrirritáció/bőrkorrózió vizsgálatára (pl. a dermális toxicitási vizsgálatokban alkalmazott hígítás miatt (5)). Azokban az esetekben azonban, ahol jól megtervezett és lefolytatott dermális toxicitási vizsgálatokat végeztek nyulakon, a negatív eredményeket elegendő bizonyítéknak tekinthetjük arra, hogy az anyag nem korróziós hatású és nem irritáló.

In vitro vagy ex vivo vizsgálatok eredményei (5. és 6. lépés). Nem kell állatokon kísérletezni olyan anyagokkal, amelyek e konkrét hatások meghatározására tervezett, validált és elfogadott módszerekkel végzett *in vitro* vagy ex vivo vizsgálatokban (6)(7) korróziós vagy súlyos irritáló hatásokat mutattak. Ilyen esetben fel lehet tételezni, hogy az anyag *in vivo* is hasonlóan súlyos hatásokat vált ki.

▼B

In vivo vizsgálat nyulakban (7. és 8. lépés). Ha az adatok bizonyító erejének elemzése alapján hozott döntés szerint *in vivo* vizsgálatokat kell végezni, első lépésben egyetlen állattal kiindulási vizsgálatot kell végezni. Ha e vizsgálat eredménye szerint az anyag bőrkorróziós hatású, nem szabad további vizsgálatokat végezni. Ha a kiindulási vizsgálatban nem tapasztalható korróziós hatás, az irritációs vagy negatív választ legfeljebb két további állat négyórás expozíciójával ellenőrizni kell. Ha a kiindulási vizsgálatban irritáció tapasztalható, az ellenőrző vizsgálat végezhető lépcsőzetesen is, vagy úgy is, hogy a két további állatot egyszerre kezelnek.

HIVATKOZÁSOK

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 1996(http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Healthand Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/-Class/HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdail D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for SkinCorrosion. 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) pp 19-26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and *In vitro* Test Methodsfor Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.

(6) B40. vizsgálati módszer

(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, pp. 483-524.

▼B

Ábra

VIZSGÁLATI ÉS KIÉRTÉKELÉSI STRATÉGIA A BŐRIRRITÁCIÓ, ILLETVE A BŐRKORRÓZIÓ VIZSGÁLATÁHOZ

	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 TOXICITÁS: SZEMIRRITÁCIÓ/SZEMKORRÓZIÓS HATÁS**

1. **MÓDSZER**

Ez a módszer egyenértékű az OECD TG 405 (2002) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Ennek a továbbfejlesztett módszernek a kidolgozása során külön figyelmet szenteltek a vizsgálandó anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló összes információ kiértékelése révén lehetségessé váló javító beavatkozásoknak, hogy ezáltal elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés, és így tiszteletben lehessen tartani az állatjóléti szempontokat is. A módszer ajánlást fogalmaz meg arra nézve, hogy az anyag akut szemkorróziós vagy szemirritáló hatásának vizsgálatára előírt *in vivo* kísérlet elvégzése előtt el kell végezni a rendelkezésre álló adatok bizonyító erejének elemzését (1). Ha nem áll rendelkezésre elegendő adat, akkor ajánlott lépcsőzetes vizsgálatok alkalmazásával bővíteni ezeket (2)(3). A vizsgálati stratégia részét képezi validált és elfogadott *in vitro* vizsgálatok végzése, amelyek a vizsgálati módszer függelékeként kerülnek ismertetésre. Ajánlott továbbá, hogy az *in vivo* szemvizsgálatok tervbevétele előtt a szemkorróziós hatás előrejelzésére végezzenek *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatot.

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg az anyag potenciális szemkorróziós/irritáló hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adatra vonatkozóan el nem végezték az adatok bizonyító erejének elemzését. Ilyen adatok az embereken és/vagy laboratóriumi állatokon elvégzett vizsgálatok eredményei, a szerkezetileg rokon anyagok vagy elegyeik korróziós/irritáló hatásaival kapcsolatos tények, az anyag erős savasságát vagy lúgosságát igazoló adatok (4)(5), valamint a validált és elfogadott *in vitro* vagy ex vivo bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatokból kapott eredmények (6)(6a). Előfordulhat, hogy a vizsgálatokat már az adatok bizonyító erejének elemzése előtt elvégezték vagy éppen annak eredményeként végzik el.

Bizonyos anyagok esetében az ilyen elemzés annak a szükségét jelezheti, hogy el kell végezni az anyag szemkorróziós/szemirritációs potenciáljának *in vivo* vizsgálatát. Minden ilyen esetben, az *in vivo* szemvizsgálat alkalmazásának tervbevétele előtt először lehetőleg el kell végezni, és ki kell értékelni egy *in vivo* vizsgálatot az anyag bőrre gyakorolt hatásainak meghatározására a B4. vizsgálati módszer (7) alkalmazásával. Az adatok bizonyító erejének elemzése és a lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazása csökkenti az *in vivo* szemkorróziós/szemirritációs vizsgálatok szükségességét azoknak az anyagoknak az esetében, amelyekhez más vizsgálatokból elegendő bizonyíték áll rendelkezésre. Ha a lépcsőzetes stratégia alkalmazásával nem határozható meg a szemkorróziós/irritációs potenciál, még az *in vivo* bőrkorróziós és irritációs vizsgálat elvégzése után sem, elvégezhető egy *in vivo* szemkorróziós/szemirritációs vizsgálat.

▼B

A preferált lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely magában foglalja validált *in vitro* vagy ex vivo korróziós/irritációs vizsgálatok elvégzését is, az e vizsgálati módszerhez csatolt függelékben kerül ismertetésre. A stratégiát egy OECD-munkaértekezlet (8) résztvevői dolgozták ki, javasolták egyhangúlag, majd fogadták el mint a Globálisan harmonizált rendszer (GHS) a vegyi anyagok osztályozására (9) ajánlott vizsgálati stratégiáját. Az *in vivo* vizsgálatok elvégzése előtt ezt a vizsgálati stratégiát javasolt követni. Új anyagok esetében ez az ajánlott lépcsőzetes vizsgálati megközelítés az anyag korróziós/irritáló hatásaira vonatkozó, tudományos szempontból megfelelő adatok gyűjtésére. Ismert anyagok esetében, ha nem áll rendelkezésre elegendő adat a szemkorróziós/szemirritáló és bőrkorróziós/bőrirritáló hatásokról, ennek a stratégiának az alkalmazásával kell pótolni a hiányzó adatokat. Megfelelően meg kell indokolni, ha ettől eltérő vizsgálati stratégiát vagy eljárást alkalmaznak, vagy ha úgy döntenek, hogy nem használják a lépcsőzetes vizsgálati megközelítést.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Szemirritáció: a vizsgálandó anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások.

Szemkorróziós hatás: a vizsgálandó anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül nem teljes mértékben visszafordítható szövetkárosodások a szemben, vagy súlyos fizikai látóképességromlás.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat egyik szemén; a másik, nem kezelt szem szolgál kontrollként. A szemirritáció/szemkorrózió mértékét meghatározott időközönként a kötőhártya, szaruhártya és szivárványhártya lézióinak pontozásával kell kiértékelni. A hatások teljes kiértékelése érdekében részletesen ismertetni kell a szemre gyakorolt egyéb hatásokat és a káros szisztémás hatásokat is. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.

A vizsgálat bármely fázisában tartósan súlyos szorongás és/vagy fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell, és az anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok humánus módon történő exterminálásáról szóló döntéssel kapcsolatos kritériumok a (10) hivatkozásban találhatók.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az *in vivo* vizsgálat előkészítése**

1.4.1.1. *Az állatfaj kiválasztása*

A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Más fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

1.4.1.2. *Az állatok előkészítése*

A vizsgálat előtt legfeljebb 24 órával a vizsgálatra előzetesen kiválasztott kísérleti állat mindkét szemét meg kell vizsgálni. Nem szabad olyan állatot használni, amely szemirritációt, szemhibákat vagy korábban szerzett szaruhártya-sérülést mutat.

▼B

1.4.1.3. *Az állatok tartásának és etetésének körülményei*

Az állatokat egyedileg kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 20 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

1.4.2. **Vizsgálati eljárás**

1.4.2.1. *A vizsgálandó anyag alkalmazása*

A vizsgálandó anyagot az alsó szemhéj óvatos elhúzása után az állat egyik szemének kötőhártyazsákjába kell bejuttatni. Ezt követően körülbelül egy másodpercig óvatosan össze kell fogni a szemhéjakat, hogy az anyag ki ne essen vagy folyjon. A másik, nem kezelt szem kontrollként szolgál.

1.4.2.2. *Öblögetés*

A kísérleti állatok szemét a vizsgálandó anyag becseppentése után legalább 24 órán át nem szabad kimosni, kivéve szilárd anyagok alkalmazása esetén (lásd 1.4.2.3.2. szakasz), illetve ha azonnali korróziós hatás vagy irritáció tapasztalható. Ha szükségnek tűnik, 24 óra múlva ki lehet mosni az állatok szemét.

Nem javasolt kontrollcsoport alkalmazása a mosás hatásának vizsgálatára, kivéve, ha az tudományosan indokolt. Ha kontrollcsoport szükséges, akkor ehhez két nyulat kell használni. A mosás körülményeit, pl. a mosás időpontját, a mosóoldat összetételét és hőmérsékletét, a mosás időtartamát és sebességét, valamint az alkalmazott térfogatot részletesen dokumentálni kell.

1.4.2.3. *A dózisok*

1.4.2.3.1. *Folyadékok vizsgálata*

Folyadékok vizsgálata esetén 0,1 ml-es dózist kell alkalmazni. Pumpás spray-ket nem szabad az anyag közvetlenül a szembe való permetezésére használni. A sprayt ki kell fújni, és tartalmát egy edényben össze kell gyűjteni, mielőtt 0,1 ml-t az állat szemébe cseppentenének.

1.4.2.3.2. *Szilárd anyagok vizsgálata*

Szilárd anyagok, masszák és szemcsés anyagok vizsgálata esetén az alkalmazott mennyiségnek 0,1 ml térfogatúnak kell lennie, illetve tömege nem haladhatja meg a 100 mg-ot. A vizsgálandó anyagot finom porrá kell őrölni és térfogatmérés előtt óvatosan össze kell tömöríteni, pl. úgy, hogy a mérőedényt megkocogtatják. Amennyiben az első megfigyelési időpontban vagy a kezelés után 1 órával azt tapasztalják, hogy a szilárd vizsgálandó anyagot a fiziológiai mechanizmusok nem távolították el a kísérleti állat szeméből, a szemet sóoldattal vagy desztillált vízzel ki lehet öblögetni.

▼B

1.4.2.3.3. *Aeroszolok vizsgálata*

Ajánlatos minden pumpás spray tartalmát és aeroszolt összegyűjteni, mielőtt a szembe cseppentenék. Az egyetlen kivételt ez alól a túlnyomásos aeroszolos flakonokban lévő anyagok képezik, amelyeket a párolgás miatt nem lehet összegyűjteni. Ilyen esetekben az állat szemét nyitva kell tartani, és a vizsgálandó anyagot úgy kell a szembe juttatni, hogy a flakont 10 cm távolságban közvetlenül a szem előtt tartva és körülbelül egy másodpercig működtetve egyszer belefújnak az állat szemébe. A spray nyomásától és tartamától függően a távolság ettől eltérő is lehet. Vigyázni kell arra, hogy a spray nyomása ne okozzon szemkárosodást. Megfelelő esetekben szükség lehet arra is, hogy a spray okozta „mechanikai" szemkárosodás lehetőségét is vegyék figyelembe.

Az aeroszol dózisát úgy lehet megbecsülni, hogy a vizsgálatot az alábbiak szerint szimulálják. Az anyagot mérőpapírra permetezik egy olyan, közvetlenül a papír elé helyezett nyíláson keresztül, amelynek mérete megegyezik a nyúl szemének méretével. A papír tömegének növekedését használják fel a szembe permetezett mennyiség közelítő becslésére. Illékony anyagok esetében a dózist úgy lehet megbecsülni, hogy vizsgálandó anyag eltávolítása előtt és után is megmérik a befogadó edény tömegét.

1.4.2.4. *Kiindulási vizsgálat (in vivo szemirritációs/szemkorróziós vizsgálat egy állat alkalmazásával)*

Ahogyan az a lépcsőzetes vizsgálati stratégiában (lásd 1. függelék) is kifejtésre kerül, nyomatékosan ajánlott, hogy az *in vivo* vizsgálatot először egy állaton végezzék el, különösen akkor, ha az anyag gyaníthatóan korróziós hatású.

Ha e vizsgálat eredményei szerint az ismertetett eljárás alkalmazásával az anyag korróziós hatású vagy súlyosan irritálja a szemet, nem szabad további szemirritációs vizsgálatokat végezni.

1.4.2.5. *Helyi érzéstelenítőszerek*

Esetenként helyi érzéstelenítőszerek is alkalmazhatók. Ha az adatok bizonyító erejének elemzése szerint az anyag fájdalmat okozhat, vagy ha a kiindulási vizsgálat alapján fájdalmas reakció várható, a vizsgálandó anyag becseppentése előtt helyi érzéstelenítőszer alkalmazható. A helyi érzéstelenítőszer típusát, koncentrációját és dózisát körültekintően kell megválasztani, hogy alkalmazása miatt nehogy megváltozzon a vizsgálandó anyag által kiváltott reakció. A kontrollszemet ugyanígy érzésteleníteni kell.

1.4.2.6. *Ellenőrző vizsgálat (in vivo szemirritációs vizsgálat további állatok alkalmazásával)*

Ha a kiindulási vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós hatás, legfeljebb további két állat alkalmazásával ellenőrizni kell az irritációs vagy negatív válaszreakciókat. Ha a kiindulási vizsgálat során súlyos irritációs választ figyeltek meg, amely valószínűsíti, hogy az ellenőrző vizsgálatban erőteljes (visszafordíthatatlan) hatás jelentkezhet, ajánlatos az ellenőrző vizsgálatot lépcsőzetesen, egyszerre egy állat alkalmazásával végezni ahelyett, hogy a két további állatot egyszerre kezelnének. Ha a második állat korróziós vagy súlyos, irritáló hatásokat jelez, nem szabad folytatni a vizsgálatokat. A gyenge vagy közepes mértékű irritáció megerősítéséhez további állatok vizsgálatára lehet szükség.

▼B

1.4.2.7. *Megfigyelési időszak*

A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások mértékének és visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A vizsgálatot azonban azonnal meg kell szakítani, ha az állat tartósan súlyos fájdalom vagy szorongás jeleit mutatja (9). A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat általában a vizsgálandó anyag alkalmazása után 21 napig kell megfigyelni. Ha a visszafordíthatóság a 21 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor be kell fejezni.

1.4.2.7.1. *Klinikai megfigyelések és a bőrreakciók értékelése*

A szemeket a vizsgálandó anyag alkalmazása után 1, 24, 48 és 72 órával kell megvizsgálni. Ha már megvan a döntő információ, az állatokat nem szabad a szükségesnél hosszabb ideig a kísérletben tartani. A tartósan súlyos fájdalmat vagy szorongást mutató állatokat haladéktalanul és humánus módon exterminálni kell, és az anyagot ennek megfelelő kell értékelni. A vizsgálandó anyag becseppentése után az alábbi szemléziókat mutató állatokat humánus módon exterminálni kell: szaruhártya-perforálódás vagy jelentős mértékű szaruhártya-fekélyesdés, ezen belül staphyloma (a szaruhártya rendellenes kidomborodása); vér jelenléte a szem elülső szemzugában; 48 órán át tartó negyedfokú szaruhártya-homály; a fényreflex 72 órán át tartó hiánya (másodfokú szivárványhártya-válaszreakció); a kötőhártya fekélyesedése; a kötőhártyában vagy a pislogóhártyában jelentkező szövetelhalás; vagy pörkképződés. Erre azért van szükség, mert az ilyen léziók általában nem visszafordíthatók.

A szemléziókat nem mutató állatokat legkorábban a becseppentés után 3 nappal lehet exterminálni. Az enyhe vagy közepes léziókat mutató állatokat legalább addig megfigyelés alatt kell tartani, amíg a léziók meg nem szűnnek, vagy legfeljebb 21 napig, amikor a vizsgálatot be kell fejezni. A 7., 14. és 21. napon kell megfigyeléseket végezni a léziók állapotának és visszafordíthatóságának vagy visszafordíthatatlanságának meghatározására.

Minden egyes vizsgálatkor minősíteni kell, és fel kell jegyezni a szemreakciókat (kötőhártya-, szaruhártya- és szivárványhártya-reakciók) (I. táblázat). A szem bármely egyéb lézióját (pl. pannus, elszíneződés) vagy a káros szisztémás hatásokat is fel kell jegyezni.

A reakciók vizsgálatát megkönnyítheti egy binokuláris kézi nagyító, egy kézi vonalfénylámpa, egy biomikroszkóp vagy bármely más megfelelő eszköz alkalmazása. A 24 óra után tett megfigyelések rögzítése után a szemeket fluoreszcein segítségével is megvizsgálhatjuk.

A szemreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A szemreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelő rendszer használatára.

2. **ADATOK**

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A szemirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságukkal vagy visszafordíthatatlanságukkal összefüggésben kell meghatározni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát egy anyag irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálandó anyag egyéb hatásait is értékelni kell. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeknek csak akkor van jelentőségük, ha az összes megfigyelés ismertetése és értékelése alátámasztja ezeket.

▼B

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Az *in vivo* vizsgálatok indoklása: a korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok, ezen belül a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatok bizonyító erejének elemzése:

— a korábbi vizsgálatból rendelkezésre álló vonatkozó adatok ismertetése,

— a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok,

— az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgálandó anyaggal és a referenciaanyagokkal a kapott eredmények részleteinek ismertetése,

— az elvégzett *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatok és a kapott eredmények ismertetése,

— az adatok bizonyító erejének elemzése az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálandó anyag:

— azonosító adatok (pl. CAS-szám, eredet, tisztaság, ismert szennyezők, tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. pH, illékonyság, oldhatóság, stabilitás, vízzel való reakcióképesség),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

— helyi érzéstelenítő alkalmazása esetén a szer neve, tisztasága, típusa, dózisa, valamint a vizsgálandó anyaggal való esetleges kölcsönhatása.

Vivőanyag:

— név, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat,

— a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs, adott esetben az albínó nyúltól eltérő faj alkalmazásának indoklása,

— az egyes állatok életkora a vizsgálat kezdetén,

— az állatok száma ivaronként a vizsgálati és kontrollcsoportokban (ha szükséges),

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és után,

— származás, tartási körülmények, takarmány stb.

Eredmények:

— az irritáció pontozására az egyes megfigyelési időpontokban alkalmazott módszer (pl. kézi vonalfénylámpa, biomikroszkóp, fluoreszcein) ismertetése,

▼B

— az irritációs/korróziós válaszreakció-adatok táblázatos megjelenítése minden állatra vonatkozóan minden megfigyelési időpontban egészen az állatoknak a vizsgálatból való kivételéig,

— a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének leíró jellegű ismertetése,

— a szemben megfigyelt bármely egyéb lézió (pl. vaszkularizáció, pannusképződés, összetapadások, elszíneződés) ismertetése,

— a szemen kívül jelentkező káros lokális és szisztémás hatások, illetve adott esetben a kórszövettani eredmények ismertetése.

Az eredmények diszkussziója.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A laboratóriumi állatokon végzett szemirritációs vizsgálatok eredményeinek emberre extrapolálása csak korlátozott érvényességű. Az albínó nyúl sok esetben érzékenyebb a szemirritáló vagy -korróziós anyagokra, mint az ember.

Vigyázni kell, hogy az adatok értelmezése során kizárható legyen a másodlagos fertőzés eredményeként jelentkező irritáció lehetősége.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., 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, pp. 483-524.

(6a) B40. vizsgálati módszer, Bőrkorróziós hatás.

(7) B4. vizsgálati módszer, Akut toxicitás: bőrirritáció/korrózió.

(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. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 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, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (http://www.oecd.org/ehs/Class/-HCL6.htm).

(10) 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

I. táblázat

A SZEMLÉZIÓK OSZTÁLYOZÁSA

Szaruhártya

Homályosság: a homályosság mértéke (az érték megállapításához a legsűrűbb területet kell venni) (*)

Nem észlelhető fekélyesedés vagy homályosság	0
Szórványos vagy diffúz homályos területek (a megszokott csillogás enyhe tompulásán kívül), a szivárványhártya részletei tisztán láthatók	1
Könnyen kivehető áttetsző terület; a szivárványhártya részletei kissé elhomályosodottak	2
Gyöngyházfényű terület; a szivárványhártya semmilyen részlete nem látható; a pupilla mérete alig észlelhető	3
Nem átlátszó szaruhártya; a szivárványhártya egyáltalán nem látható	4

Lehetséges maximum: 4

MEGJEGYZÉSEK

(*) A szaruhártya homályos területének nagyságát kell feljegyezni

Szivárványhártya

Normális	0
Észrevehetően mélyebb redők, vérbőség, duzzanat, mérsékelt vérbőség a szaruhártya körül; vagy belövelltség; a szivárványhártya fényre reagál (a lassú reakció is pozitív)	1
Vérzés, nagymérvű roncsolódás, vagy nem reagál a fényre	2

Lehetséges maximum: 2

Kötőhártya

Vörösödés (a szemhéjak és a szemgolyó kötőhártyájára vonatkozik; kivéve a szaruhártyát és a szivárványhártyát)

Normális	0
Egyes vérerek vérteltek (belövelltek)	1
Diffúz, bíborvörös szín; az egyes vérerek nehezen kivehetők	2
Diffúz erőteljes vörös	3

Lehetséges maximum: 3

Kötőhártya-vizenyő (chemosis)

Duzzanat (a szemhéjak és/vagy a pislogóhártyák esetében)

Normális	0
A normálisnál kissé duzzadtabb	1
Nyilvánvaló duzzanat, a szemhéjak részleges kifordulásával	2
Duzzanat, nagyjából félig zárt szemhéjakkal	3
Duzzanat, és a szemhéjak több mint félig zárva vannak	4

Lehetséges maximum: 4

▼B

FÜGGELÉK

Lépcsőzetes vizsgálati stratégia szemirritáció és szemkorróziós hatás vizsgálatához

ÁLTALÁNOS MEGFONTOLÁSOK

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében fontos, hogy elkerülhető legyen az állatokkal való szükségtelen kísérletezés, illetve minimálisra lehessen csökkenteni azoknak a vizsgálatoknak a számát, amelyek valószínűleg súlyos válaszreakciókat váltanak ki a kísérleti állatokban. Az *in vivo* vizsgálatok fontolóra vétele előtt minden, az anyag potenciális szemirritáló-korróziós hatásával összefüggő információt ki kell értékelni. Lehet, hogy elegendő bizonyíték van a vizsgálandó anyag szemirritációs vagy -korróziós potenciál szempontjából történő besorolására anélkül, hogy laboratóriumi állatokon kísérleteket kellene végezni. Az adatok bizonyító erejének elemzésével és a lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával tehát minimálisra csökkenthető az *in vivo* vizsgálatok szükségszerűsége, különösen, ha az anyag valószínűleg súlyos reakciókat okoz.

Az anyagok szemirritáló és -korróziós hatásával kapcsolatban rendelkezésre álló információk értékelésre javasolt elvégezni az adatok bizonyító erejének elemzését annak érdekében, hogy meg lehessen határozni hogy az *in vivo* szemvizsgálatokon kívül szükség van-e egyéb vizsgálatokra az irritáló/korróziós potenciál jellemzéséhez. Ha további vizsgálatokra van szükség, a vonatkozó kísérleti adatok összegyűjtésiéhez a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát javasolt alkalmazni. Az olyan anyagok esetében, amelyeket korábban nem vizsgáltak, az anyag szemkorróziós/szemirritációs potenciáljának értékeléséhez szükséges adatsor előállításához a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát kell alkalmazni. Az ebben a függelékben ismertetett vizsgálati stratégiát egy OECD-munkaértekezleten (1) dolgozták ki, majd később jóváhagyták, és a Harmonizált integrált veszélyosztályozási rendszer a vegyi anyagok humán egészségügyi és környezeti hatásainak osztályozására keretében kibővítették és 1998 novemberében a Vegyi Anyag Bizottság és a Vegyi Anyag Munkacsoport 28. együttes ülésén jóváhagyták (2).

Bár ez a vizsgálati stratégia nem képezi szerves részét a B5. vizsgálati módszernek, kifejezésre juttatja a szemirritációs/szemkorróziós sajátosságok meghatározására ajánlott megközelítést. Ez a megközelítés testesíti meg a legjobb gyakorlatot, és etikai szempontból is irányadó az *in vivo* szemirritációs/szemkorróziós vizsgálatokhoz. A vizsgálati módszer útmutatást ad az *in vivo* vizsgálatok elvégzéséhez és összefoglalja azokat a tényezőket, amelyeket az ilyen vizsgálatok megkezdése előtt fontolóra kell venni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia az adatok bizonyító erején alapuló megközelítést tesz lehetővé az anyagok szemirritációs/-szemkorróziós tulajdonságaival kapcsolatos meglévő adatok értékeléséhez, és lépcsőzetes megközelítést azon anyagok vonatkozó adatainak összegyűjtéséhez, amelyekhez további vizsgálatokra van szükség, vagy amelyeket korábban egyáltalán nem vizsgáltak. A stratégia magában foglalja továbbá, hogy először validált és elfogadott *in vitro* vagy ex vivo vizsgálatokat kell végezni, majd meghatározott körülmények esetén a B4. bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálati módszerrel további vizsgálatokat (3) (4) kell lefolytatni.

A LÉPÉSENKÉNTI VIZSGALATI STRATÉGIA ISMERTETÉSE

A vizsgálatoknak a lépcsőzetes vizsgálati stratégia (ábra) keretében történő elvégzése előtt minden rendelkezésre álló információt ki kell értékelni annak meghatározása érdekében, hogy szükség van-e *in vivo* szemvizsgálatokra. Bár egy-egy paraméter (pl. szélsőséges pH-érték) vizsgálatából is jelentős mennyiségű információ nyerhető ki, az összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell venni. A kérdéses anyag vagy szerkezeti analógjai hatásaival kapcsolatos összes vonatkozó adatot értékelni kell az adatok bizonyító erejéről való döntés meghozatalakor, és meg is kell indokolni ezt a döntést. Elsődleges hangsúlyt kell fektetni az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatokra, ezt követően az *in vitro* vagy ex vivo vizsgálatok eredményére. Lehetőség szerint kerülni kell korróziós hatású anyagok *in vivo* vizsgálatát. A vizsgálati stratégia során figyelembe veendő tényezők a következők:

▼B

A rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatok értékelése (1. lépés). Első lépésben a rendelkezésre álló humán adatokat, pl. klinikai vagy munkaegészségügyi vizsgálatokat, valamint esettanulmányokat és/vagy állatokban végzett szemvizsgálatok adatait kell kiértékelni, mivel ezek a szemre gyakorolt hatásokkal közvetlenül összefüggő információkat szolgáltatnak. Ezt követően a rendelkezésre álló bőrkorróziós/bőrirritációs humán vizsgálatok és/vagy állatkísérletek adatait kell kiértékelni. Az ismerten szemkorróziós hatású vagy súlyosan szemirritáló anyagokat nem szabad állatok szemébe cseppenteni, ahogyan abőrre korróziós hatású vagy irritáló anyagokat sem; az ilyen anyagokat úgy kell tekinteni, hogy a szemre is korróziós hatásúak és/vagy irritálok. Nem szabad *in vivo* szemvizsgálatokat végezni olyan anyagokkal sem, amelyek esetében korábbi szemvizsgálatok alapján elegendő bizonyíték van az ilyen hatások hiányára.

A szerkezet-aktivitási összefüggések (SAR) elemzése (2. lépés). Ha vannak, fontolóra kell venni szerkezetileg rokon anyagok vizsgálatát. Ha a szerkezetileg rokon anyagokkal vagy elegyeikkel kapcsolatban elegendő olyan humán és/vagy állatkísérletes adat áll rendelkezésre, amely valószínűsíti a szemkorróziós/-szemirritációs potenciált, feltételezhető, hogy a vizsgálandó anyag ugyanilyen válaszreakciókat vált ki. Ilyen esetekben a vizsgálandó anyagot esetleg nem kell megvizsgálni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia értelmében a szerkezetileg rokon anyagok vagy elegyeik vizsgálatából származó negatív adatok nem jelentenek elegendő bizonyítékot arra, hogy az anyag nem korróziós hatású vagy nem irritáló. A bőrre és a szemre gyakorolt hatások vonatkozásában is validált és elfogadott SAR-megközelítéseket kell alkalmazni a korróziós és irritáló potenciál meghatározására.

Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reaktivitás (3. lépés). A szélsőséges, például a pH ≤ 2,0 és ≥ 11,5 kémhatású anyagok erőteljes lokális hatást gyakorolhatnak. Ha a szélsőséges pH-érték az alapja annak, hogy egy anyagot korróziós hatásúnak minősítsenek, akkor figyelembe lehet venni az anyag sav/alkáli tartalékát (vagy pufferkapacitását) is (5)(6). Ha a pufferkapacitás alapján valószínűsíthető, hogy az anyag nem szemkorróziós hatású, akkor ennek megerősítésére további vizsgálatokat kell végezni, lehetőleg validált és elfogadott *in vitro* vagy ex vivo módszerek alkalmazásával (lásd az 5. és 6. lépést).

Más meglévő információk fontolóra vétele (4. lépés). Ebben a fázisban a dermális alkalmazás esetén jelentkező szisztémás toxicitással kapcsolatban rendelkezésre álló összes információt ki kell értékelni. A vizsgálandó anyag akut dermális toxicitását is fontolóra kell venni. Előfordulhat, hogy nem kell a szemben megvizsgálni egy anyagot, ha igazolták, hogy dermális alkalmazás esetén erősen mérgező. Bár nem feltétlenül van összefüggés az akut dermális toxicitás és a szemirritáció/szemkorrózió között, fel kell tételezni, hogy ha egy szer dermálisan alkalmazva erősen mérgező, a szembe cseppentve is nagyon mérgező lesz. Az ilyen adatokat a 2. és a 3. lépés között is figyelembe lehet venni.

In vitro vagy ex vivo vizsgálatok eredményei (5. és 6. lépés). Nem kell állatokon kísérletezni olyan anyagokkal, amelyek validált és kimondottan a szem vagy a bőr korrózió jának/irritációjának értékelésére elfogadott módszerekkel végzett in *vitro* vagy ex vivo vizsgálatokban (7)(8) korróziós vagy súlyos irritáló hatást mutattak. Ilyen esetben fel lehettételezni, hogy az anyag *in vivo* is hasonlóan súlyos hatásokat vált ki. Ha nem állnak rendelkezésre validált és elfogadott *in vitro*/ ex vivo vizsgálatok, át lehet ugorni az 5. és a 6. lépést és közvetlenül a 7. lépéshez lépni.

Az anyag in vivo bőrirritáló vagy bőrkorróziós hatásának vizsgálata (7. lépés). Ha a fent felsorolt vizsgálatok adatai alapján nincs elegendő bizonyíték, amellyel meggyőző módon el lehetne végezni az anyag szemirritációs/szemkorróziós potenciáljának az adatok bizonyító erején alapuló elemzését, először az *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós potenciált kell a B4. vizsgálati módszer (4) és az ahhoz csatolt függelék (9) segítségével kiértékelni. Ha kimutatható, hogy az anyag bőrkorróziót vagy súlyos bőrirritációt okoz, más következtetést alátámasztó információk hiányában az anyagot korróziós hatású szemirritáló anyagnak kell tekinteni. Ilyen módon tehát nem kell *in vivo* szemvizsgálatot végezni. Ha az anyag nem bőrkorróziós vagy súlyosan bőrirritáló hatású, *in vivo* szemvizsgálatot kell végezni.

▼B

In vivo vizsgálat nyulakban (8. és 9. lépés). Az *in vivo* szemvizsgálatokat egyetlen állatot alkalmazó kiindulási vizsgálattal kell kezdeni. Ha ennek eredményei szerint az anyag súlyosan szemirritáló vagy szemkorróziós hatású, nem szabad további vizsgálatokat végezni. Ha a kiindulási vizsgálat nem mutat ki semmilyen korróziós vagy súlyosan irritáló hatást, két további állat alkalmazásával ellenőrző vizsgálatot kell végezni.

HIVATKOZÁSOK

(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. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized 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, November 1998 (http://wwwl.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) B4. vizsgálati módszer, Akut toxicitás: bőrirritáció/korrózió.

(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, PA., 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, pp. 48 3-524.

(8) B40. vizsgálati módszer, Bőrkorróziós hatás.

(9) A B4. vizsgálati módszer függeléke: Lépcsőzetes vizsgálati stratégia bőrirritációhoz és bőrkorrózióhoz.

▼B

Ábra

Vonatkozó vizsgálati és kiértékelési stratégia szemirritáció, illetve szemkorróziós hatás vizsgálatához

	Tevékenység	Eredmény	Következtetés
1	A meglévő humán és/vagy állatkísérletes adatok szerint hatással van a szemre	Súlyos szemkárosodás	Csúcs végpont; szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükég vizsgálatokra.
		Szemirritáló hatású	Csúcs végpont; szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
		Nem korróziós hatású vagy irritáló a szemre	Csúcs végpont; nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	A meglévő humán és/vagy állatkísérletes adatok szerint bőrkorróziós hatású	Bőrkorróziós hatású	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.
	A meglévő humán és/vagy állatkísérletes adatok szerint súlyosan bőrirritáló	Súlyosan bőrirritáló	Fel kell tételezni, hogy szemirritáló hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.
	↓		
	↓		
2	SAR -értékelést kell végezni a szemkorrózióra / szemirritációra vonatkozóan	Súlyos szemkárosodást jelez előre	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizgálatokra.
		Szemirritációt jelez előre	Fel kell tételezni, hogy szemirritáló hatású. Nincs szükség vizgálatokra.
	SAR-értékelést kell végezni a bőrkorrózióra vonatkozóan	Bőrkorróziót jelez előre	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizgálatokra.
	↓		
	Nem lehet előrejelzést tenni, vagy az előrejelzések num meggyőzők vagy negatívak		
	↓		
3	Meg kell mérni a pH-t (adott esetben figyelembe kell venni a pufferkapacitást is)	pH £ 2 vagy # 11,5 (nagy pufferkapacitással, amennyiben lenyeges)	Fel kell téltelezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.
	↓		
	2 < pH < 11,5, vagy pH £ 2 vagy pH # 11,5 alacsony vagy nulla pufferkapacitással, amennyiben lényeges		
	↓		
4	Ki kell értékelni a dermális alkalmazás esetén mérhető szisztémás toxicitást	Nagyon mérgező olyan koncentrőcióknál, ahol aszemvizsgálatokat végeznék.	Az anyag túlzottan mérgező ahhoz, hogy vizsgálni lehessen. Nincs szükség vizsgálatokra.
	↓		
	Nincs ilyen információ, vagy az anyag nem nagyon mérgező		
	↓		

▼B

5	El kell végezni egy validált *in vitro* vagy *ex vivo* szemkorróziós vizsgálatot.	Korróziós hatásra utaló válasz	In vivo korróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	↓		
	Az anyag nem korróziós hatásu. vagy a szemkorróziós vizsgálatára még nincsenek validált ín vitro *vagy* ex vivo *vizsgálati módszerek*		
	↓		
6	El kell végezni egy validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* szemirritációs vizsgálatot.	Irritáló válasz	*In vivo* irritációt kell feltételezni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	↓		
	Az anyag nem irritáló, vagy a szemirritációs vizsgálatára vonatkozóan még nincsenek validált in vitro *vagy* ex vivo *vizsgálati módszerek*		
	↓		
7	Kísérleti úton meg kell határozni az *in vivo* szemirritációs/szemmarási potenciált (lásd a 4B. vizsgálati módszert és annak függelékét.)	Korróziós hatás vagy súlyos irritációs válasz	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	↓		
	Az anyag nem korróziós hatású vagy nem súlyosan szemirritáló		
	↓		
8	Egyetlen nyúlon el kell végezni az el zetes *in vivo* szemvizsgálatot.	Súlyos szemkárosodás	Szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	↓		
	↓		
9	Egy vagy két további állaton el kell végezni az ellenőrző vizsgálatot.	Korróziós vagy irritáló hatású	Szemkorróziós vagy szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
		Nem korróziós vagy irritáló hatású	Nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatású. Nincs szükség további vizsgálatokra.

▼B

B.6. A BŐR ÉRZÉKENNYÉ TÉTELE

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Megjegyzések:

Az érzékenységnek, illetve a vizsgálatok azon képességének, hogy felderítik az emberek bőrét potenciálisan érzékennyé tevő anyagokat, nagy jelentősége van a toxicitás közegészségügyi osztályozási rendszerében.

Nincs olyan vizsgálati eljárás, amely a potenciálisan az emberi bőrt érzékennyé tevő összes anyagot megfelelően kimutatja, illetve amely az összes anyag tekintetében megfelelően alkalmazható.

Az anyag fizikai tulajdonságait, beleértve a bőrön való áthatolás képességét és egyéb tényezőket is, meg kell fontolni egy vizsgálat kiválasztása során.

Kétféle vizsgálatot dolgoztak ki tengerimalacokhoz: az egyik a hatásjavító típusú vizsgálat, amelyikben az allergiás állapot esetleges előidézése FCA-ban (Freunds Complete Adjuvant) való feloldás vagy szuszpendálás segítségével történik; a másik a nem hatásjavító típusú vizsgálat.

A hatásjavító típusú vizsgálatok valószínűleg pontosabbak egyes anyagok emberek bőrén érzékenységet előidéző hatásának előrejelzésére, mint azok a módszerek, amelyek nem alkalmazzák az FCA-t, ezért ezek a módszerek előnyben részesülnek.

A tengerimalac legerősebb ingerlési vizsgálata (Guinea-Pig Maximisation Test, GMPT) széles körben alkalmazott hatásjavító típusú vizsgálat. Bár számos másik módszer is alkalmazható egy anyag lehetséges, a bőrt érzékennyé tevő hatásának megállapítására, a GPMT a leginkább javasolt hatásjavító típusú módszer.

Sok vegyianyagosztály esetében a nem hatásjavító vizsgálatok (amelyek közül a leginkább javasolt a Bühler-vizsgálat) az általános vélemény szerint kevésbé érzékenyek.

Egyes esetekben megfelelő indokok állnak fenn a külsőleg történő adagolással végzett Bühler-vizsgálat választásához, a bőrbe befecskendezéses GPMT vizsgálat alkalmazása helyett. A Bühler-vizsgálat alkalmazását tudományosan indokolni kell.

Az alábbi módszer ismerteti a GPMT és a Bühler-vizsgálatot. Más módszerek is alkalmazhatók, ha alkalmazásuk jóváhagyott és tudományosan alátámasztottak.

Amennyiben egy elismert szűrővizsgálat pozitív eredményt ad, a vizsgált anyagot potencionális érzékenyítőként kell megjelölni. További vizsgálatot tengerimalacokkal nem szükséges végezni. Azonban, ha negatív eredményt ad a szűrő vizsgálat, akkor az itt leírt eljárásnak megfelelően kell a vizsgálatot a tengerimalacokkal elvégezni.

Lásd továbbá a B. rész Általános bevezetését.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Bőr érzékennyé tétele: (allergén kontakt dermatitis) a vizsgált anyagra adott, az immunrendszer által irányított bőrválasz. Embereknél a válasz jellemző tünetei: viszketés, bőrpirosság, ödéma, kiütés, hólyag, vagy ezen jelenségek valamilyen kombinációja. Más fajoknál a reakciók különbözhetnek, és esetleg csak bőrpirosság és ödéma jelentkezik.

Indukciós expozíció: kísérleti eljárás, amikor a kísérlet alanyát kiteszik egy vizsgált anyag hatásának, azzal a céllal, hogy túlérzékeny állapotot idézzenek elő.

Indukciós fázis: legalább egyhetes időtartam az indukciós expozíciót követően, ami alatt a túlérzékeny állapot kialakulhat.

Kiváltó expozíció: kísérleti expozíció, amikor az előzetesen kezelt kísérleti állatot kiteszik a vizsgált anyag hatásának az indukciós időszak után azzal a céllal, hogy meghatározzák túlérzékeny módon reagál-e.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A kísérleti eljárás érzékenységét és megbízhatóságát felmérik minden hat hónapban, olyan anyagok felhasználásával, amelyeknek ismerten gyenge, vagy közepes bőrérzékenyítő hatásuk van.

Helyesen lefolytatott vizsgálat esetén, hatásjavító vizsgálatban legalább 30 százalékban, nem hatásjavító vizsgálat esetén legalább 15 százalékban jelentkeznie kell a gyenge/közepes válasznak.

A következő anyagok alkalmazása javasolt:

CAS-szám	EINECS-szám	EINECS megnevezés	Közismert név
101-86-0	202-983-3	alfa-Hexilfahéjaldehid	α-hexil-cinnamaldehid
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (2-Merkaptobenztiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	nordkain

Meghatározott körülmények között megfelelő indoklással olyan más ellenőrző anyagokat is fel lehet használni, amelyek megfelelnek a fenti követelményeknek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALAPELVE

A kísérleti állatokat először alávetik a vizsgált anyag hatásának intradermális befecskendezés és/vagy epidermális adagolás útján (indukciós expozíció). Egy 10–14 napos pihentetési időszak után (indukciós fázis), amely alatt az immunválasz kifejlődhet, a kísérleti állatok megkapják a kiváltó dózist. A kísérleti állatoknak a kiváltó expozícióra adott reakciójának kiterjedtségét és mértékét összehasonlítják a kontrollcsoport tagjainak reakciójával, amelyeket látszólagos indukciónak vetettek alá, és amelyek megkapták a kiváltó expozíciót.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Ha a vizsgált anyag eltávolítása szükségesnek tűnik, akkor azt víz, vagy valamilyen megfelelő oldószer alkalmazásával hajtható végre, a létrejött reakció, vagy az epidermisz épségének befolyásolása nélkül.

▼B

1.5.1. *Tengerimalac legerősebb ingerlési vizsgálata (GPMT)*

1.5.1.1. Előkészületek

Az egészséges, fiatal felnőtt albinó tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napon át a laboratóriumi körülményekhez kell szoktatni. A vizsgálat előtt véletlenszerűen kiválasztják, és a kezelési csoportokba osztják az állatokat. A szőrzet eltávolítását nyírással, borotválással vagy esetleg kémiai szőrtelenítéssel végzik, az alkalmazott vizsgálati eljárástól függően. Gondosan el kell kerülni a bőr felhorzsolását. Az állatok tömegét megmérik a vizsgálat kezdete előtt és a befejezését követően.

1.5.1.2. Vizsgálati körülmények

1.5.1.2.1. Kísérleti állatok

Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumban szaporított albinó tengerimalacokat alkalmaznak.

1.5.1.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény egyedek egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek.

Legalább 10 állatot kell alkalmazni a kezelt csoportban és 5-öt a kontrollcsoportban. Ha kevesebb, mint 20 tengerimalacot használtak a vizsgálati csoportban és kevesebb mint 10-et a kontrollcsoportban, és nem lehet azt a következtetést levonni, hogy a vizsgált anyag érzékenységet okoz, akkor a kísérleti állatok számát legalább 20-ra, a kontrollcsoportban lévő állatok számát legalább 10-re növelve, további kísérlet elvégzése célszerű.

1.5.1.2.3. Adagolási szintek

Az indukciós expozícióhoz felhasznált vizsgált anyag koncentrációja legyen megfelelően elviselhető és a lehető legmagasabb, ami még csak gyenge közepes bőrirritációt okoz. A kiváltó expozíciónál alkalmazott koncentráció a legmagasabb, még nem irritatív dózis legyen. Ha szükséges, akkor a megfelelő koncentrációk két vagy három állat alkalmazásával végzett elővizsgálattal meghatározhatók. Megfontolandó az FCA-val kezelt állatok e célra való felhasználása.

1.5.1.3. A kísérlet végrehajtása

1.5.1.3.1. Indukció

Kezelt csoport, 0-dik nap

Három pár injekció beadása intradermálisan, 0,1 ml térfogattal, a váll környékére, amelyet előzőleg megtisztítottak a szőrzettől, olyan módon, hogy minden párból egy a középvonal egyik, egy a másik oldalára esik.

Injekció 1.1:1 keverék (v/v) FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat.

Injekció 2. a vizsgált anyag, megfelelő vivőanyagban, a kiválasztott koncentrációban.

Injekció 3. a vizsgált anyag a kiválasztott koncentrációban, amelyet FCA/víz vagy, fiziológiás sóoldat 1:1 keverékében (v/v) készítenek el.

A harmadik injekciónál a vízben oldható anyagokat feloldják a vizes fázisban, mielőtt az FCA-val összekevernék. A vizes fázis hozzáadása előtt a zsírban oldódó, illetve az oldhatatlan anyagokat szuszpendálják FCA-ban. A vizsgált anyag végső koncentrációja megegyezik a 2. injekció során alkalmazottal.

▼B

A 1. és a 2. injekciót egymáshoz közel adják be a fejhez legközelebbre, míg a harmadikat a vizsgálati terület farok felé eső részén kell beadni.

Kontrollcsoport, 0-dik nap

Három pár injekció beadása 0,1 ml térfogattal, ugyanarra a helyre, mint a kezelés alatt álló állatoknál.

Injekció 1.1:1 keverék (v/v) FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat.

Injekció 2. hígítatlan vivőanyag.

Injekció 3. 50 % m/v vivőanyag-készítmény FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat 1:1 keverékében (v/v).

Kezelt és kontrollcsoport, 5–7. nap

Körülbelül 24 órával a helyi indukciós alkalmazás megkezdése előtt, ha az anyag nem irritatív hatású, a vizsgálati területet rövid szőrzetnyírás és/vagy borotválás után 0,5 ml 10 százalékos nátrium-lauril-szulfát vazelines elegyével kezelik, a helyi irritáció kiváltása érdekében.

Kezelt csoport, 6–8. nap

A vizsgálati felületet ismét megtisztítják a szőrzettől. Egy szűrőpapírt (2 × 4 cm) telítenek a vizsgált anyag alkalmas vivőanyaggal képzett oldatával, azt alkalmazzák a vizsgált felületen, és azzal szigetelő kötés alkalmazásával, 48 órán keresztül szoros érintkezésben tartják. A vivőanyag kiválasztását indokolni kell. Szilárd anyagokat finomra porítják, és a megfelelő vivőanyaggal elegyítik. A folyadékok adott esetben hígítás nélkül is alkalmazhatóak.

Kontrollcsoport, 6–8. nap

A vizsgálati felületet ismét megtisztítják a szőrzettől. A vivőanyagot önmagában viszik fel azonos eljárással a vizsgált felületre, és azzal szigetelő kötés alkalmazásával, 48 órán keresztül szoros érintkezésben tartják.

1.5.1.3.2. Kiváltás

Kezelt és kontrollcsoport, 20–22. nap

A hasszéleket megtisztítják a szőrzettől, mind a kezelt, mind a kontrollcsoport esetében. Egy tapaszt, vagy egy tokot helyeznek fel az állatok hasának egyik szélére, amelyet megtöltenek a vizsgált anyaggal, és ha lehetséges, akkor egy tokot vagy egy tapaszt alkalmaznak, helyeznek fel a másik hasszélen, amelyet megtöltenek a vivőanyaggal. A tapaszokat szigetelő kötés segítségével, 24 órán keresztül szoros érintkezésben tartják a bőrrel.

1.5.1.3.3. Megfigyelés és értékelés: kezelt és kontrollcsoport

— a tapasz eltávolítása után, hozzávetőleg 21 órával a felületet megtisztítják és rövidre nyírják és/vagy leborotválják, és szőrtelenítik, ha szükséges,

— nagyjából 3 órával később (hozzávetőleg 48 órával a kiváltó expozíció kezdete után) megfigyelik és feljegyzik a bőrreakciót a függelékben megadott fokozatoknak megfelelően,

— hozzávetőleg 24 órával ez után a megfigyelés után egy második megfigyelést is végeznek (72 órával a kísérlet kezdete után) és ezt is feljegyzik.

Javasolt a kezelt és a kontrollállatok vakpróbával történő megfigyelése.

Ha szükséges az első kiváltás eredményeinek pontosítása, akkor – szükség esetén – egy második kiváltás (azaz újbóli kiváltás) alkalmazása megfontolandó egy új kontrollcsoporton, hozzávetőleg egy héttel az első után. Újbóli kiváltást az eredeti kontrollcsoporton is végre lehet hajtani.

▼B

Minden bőrreakciót és minden észlelhető leletet, beleértve a szisztémás reakciókat, amelyek az indukció és a kiváltás hatására jönnek létre, megfigyelnek és feljegyeznek a Magnusson/Kligman-féle értékelési skála szerint (lásd: Függelék). Egyéb eljárások (pl. kórszövettani vizsgálatok, a bőrön található ráncok mélységének mérése) is elvégezhetők, a kétséges reakciók tisztázása érdekében.

1.5.2. *Bühler-vizsgálat*

1.5.2.1. Előkészületek

Az egészséges, fiatal felnőtt albinó tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napon át a laboratóriumi körülményekhez kell szoktatni. A vizsgálat előtt véletlenszerűen kiválasztják, és a kezelési csoportokba osztják az állatokat. A szőrzet eltávolítását nyírással, borotválással vagy esetleg kémiai szőrtelenítéssel végzik, az alkalmazott vizsgálati eljárástól függően. Gondosan el kell kerülni a bőr felhorzsolását. Az állatok tömegét megmérik a vizsgálat kezdete előtt és a befejezését követően.

1.5.2.2. Vizsgálati körülmények

1.5.2.2.1. Kísérleti állatok

Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumban szaporított albinó tengerimalacokat alkalmaznak.

1.5.2.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény egyedek egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek.

Legalább 20 állatot kell alkalmazni a kezelt csoportban és 10-et a kontrollcsoportban.

1.5.2.2.3. Adagolási szintek

Az indukciós expozícióhoz felhasznált vizsgált anyag koncentrációja legyen a lehető legmagasabb, ami gyenge, ill. nem túl erős bőrirritációt okoz. A kiváltó expozíciónál alkalmazott koncentráció a legmagasabb, még nem irritatív dózis legyen. Ha szükséges, akkor a megfelelő koncentrációk két vagy három állat alkalmazásával végzett előzetes vizsgálattal meghatározhatók.

Vízoldékony vizsgálati anyagoknál célszerű vizet, vagy nem irritatív hatású felszínkezelő oldatot használni vivőanyagként. Más vizsgált anyagokhoz 80 % etanol/víz ajánlott az indukcióhoz, és aceton a kiváltáshoz.

1.5.2.3. A kísérlet végrehajtása

1.5.2.3.1. Indukció

Kezelt csoport, 0-dik nap

Az egyik hasszélt megtisztítják a szőrzettől (rövidre nyírják). Egy tapaszt helyeznek fel, amelyet teljesen telítenek a megfelelő vivőanyagban elegyített vizsgálati anyaggal (a vivőanyag kiválasztását indokolni kell, folyékony vizsgált anyagok felvihetők adott esetben hígítás nélkül is).

A vizsgálati tapaszt felhelyezik a vizsgálat felületre, és egy megfelelő szigetelő tapasszal, vagy tokkal, szigetelő kötés segítségével 6 órán keresztül érintkezésben tartják a kísérleti állat bőrével.

▼B

A vizsgálati tapasznak szigetelőnek kell lennie. Egy kerek vagy négyzet alakú vattakötés alkalmas, aminek legalább 4–6 cm^2 területűnek kell lennie. A zártság biztosítására megfelelő leszorító eszköz alkalmazása javasolt. Ha pólyát alkalmaznak, akkor bizonyos körülmények között további expozícióra lehet szükség.

Kontrollcsoport, 0-dik nap

Az egyik hasszélt megtisztítják a szőrzettől (rövidre nyírják). A vivőanyagot önmagában helyezik fel, azonos módon, mint ahogy az a kezelt csoportnál történik. A vizsgálati tapaszt felhelyezik a vizsgálat felületre, és egy megfelelő szigetelő tapasszal, vagy tokkal, szigetelő kötés segítségével 6 órán keresztül érintkezésben tartják a kísérleti állat bőrével.

Kezelt és kontrollcsoport, 6–8. és 13–15. nap

A 0-dik napon végzettel megegyező eljárást kell végrehajtani, ugyanazon a vizsgálati felületen (szőrnyírás, ha szükséges) ugyanazon a hasszélen a 6–8. napon és megismételve a 13–15. napon.

1.5.2.3.2. Kiváltás

Kezelt és kontrollcsoport, 27–29. nap

A kezeletlen hasszélt megtisztítják a szőrzettől (rövidre nyírják), mind a kezelt, mind a kontrollcsoport esetében. Egy szigetelőtapaszt vagy egy tokot helyeznek fel a kezelt és kontrollcsoportba tartozó állatok hátsó, kezeletlen hasszélére, amelyet megtöltenek a megfelelő mennyiségű, legnagyobb, de nem irratív koncentrációjú vizsgált anyaggal.

Adott esetben csak vivőanyaggal átitatott szigetelőtapaszt vagy -tokot helyeznek fel a kezelt és a kontrollcsoportba tartozó állatok elülső, kezeletlen hasszélére. A tapaszt vagy tokot megfelelő kötés segítségével, 6 órán keresztül szoros érintkezésben tartják a kísérleti állat bőrével.

1.5.2.3.3. Megfigyelés és értékelés

— a tapasz eltávolítása után hozzávetőleg 21 órával a felületet megtisztítják a szőrzettől,

— hozzávetőleg 3 órával később (körülbelül 30 órával a kiváltó tapasz alkalmazása után) a bőr reakcióját megfigyelik és feljegyzik a függelékben megadott fokozatoknak megfelelően,

— hozzávetőleg 24 órával ezen megfigyelés után (nagyjából 54 órával a kiváltó tapasz alkalmazása után) a bőr reakcióját ismét megfigyelik és feljegyzik.

Javasolt a kezelt és a kontrollállatok vakpróbával történő megfigyelése.

Ha szükséges az első kiváltás eredményeinek pontosítása, akkor – szükség esetén – egy második kiváltás (azaz újbóli kiváltás) alkalmazása megfontolandó egy új kontrollcsoporton, hozzávetőleg egy héttel az első után. Újbóli kiváltást az eredeti kontrollcsoporton is végre lehet hajtani.

▼B

Minden bőrreakciót és minden észlelhető leletet, beleértve a szisztémás reakciókat, amelyek az indukció és a kiváltás hatására jönnek létre, megfigyelnek és feljegyeznek a Magnusson/Kligman-féle értékelési skála szerint (lásd: Függelék). Egyéb eljárások (pl. kórszövettani vizsgálatok, a bőrön található ráncok mélységének mérése) is elvégezhetők a kétséges reakciók tisztázása érdekében.

2. **ADATOK (GPMT és Bühler vizsgálatok)**

Minden adatot táblázat formájában összesítenek, amely tartalmazza minden állat tekintetében az egyes megfigyelési időpontok alkalmával észlelt bőrreakciókat.

3. **ZÁRÓVIZSGÁLATI JELENTÉS (GPMT ÉS BÜHLER VIZSGÁLAT)**

Ha szűrő próbát végeznek a tengerimalac-vizsgálat előtt (pl. helyi nyirokcsomópróba [LLNA], egérfüldaganat-vizsgálat [MEST]), akkor vizsgálat leírását ill. az irodalmi hivatkozásokat, beleértve az eljárás részleteit is meg kell adni a kapott eredményekkel és a vizsgált és az összehasonlító anyaggal együtt.

Vizsgálati jelentés (GPMT és Bühler vizsgálatok)

A vizsgálati jelentésben – amennyiben lehetséges – az alábbi információknak kell szerepelniük:

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott tengerimalactörzs,

— az állatok száma, életkora és neme,

— az állatok eredete, tartási körülmények, étrend stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor.

Vizsgálati körülmények:

— az állat azon testrészének előkészítése, ahová felhelyezik a vizsgált anyagot,

— a felhasznált tapasz típusának és a tapaszolási eljárásnak a részletes leírása,

— az előzetes vizsgálat eredménye, a vizsgálatban alkalmazandó indukciós és kiváltó koncentrációra vonatkozó következtetésekkel együtt,

— a vizsgált anyag előkészítésének, alkalmazásának és eltávolításának részletei,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vivő és a vizsgált anyag koncentrációja az indukciós és a kiváltó eljárásban, és a két eljárás során összesen felhasznált vizsgált anyag mennyisége.

Eredmények:

— a legutolsó, a vizsgálat érzékenységét és megbízhatóságát ellenőrző eljárás (ld. 1.3.) eredményeinek összefoglalása, beleértve az ehhez felhasznált anyagokra, koncentrációkra és vivőanyagra vonatkozó információkat is,

▼B

— az egyes állatok megfigyelésének eredményei, beleértve az értékelő rendszerre vonatkozó adatokat,

— a megfigyelt hatások jellegének és fokozatának részletes leírása,

— bármely kórszövettani megfigyelés.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

Ez a módszer megfelel az OECD TG 406-nak.

▼B

Függelék

TÁBLÁZAT:

Magnusson/Kligman-féle értékelési skála a kiváltó tapaszos vizsgálatra adott reakciók értelmezéséhez

0 = nincs látható változás

1 = enyhe, vagy foltos börpirosság

2 = mérsékelt és összefüggő bőr pirosság

3 = élénk bőrpirosság és duzzanat”

▼M4

B.7. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ, 28 NAPOS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 407. vizsgálati iránymutatásában (2008) leírt módszerrel. Az eredeti 407. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. 1995-ben felülvizsgált változatot fogadtak el, amelylyel további információk nyerhetők a vizsgált állatokról, különösen neurotoxicitási és immuntoxicitási szempontból.

2. 1998-ban az OECD a meglévő vizsgálati iránymutatások felülvizsgálatára, valamint az endokrin rendszert esetlegesen károsító anyagok kiszűrésére és vizsgálatára vonatkozó új vizsgálati iránymutatások kidolgozására irányuló, kiemelt fontosságú tevékenységet indított (8). A tevékenység részeként az „ismételt adagolású, 28 napos orális toxicitási vizsgálat rágcsálókon” elnevezésű eljárásra vonatkozó (407. számú) OECD-iránymutatást a vizsgált vegyi anyagok endokrin aktivitásának észlelésére alkalmas paraméterekkel frissítették. Az eljárást átfogó nemzetközi program keretében vizsgálták, hogy megállapítsák az új paraméterek relevanciáját és gyakorlati alkalmazhatóságát, a paraméterek (anti)ösztrogén, (anti)androgén és (anti)tiroid hatású vegyi anyagok tekintetében nyújtott teljesítményét, a laboratóriumon belüli és laboratóriumközi ismételhetőséget, valamint azt, hogy az új paraméterek mennyiben akadályozzák a 407. vizsgálati iránymutatást megelőzően előírt paraméterek alkalmazását. Az így kapott nagy mennyiségű adatot egy átfogó OECD-jelentésben (9) foglalták össze és értékelték részletesen. Ez a frissített (a 407. vizsgálati iránymutatással egyenértékű) B.7. vizsgálati módszer a nemzetközi vizsgálati program tapasztalatain és eredményein alapul. A jelen vizsgálati módszer lehetővé teszi bizonyos, az endokrin rendszer útján kifejtett hatások egyéb toxikológiai hatások összefüggésében történő értékelését.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

3. Egy vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt adagolású orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut toxicitási vizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. A jelen vizsgálati módszer célja a hatásoknak a lehetséges toxicitási célok igén széles körénél történő vizsgálata. A módszer információkkal szolgál a viszonylag rövid időn belüli ismételt expozíció valószínű egészségügyi kockázatairól, beleértve az idegrendszerre, az immunrendszerre és az endokrin rendszerre gyakorolt hatásokat. E meghatározott végpontok tekintetében rendszerint azonosítja azokat a neurotoxikus potenciállal rendelkező vegyi anyagokat, amelyek e tekintetben további, részletes vizsgálatokat indokolhatnak, valamint a pajzsmirigyet fiziológiai szempontból befolyásoló vegyi anyagokat. Adatokkal szolgálhat emellett a fiatal ivarérett állatok hím és/vagy nőstény szaporítószerveire hatást gyakorló vegyi anyagokról, továbbá jelezheti azok immunológiai hatásait.

4. A jelen B.7. vizsgálati módszerrel kapott eredmények a veszélyek azonosítására és kockázatértékelésre használandók. Az endokrin rendszerrel kapcsolatos paraméterek alkalmazásával kapott eredményeket az OECD endokrin rendszert károsító anyagok vizsgálatára és értékelésére vonatkozó elvi keretrendszerének összefüggésében kell értelmezni (11). A módszer egy alapvető, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatot foglal magában, amely a 90 napos vizsgálatot nem igénylő vegyi anyagok esetén (például abban az esetben, ha az előállított mennyiség nem halad meg bizonyos határértékeket), vagy egy hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálataként alkalmazható. Az expozíció időtartama 28 nap.

▼M4

5. A vizsgált vegyi anyag endokrin aktivitásának esetleges észlelésére alkalmas paraméterek validálása érdekében folytatott nemzetközi program során kimutatták, hogy a jelen B.7. vizsgálati módszerrel kapott adatok minősége jelentős mértékben függ a vizsgálati laboratórium tapasztalatától. Ez konkrétan a nőstény szaporítószervek ciklikus változásainak kórszövettani meghatározásához, valamint a kisméretű, nehezen boncolható hormonfüggő szervek súlyának meghatározásához kapcsolódik. A kórszövettani vizsgálathoz iránymutatást dolgoztak ki (19). Az iránymutatás elérhető az OECD vizsgálati iránymutatásokkal foglalkozó nyilvános weboldalán. Célja, hogy segítse a kórboncnokok vizsgálatait, valamint fokozza a vizsgálat érzékenységét. Több paraméterről találták úgy, hogy alkalmas az endokrin rendszerrel kapcsolatos toxicitás kimutatására, és ezeket belefoglalták a vizsgálati módszerbe. Azokat a paramétereket, amelyekről nem állt rendelkezésre elegendő adat azok hasznosságának igazolására, vagy amelyek endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásának elősegítésére való képességéről a validációs program során csekély bizonyítékot találtak, a módszer opcionális végpontként javasolja (lásd a 2. függeléket).

6. A validációs folyamat során előállított adatok alapján hangsúlyozandó, hogy e vizsgálat nem kellően érzékeny valamennyi (anti)androgén és (anti)ösztrogén hatásmechanizmusú anyag azonosítására (9). A jelen vizsgálati módszer nem alkalmazandó az endokrin rendszert károsító hatásokra leginkább érzékeny életszakaszban. A vizsgálati módszerrel a validációs folyamat során ennek ellenére azonosítottak a pajzsmirigy működésére gyenge és erős hatást gyakorló anyagokat, valamint erős és mérsékelt, ösztrogén vagy androgén receptorokon keresztül ható endokrin hatóanyagokat, ugyanakkor a legtöbb esetben nem sikerült azzal azonosítani az ösztrogén vagy androgén receptorokra gyenge hatást gyakorló endokrin hatóanyagokat. Éppen ezért a vizsgálat nem nevezhető az endokrin aktivitás szűrésére szolgáló vizsgálatnak.

7. Következésképpen az e hatásmechanizmusokkal összefüggő hatások hiánya nem tekinthető az endokrin rendszerre gyakorolt hatások hiánya bizonyítékának. Az endokrin rendszer által közvetített hatások tekintetében az anyag jellemzését éppen ezért nem szabad kizárólag az e vizsgálati módszerrel kapott eredményekre alapozni, hanem azokat az adatok bizonyító erejének súlyozásához kell felhasználni, a lehetséges endokrin aktivitás jellemzéséhez figyelembe véve a vegyi anyagról rendelkezésre álló összes adatot. Éppen ezért az endokrin aktivitásra (az anyag jellemzésére) vonatkozó szabályozói döntéshozatalnak átfogó alapokon kell nyugodnia, és nem alapulhat kizárólag az e vizsgálati módszer alkalmazásával kapott eredményeken.

8. Elismerik, hogy minden, állatkísérleteken alapuló eljárást az állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak megfelelően kell végrehajtani; az alábbiakban foglalt, gondozásra és kezelésre vonatkozó leírások minimális teljesítményszabványok, amelyeket a szigorúbb helyi szabályozások felülbírálnak. Az állatokkal való humánus bánásmódról további iránymutatás a megfelelő OECD-kiadványban található (14).

9. Az alkalmazott fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgált vegyi anyagot naponta, szájon át adjuk be több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként más-más adagolási szinten, 28 napon keresztül. Az anyag beadásának időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében minden nap gondosan megfigyeljük. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk. A 28 napos vizsgálat információkkal szolgál az ismételt orális expozíció hatásairól, és

▼M4

jelezheti a további, hosszú távú vizsgálatok szükségességét. Információkat biztosíthat továbbá a hosszabb távú vizsgálatokhoz használandó koncentrációk kiválasztásához. A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával kapott adatok lehetővé teszik a vizsgált vegyi anyag toxicitásának jellemzését, a dózis-válasz összefüggés kimutatását, valamint a még nem észlelhető káros hatásszint (NOAEL) meghatározását.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

11. A javasolt rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Ha a jelen B.7. vizsgálati módszerben meghatározott paramétereket más rágcsálófajon vizsgáljuk, a döntést részletesen indokolni kell. Bár biológiailag elképzelhető, hogy más fajok a patkányhoz hasonlóan reagálnak a toxikus anyagokra, a kisebb méretű fajok alkalmazása nagyobb variabilitáshoz vezethet a kisebb szervek boncolásával összefüggő technikai nehézségek miatt. A nemzetközi validációs programban a patkány volt az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatására használt egyetlen faj. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolást az elválasztás után a lehető legrövidebb időn belül célszerű elkezdeni, de mindenképpen az állatok 9 hetes kora előtt. A vizsgálat megkezdésekor az egyes kísérleti állatok testsúlyának csak minimális mértékben szabad különböznie egymástól, és egyik nem esetében sem térhet el ± 20 %-nál nagyobb mértékben a nem átlagától. Amennyiben az ismételt orális adagolást egy hosszabb távú vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük, lehetőség szerint azonos törzsből való, azonos eredetű állatokat kell alkalmazni mindkét vizsgálathoz.

Az állatok tartása és etetése

12. Minden eljárásnak meg kell felelnie a laboratóriumi állatgondozásra vonatkozó helyi szabványoknak. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását a vizsgált vegyi anyaggal való megfelelő keveredés igénye is befolyásolhatja, ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmánnyal adjuk be. Az állatokat nemek szerint elkülönítve, kis csoportokban kell tartani; tudományos szempontból indokolt esetekben az állatok egyenként is elhelyezhetők. Ketrecben való csoportos elhelyezés esetén egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható.

13. Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a takarmány nem tartalmaz-e szennyező anyagokat. A takarmányból egy mintát a jegyzőkönyv véglegesítéséig meg kell őrizni.

Az állatok előkészítése

14. Egészséges, fiatal, ivarérett állatokat osztunk véletlenszerűen a kontroll- és kezelt csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelöljük, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartjuk a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából.

A dózisok előkészítése

15. A vizsgált vegyi anyagot gyomorszondán át, vagy az állatok táplálékába vagy ivóvizébe keverve adjuk be. A szájon át történő beadás módszerét a vizsgálat céljától, valamint a vizsgált vegyi anyag fizikai, kémiai és toxikokinetikai tulajdonságaitól függően választjuk meg.

▼M4

16. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/emulziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. Amennyiben nem víz a vivőanyag, a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük. Meg kell határozni azt is, hogy a vizsgált vegyi anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

17. Minden egyes adagolási szinthez legalább 10 állatot (5 hímet és 5 nőstényt) kell alkalmazni. Ha időközi elpusztítást tervezünk, a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékozunk pusztítani. Meg kell fontolni egy további, tíz állatból (nemenként öt példányból) álló kísérő csoport alkalmazását a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, amelyen a kezelés időszakát követően legalább 14 napig megfigyeljük a toxikus hatás visszafordíthatóságát, tartósságát vagy késleltetett kialakulását.

Adagolás

18. Általában legalább három vizsgálati és egy kontrollcsoport alkalmazandó, azonban ha más adatok értékelése alapján 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap adag esetén nem várható hatás, határérték-vizsgálat végezhető. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, az alkalmazandó dózisok meghatározása céljából tartománybehatároló vizsgálat végezhető (azonos törzsből való, azonos eredetű állatokon). A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia.

19. Az adagolási szintek kiválasztásánál figyelembe kell venni a vizsgált, vagy azzal rokon vegyi anyagok toxicitására és (toxiko)kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legmagasabb dózist úgy kell kiválasztani, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált vagy súlyos szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentjük, azzal a céllal, hogy a legalacsonyabb adagolási szinten kimutassuk az dózistól függő hatásokat és a nem észlelhető káros hatásszintet (NOAEL). A csökkenő dózisszintek beállításához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, a dózisok közötti nagyon nagy intervallumok (például 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása.

20. Ha általános toxicitást (például testsúlycsökkenést, a májra, a szívre, a tüdőre vagy a vesére kifejtett hatásokat stb.) vagy egyéb, nem feltétlenült toxikus reakcióra utaló változásokat (például csökkent táplálékfogyasztást, májmegnagyobbodást) figyelünk meg, az immun-, ideg- és endokrin rendszer szempontjából érzékeny végpontok tekintetében megfigyelt hatások értelmezésekor óvatosan kell eljárni.

Határérték-vizsgálat

21. Ha a vizsgálat során egyetlen, legalább 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap adagolási szint, vagy a takarmányban vagy ivóvízben beadott anyagmennyiség ennek megfelelő (a testsúly alapján végzett számításokon alapuló) százaléka, és az e vizsgálathoz leírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, valamint ha a szerkezetileg rokon vegyi anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése nem feltétlenül tekintendő szükségesnek. A határérték-vizsgálat alkalmazandó, kivéve, ha az emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

▼M4

A dózisok beadása

22. Az állatoknak 28 napon keresztül naponta, a hét 7 napján adjuk be a vizsgált vegyi anyagot. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, lehetőleg egyetlen adagban kell gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. E mennyiség nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm arányt, kivéve vizes oldatok esetében, amelyeknél 2 ml/100 testsúlygramm is alkalmazható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró vegyi anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy a mennyiség valamennyi adagolási szinten konstans legyen.

23. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmánnyal juttatjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (ppm), vagy az állatok testsúlyára kiszámított állandó dózisszint alkalmazható, és meg kell jelölni, hogy melyik alternatívát alkalmazzuk. A szondával bejuttatott vegyi anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és szükség szerint ki kell igazítani ahhoz, hogy az állat testsúlyához viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. Ha az ismételt adagolású vizsgálatot egy hosszú távú vizsgálat előtanulmányaként végezzük, mindkét vizsgálatban hasonló takarmányt kell alkalmazni.

Megfigyelések

24. A megfigyelési időszak 28 nap. A kísérő csoportban lévő állatokat, amelyekkel további megfigyeléseket tervezünk, még legalább további 14 napig kell kezelés nélkül tartani, hogy a toxikus hatások késleltetett előfordulását, megmaradását vagy visszafordíthatóságát megfigyeljük.

25. Naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban általános klinikai megfigyelést kell végezni, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Fel kell jegyezni a kísérleti állatok klinikai kórállapotát. Naponta legalább kétszer meg kell vizsgálni az összes állatot megbetegedés és elhullás szempontjából.

26. Az első expozíció előtt egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően pedig legalább hetente egyszer az összes állatot részletes klinikai vizsgálatoknak kell alávetni. E megfigyeléseket az állatok tartására egyébként használt ketreceken kívül, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában kell elvégezni. A megfigyeléseket gondosan fel kell jegyezni, lehetőleg a vizsgálatokat végző laboratórium által kifejezetten meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti eltérések, és hogy a megfigyeléseket lehetőleg olyan megfigyelők végezzék, akik nem tudnak a kezelésről. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (2).

27. Az expozíció negyedik hetében a különböző típusú ingerekre (2) (például hallószervi, vizuális és önérzékelési ingerekre) (3) (4) (5) mutatott reakciókat vizsgáljuk, felmérjük a szorítás erejét (6) és a motoros aktivitást (7). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók.

▼M4

28. Az expozíció negyedik hetében mellőzhetők a funkcionális megfigyelések, ha a vizsgálatot egy azt követő (90 napos) szubkrónikus toxicitási vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük. Ebben az esetben a funkcionális megfigyeléseket az utóbbi vizsgálat részeként kell elvégezni. Másrészt az ismételt adagolású vizsgálat során végzett funkcionális megfigyelések adatainak megléte segítheti az azt követő szubkrónikus toxicitási vizsgálat során a dózisok kiválasztását.

29. Kivételes esetekben a funkcionális megfigyelések elhagyhatók azon csoportoknál is, amelyek egyébként olyan mértékű toxicitási tüneteket mutatnak, hogy az jelentős mértékben megzavarná a funkcionális vizsgálat eredményeit.

30. A boncolásnál minden nőstény ivari ciklusa meghatározható hüvelykenet alapján (nem kötelező). E megfigyelések információkkal szolgálnak az ivari ciklus elpusztítás időpontjában fennálló stádiumáról, és segíthetik az ösztrogénre érzékeny szövetek szövettani értékelését (lásd a szövettanra vonatkozó iránymutatást (19)).

Testsúly és táplálék-/vízfogyasztás

31. Minden állat súlyát hetente legalább egyszer le kell mérni. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. Amennyiben a vizsgált vegyi anyagot az ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást is legalább hetente le kell mérni.

Hematológia

32. A vizsgálati időszak végén a következő hematológiai vizsgálatokat kell elvégezni: hematokrit, hemoglobinkoncentráció, vörösvértestszám, retikulociták, teljes és differenciált vérkép, trombocitaszám és a véralvadási idő/képesség mérése. Ha a vizsgált vegyi anyagról vagy annak vélt metabolitjairól ismert vagy feltételezhető, hogy oxidáló tulajdonságokkal rendelkeznek, az említett vizsgálatokon kívül többek között a methemoglobinkoncentrációt és a Heinz-testek előfordulását is meg kell határozni.

33. A vérmintákat egy megnevezett helyről kell venni, közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy aközben, és azokat megfelelő körülmények között kell tárolni. Az állatokat az elpusztítás előtti éjszaka koplaltatni kell ([1]).

Klinikai biokémiai vizsgálatok

34. A klinikai biokémiai értékeknek a szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesére és a májra gyakorolt hatások vizsgálata érdekében végzett meghatározását a közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként elvégzett vérvétel során valamennyi állattól vett mintákon kell elvégezni (eltekintve az elhullásközeli állapotban lévő és/vagy időközben elpusztított egyedektől). A vérplazma- és vérszérum-meghatározások során vizsgálandó anyagok közé tartozik a nátrium, a kálium, a vércukor, az összkoleszterin, a karbamid, a kreatinin, az összprotein és az albumin, továbbá legalább két, májsejti hatásokat jelző enzim (például alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alkáli foszfatáz, γ-glutamil-transzpeptidáz és glutamát-dehidrogenáz), valamint az epesavak. Bizonyos körülmények között hasznos információk nyerhetők további (májból vagy máshonnan származó) enzimek, valamint a bilirubin méréséből.

35. Kiegészítésként a vizsgálat utolsó hetében a vizeletet előre meghatározott időpontokban való gyűjtése mellett a vizelet alábbi tulajdonságainak meghatározása is elvégezhető: megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek.

([1]) Bizonyos szérum- és a plazmavizsgálatok, főleg a glükóz meghatározása esetén ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy a vizsgálatokat megelőző koplaltatás mellőzése szükségszerűen növelné a kapott eredmények variabilitását, ami így megnehezítené a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését. Másrészről az éjszakai koplaltatás befolyásolhatja az állatok általános anyagcseréjét, valamint – különösen azon vizsgálatok esetében, amelyeknél a vizsgált anyagot a táplálékkal adagolják – megzavarhatja a vizsgált vegyi anyagnak való napi expozíciót. Ha az éjszakai koplaltatás mellett döntünk, a klinikai biokémiai paramétereket a vizsgálat negyedik hetében, a funkcionális megfigyeléseket követően kell meghatározni.

▼M4

36. Ezeken túlmenően megfontolandó az általános szöveti roncsolódás plazma- vagy szérummarkereinek vizsgálata. Más vizsgálatokat is el kell végezni, ha a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai hatással vannak vagy lehetnek a kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen például a kalcium, a foszfát, a trigliceridek, egyes hormonok, valamint a kolinészteráz mérése. Ezeket az értékeket az egyes besorolási osztályokhoz tartozó vegyi anyagokra nézve vagy eseti alapon kell meghatározni.

37. Bár az endokrin rendszerrel kapcsolatos végpontok nemzetközi értékelése során nem nyert egyértelmű bizonyítást, hogy ez a pajzsmirigyhormonok (T3, T4) és a pajzsmirigyserkentő hormon (TSH) meghatározása tekintetében előnyös, hasznos lehet plazma- vagy szérummintákat megőrizni a T3, a T4 és a TSH (nem kötelező) mérése érdekében, amennyiben az agyalapi mirigy-pajzsmirigy tengelyre kifejtett hatásra utaló jeleket tapasztalunk. E minták tárolás céljából -20 °C hőmérsékletre fagyaszthatók. A hormonok meghatározásának variabilitását és az azzal kapott abszolút koncentrációt az alábbi tényezők befolyásolhatják:

— az elpusztítás időpontja, tekintettel a hormonkoncentrációk nap folyamán tapasztalható ingadozására,

— az állatot érő indokolatlan stressz elkerülése érdekében alkalmazott elpusztítási mód, amely hatással lehet a hormonkoncentrációkra,

— a hormonmeghatározásokhoz alkalmazott, standard görbéjük tekintetében esetlegesen eltérő vizsgálati készletek.

A pajzsmirigyre ható vegyi anyagok egyértelmű azonosítása kórszövettani vizsgálat útján hatékonyabban elvégezhető, mint hormonszintek alapján.

38. A kifejezetten hormon-meghatározási célra szánt plazmamintákat a nap hasonló időpontjában kell gyűjteni. Javasolt megfontolni a T3, T4 és TSH pajzsmirigyi kórszövettani elváltozások esetén végzett meghatározását. A kereskedelmi fogalomban kapható különböző vizsgálati készletek eltérő számszerű értékeket adnak a hormonkoncentrációk elemzése során. Következésképpen nem feltétlenül lehet teljesítménykritériumokat megadni egységes múltbeli adatok alapján. Másik lehetőségként a laboratóriumoknak törekedniük kell arra, hogy a T3 és a T4 variációs együtthatója 25 alatt, a TSH-é pedig 35 alatt maradjon. Minden koncentrációt ng/ml-ben kell feljegyezni.

39. Ha a rendelkezésre álló kiinduló adatok nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó a hematológiai és klinikai biokémiai változók meghatározása az adagolás kezdete előtt, lehetőség szerint az állatok egy, a kísérleti csoportokba nem tartozó csoportjánál.

PATOLÓGIA

Autopszia

40. A vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Az összes állat máját, veséit, mellékveséit, heréit, mellékheréit, prosztatáját és ondóhólyagját a koaguláló mirigyekkel együtt, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét (eltekintve az elhullásközeli és/vagy a vizsgálat befejeztét megelőzően elpusztított egyedekéitől) megfelelően megtisztítjuk minden rátapadt szövettől, és azok nedves súlyát a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül megmérjük, mielőtt azok kiszáradnának. A prosztata és a kapcsolódó szervek megtisztítása során ügyelni kell arra, hogy ne szúrjuk át a folyadékkal teli ondóhólyagokat. Másik lehetőségként az ondóhólyagok és a prosztata megtisztítása és megmérése a fixálást követően is elvégezhető.

▼M4

41. Ezenkívül nem kötelező jelleggel két további szövet is megmérhető a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül, mielőtt kiszáradna: páros petefészkek (nedves súly), valamint méh, beleértve a méhnyakat (a méhszövet eltávolítása és súlymérésre való előkészítése tekintetében az OECD 440. vizsgálati iránymutatása (18) nyújt útmutatást).

42. A pajzsmirigy súlya (nem kötelező) a fixálást követően is meghatározható. A megtisztítás a szövetkárosodás elkerülése érdekében ez esetben is igen óvatosan, kizárólag a fixálást követően végzendő el. A szövetkárosodás veszélyeztetheti a kórszövettani elemzést.

43. Az alábbi testszöveteket mind a szövet típusa, mind pedig a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok (lásd a 47. fejezetet) szempontjából legmegfelelőbb fixálóközegben kell tartósítani: minden szövet, amelyen makroszkopikus elváltozás figyelhető meg, az agy (jellemző részek, például a nagyagy, a kisagy és a nyúltagyi híd), a gerincvelő, a szem, a gyomor, a vékony- és vastagbél (beleértve a Peyer-plakkot), a máj, a vesék, a mellékvesék, a lép, a szív, a csecsemőmirigy, a pajzsmirigy, a légcső és a tüdők (ezeket először megtöltjük fixálószerrel, és azután merítjük alá), az ivarmirigyek (herék és petefészkek), a járulékos nemi szervek (a méh és a méhnyak, a mellékherék, a prosztata és az ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel együtt), a hüvely, a húgyhólyag, a nyirokcsomók (a legközelebbi elvezető nyirokcsomón kívül egy további nyirokcsomót is ki kell venni a laboratórium tapasztalatainak megfelelően (15)), perifériás idegek (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, harántcsíkolt izom, valamint csont csontvelővel (metszet vagy másik lehetőségként egy friss, csontvelőből felszívott minta formájában). A herék fixálását javasolt Bouin- vagy módosított Davidson-féle fixálószerbe merítéssel végezni (16) (17). A tunica albugineán a fixálószer gyors bejutása érdekében tűvel óvatosan sekély szúrást kell ejteni a szerv mindkét végén. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető.

44. Az alábbi szövetek értékesek lehetnek az endokrin rendszerrel kapcsolatos hatások kimutatása szempontjából: Az ivarmirigyek (herék és petefészkek), a járulékos nemi szervek (a méh, beleértve a méhnyakat, a mellékherék, az ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel együtt, a dorsolateralis és a hasoldali prosztata), a hüvely, az agyalapi mirigy, a hím emlőmirigy, a pajzsmirigy és a mellékvese. A hím emlőmirigyek elváltozásairól nem áll rendelkezésre kellő dokumentáció, azonban ez a paraméter igen érzékeny lehet az ösztrogén hatású anyagokra. A 43. bekezdésben fel nem sorolt szervek, illetve szövetek megfigyelése nem kötelező (lásd a 2. függeléket).

45. A kórszövettani iránymutatás (19) további információkat tartalmaz az endokrin szövetek boncolásával, fixálásával, metszeteinek elkészítésével és kórszövettani vizsgálatával kapcsolatban.

46. A nemzetközi vizsgálati program szolgált némi bizonyítékkal arra, hogy a nemi hormonok homeosztázisára gyakorolt hatás tekintetében kismértékű potenciállal rendelkező vegyi anyagok endokrin rendszerre kifejtett, kevésbé szembetűnő hatásai az ivari ciklus különböző szövetekben végbemenő szinkronizálásának zavarai alapján ismerhetők fel, semmint a női ivarszervek nyilvánvaló kórszövettani elváltozásai alapján. Ugyan e hatásokra nem találtak egyértelmű bizonyítékot, a petefészkek (tüsző-, theca és granulosa sejtek), a méh, a méhnyak és a hüvely kórszövettani eredményeinek értelmezése során javasolt figyelembe venni az ivari ciklus esetleges aszinkronizmusának bizonyítékait. Ha értékeltük, a ciklus hüvelykenet alapján megállapított stádiuma is felhasználható ezen összehasonlítás során.

▼M4

Kórszövettani vizsgálatok

47. A tartósított szerveket és szöveteket mind a kontrollcsoportok, mind a magas dózissal kezelt csoportok összes egyede esetében teljes kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, e vizsgálatot az összes többi, különböző dózissal kezelt csoport egyedeire is ki kell terjeszteni.

48. Minden makroszkopikus elváltozást meg kell vizsgálni.

49. Kísérő csoport használata esetén azon szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatot végezni, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

50. Az adatokat minden egyes állattal kapcsolatban rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy elpusztítás időpontját; a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát, súlyosságát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát.

51. A számszerű eredményeket lehetőség szerint megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A hatás dózistartomány mentén történő összehasonlításaival kiküszöbölhető a több t-próba alkalmazása. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani.

52. A minőség-ellenőrzéshez javasolt múltbeli kontrolladatokat gyűjteni, a számszerű adatokhoz pedig kiszámítani a variációs együtthatót, különösen az endokrin rendszert károsító anyagok kimutatásával összefüggő paraméterek tekintetében. Ezek az adatok felhasználhatók összehasonlítási célokra a tényleges vizsgálatok kiértékelése során.

Vizsgálati jegyzőkönyv

53. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása, ha az nem víz.

Kísérleti állatok:

— használt faj/törzs,

— az állatok száma, kora és neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor,

— patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása.

Vizsgálati körülmények:

— az adagolási szintek kiválasztásának indokai,

— a vizsgált vegyi anyag formulázásával/a takarmány előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,

▼M4

— a vizsgált vegyi anyag beadására vonatkozó adatok,

— átszámítás a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok.

Vizsgált opcionális végpontok

— a vizsgált opcionális végpontok felsorolása.

Eredmények:

— testsúly és annak változásai,

— táplálék- és vízfogyasztásra vonatkozó adatok, ha alkalmazható,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok nemek és adagolási szintek szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások visszafordíthatók-e vagy sem),

— az érzékszervi aktivitás, a szorítási erősség és a motoros aktivitás értékelése,

— hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— az állatok testsúlya az elpusztításkor és a szerveik súlya,

— boncolási eredmények,

— a kórszövettani vizsgálatok összes eredményének részletes ismertetése,

— abszorpciós adatok, ha rendelkezésre állnak,

— adott esetben az eredmények statisztikai feldolgozása.

Az eredmények tárgyalása.

Következtetések.

▼M4

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Androgenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében természetes androgén hormonokhoz (például a tesztoszteronhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Antiandrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes androgén hormonok (például a tesztoszteron) hatását gátolja.

Antiösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonok (például a 17ß-ösztradiol) hatását gátolja.

Antitiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormon (például a T_3) hatását gátolja.

Adagolás: általános fogalom, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Dózis: a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgált vegyi anyag súlyának és a kísérleti állat egységnyi testsúlyának napi hányadosaként (például mg/testsúlykilogramm/nap), vagy a takarmányban lévő állandó koncentrációként fejezik ki.

Nyilvánvaló toxicitás: általános fogalom, amely a toxicitás vizsgált vegyi anyag beadását követően kialakuló egyértelmű tüneteire vonatkozik. E tüneteknek elegendőnek kell lenniük a veszély felméréséhez, továbbá olyan szintet kell képviselniük, amelynél a beadott dózis növelése várhatóan a toxicitás súlyos jeleinek kialakulásához és valószínű elhulláshoz vezet.

NOAEL: a »no-observed-adverse-effect level« (nem észlelhető káros hatásszint) rövidítése. Ez a legmagasabb dózisszint, amelynél még nem figyelhetők meg a kezelés okozta káros hatások.

Ösztrogenitás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes ösztrogén hormonokhoz (például a 17ß-ösztradiolhoz) hasonló hatást fejtsen ki.

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

Tiroid hatás: egy vegyi anyag azon képessége, hogy emlősállatok szervezetében a természetes pajzsmirigyhormonhoz (például a T_3-hoz) hasonló hatást gyakoroljon.

Validáció: tudományos folyamat, amelynek célja egy adott vizsgálati módszer működési követelményeinek és korlátjainak jellemzése, valamint megbízhatóságának és egy adott célhoz kapcsolódó relevanciájának igazolása.

▼M4

2. függelék

Az endokrin rendszert károsító anyagok jelen B.7. Vizsgálati módszerrel történő kimutatásához javasolt végpontok

Kötelező végpontok	Nem kötelező végpontok
Súly	
— herék — mellékherék — mellékvesék — prosztata és az ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel együtt	— petefészkek — méh, beleértve a méhnyakat — pajzsmirigy
Kórszövettani vizsgálatok	
— ivarmirigyek: — herék és — petefészkek — járulékos nemi szervek: — mellékherék, — prosztata és az ondóhólyag a koaguláló mirigyekkel együtt — méh, beleértve a méhnyakat — mellékvese — pajzsmirigy — hüvely	— hüvelykenet — hím emlőmirigyek — agyalapi mirigy
Hormonokkal kapcsolatos mérések	
	— a T3 és a T4 szintje a keringési rendszerben — a TSH szintje a keringési rendszerben

SZAKIRODALOM

(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. AppéldáulPharmacol. 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. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 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 No440: 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. SZUBAKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 28 NAPOS VIZSGÁLAT

ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen felülvizsgált B.8. vizsgálati módszert úgy alakították ki, hogy azzal teljes körűen jellemezhető legyen a rövidebb időn (28 napon) belüli ismételt expozícióval, belégzés útján bejuttatott vizsgált vegyi anyag toxicitása, valamint adatokat lehessen gyűjteni a mennyiségi inhalációs kockázatértékelésekhez. Legalább 5 hím és 5 nőstény rágcsálóból álló csoportokat teszünk ki 28 napon át napi 6 órára a) a vizsgált vegyi anyagnak legalább három koncentrációs szinten, b) szűrt levegőnek (negatív kontroll) és/vagy c) a vivőanyagnak (vivőanyaggal kezelt kontroll). Az állatok expozíciója általában heti 5 napon történik, azonban a hét 7 napján történő expozíció is megengedett. Mindig kell hímeket és nőstényeket is vizsgálni, azonban az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők, amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra. Ez a módszer lehetőséget biztosít a vizsgálatvezetőnek, hogy a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében kísérő (a visszafordíthatóság vizsgálatára alkalmazott) csoportokat, bronchoalveoláris átmosást (BAL), neurológiai vizsgálatokat, valamint további klinikai kórtani és kórszövettani értékeléseket is belefoglaljon a vizsgálatba.

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 412. vizsgálati iránymutatásával (2009). A szubakut inhalációs toxicitásra vonatkozó eredeti 412. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el (1). A jelen B.8. (a felülvizsgált 412. vizsgálati iránymutatással egyenértékű) vizsgálati módszert a tudomány jelenlegi állásának megfelelően, valamint a jelenlegi és jövőbeli szabályozási igények kielégítése érdekében frissítették.

2. Ez a módszer lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagnak 28 napon át belégzés útján történő, naponta ismételt expozíció nyomán kialakuló káros hatások jellemzését. A 28 napos szubakut inhalációs toxicitási vizsgálatok során kapott adatok felhasználhatók mennyiségi kockázatelemzési célokra (ha nem követi azokat 90 napos szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálat [lásd e melléklet B.29. fejezetét]). Ezen adatok információkkal szolgálhatnak továbbá a hosszabb távú vizsgálatok, például a 90 napos szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálat során használandó koncentrációk kiválasztásához is. E vizsgálati módszer nem kifejezetten nanoanyagok vizsgálatára szolgál. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén, valamint a 39. iránymutatásban (2) található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

3. A vizsgálat minőségének fokozása és az állatkísérletek minimalizálása érdekében a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt figyelembe kell vennie a vizsgálandó vegyi anyagról rendelkezésre álló minden információt. A megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztását segítő információk közé tartozhat a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok, valamint az akut inhalációs toxicitási vizsgálatokból származó adatok. Ha a vizsgálat során neurotoxicitás várható vagy figyelhető meg, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy a vizsgálat részeként megfelelő értékeléseket is kell végezni, például funkcionális megfigyelési vizsgálatot (FOB) és a motoros aktivitás mérését. Az expozícióknak az egyes vizsgálatokhoz viszonyított időzítése ugyan kritikus lehet, e kiegészítő tevékenységek azonban nem szabad, hogy akadályozzák az vizsgálat alapvető tervezését.

▼M4

4. A maró vagy irritáló hatású vegyi anyagok vizsgálhatók hígítva, olyan koncentrációban, amellyel elérhető a kívánt mértékű toxicitás (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az állatok ezen anyagoknak való expozíciója során a célkoncentrációknak kellően alacsonynak kell lenniük ahhoz, hogy ne okozzanak jelentős fájdalmat és szorongást, ugyanakkor elegendőnek kell lenniük ahhoz, hogy a koncentráció-hatás görbe kiterjeszthető legyen a vizsgálat szabályozási és tudományos céljának megfelelő szintekre. E koncentrációkat eseti alapon kell kiválasztani, lehetőleg egy megfelelően megtervezett tartománybehatároló vizsgálat alapján, amely információkkal szolgál a kritikus végpontról, az esetleges irritációs küszöbértékről, valamint a hatás kezdetének idejéről (lásd a 11–13. bekezdést). A választott koncentrációt indokolni kell.

5. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani. Az elhullásközeli állapotban lévő állatokat a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatásban (3) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

6. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett rágcsálókat kell alkalmazni. A javasolt faj a patkány. Más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

7. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. A véletlen kiválasztás napján az állatoknak 7–9 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük. A testsúlyuk a nemenkénti átlagos testsúlytól legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen választjuk ki, egyedi azonosítóval látjuk el, és a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartjuk.

Az állatok tartása

8. Az állatokat a megfigyelések megkönnyítése és összetévesztésük elkerülése érdekében egyedi azonosítóval, lehetőleg bőr alatti jeladóval kell ellátni. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használunk. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet (hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

▼M4

Inhalációs kamrák

9. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok összesített „térfogata" nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveivel, valamint azok különös előnyeivel és hátrányaival a 39. iránymutatás (2) foglalkozik.

TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK

Határkoncentrációk

10. Az akut vizsgálatoktól eltérően a 28 napos szubakut inhalációs toxicitási vizsgálatok esetén nincsenek meghatározott határkoncentrációk. A maximális vizsgált koncentráció kiválasztásakor a következőket kell figyelembe venni: 1) az elérhető maximális koncentráció, 2) a legrosszabb esetben fennálló humán expozíció szintje, 3) a megfelelő oxigénellátás biztosításának szükségessége és/vagy 4) állatjóléti szempontok. Amennyiben nincsenek adatokon alapuló határértékek, az 1272/2008/EK rendeletben (13) szereplő akut határértékek alkalmazhatók (azaz aeroszolok esetén legfeljebb 5 mg/l, gőzök esetén 20 mg/l, gázok esetén pedig 20 000 ppm); lásd a 39. iránymutatást (2). Amennyiben gázok vagy erősen illékony anyagok (például hűtőfolyadékok) vizsgálata esetén e határértékeket túl kell lépni, a döntést indokolni kell. A határkoncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

Tartománybehatároló vizsgálat

11. A fő vizsgálat megkezdése előtt tartománybehatároló vizsgálat elvégzése lehet szükséges. A tartománybehatároló vizsgálat átfogóbb a dózisbehatároló vizsgálatnál, mivel nem korlátozódik a koncentráció kiválasztására. A tartománybehatároló vizsgálat révén szerzett információk hozzájárulhatnak a fő vizsgálat sikeréhez. A tartománybehatároló vizsgálat például technikai jellegű információkkal szolgálhat az analitikai módszerek, a részecskeméretezés, a toxikus hatásmechanizmusok felismerése, a klinikai kórtani és kórszövettani adatok, valamint a fő vizsgálat lehetséges NOAEL- és MTC-koncentrációinak becslése vonatkozásában. A vizsgálatvezető a tartománybehatároló vizsgálatot alkalmazhatja a légzőrendszer irritációs küszöbértékének (például a légzőrendszer kórszövettani elemzése, a tüdő működésének vizsgálata vagy bronchoalveoláris átmosás útján történő) meghatározása, az állatoknak indokolatlan stresszt nem okozó, elfogadható maximális koncentráció, valamint a vizsgált vegyi anyag toxicitását legjobban jellemző paraméterek meghatározása céljából.

12. A tartománybehatároló vizsgálat egy vagy több koncentrációszintre is kiterjedhet. Mindegyik koncentrációszintnek legfeljebb három hím és három nőstény tehető ki. A tartománybehatároló vizsgálatnak legalább 5 napig kell tartania, és általában nem tarthat tovább 14 napnál. A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a fő vizsgálathoz kiválasztott koncentrációk indokolását. A fő vizsgálat célja a koncentráció-válasz összefüggésnek a feltételezett legérzékenyebb végpont alapján történő kimutatása. Alsó koncentrációként lehetőleg olyan koncentráció választandó, amelynél nem észlelhető káros hatás, míg a felső koncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

▼M4

13. A tartománybehatároló vizsgálat során alkalmazandó koncentrációszintek kiválasztásakor figyelembe kell venni minden rendelkezésre álló információt, beleértve a szerkezet-aktivitás összefüggéseket és a hasonló vegyi anyagok adatait (lásd a 3. bekezdést). A tartománybehatároló vizsgálat megerősítheti, illetve megcáfolhatja a legérzékenyebbnek vélt mechanisztikai alapú végpontokat, például az organofoszfátok kolineszterázgátló hatását, a vörösvérsejtekre toxikus anyagok okozta methemoglobinképződést, a pajzsmirigyre toxikus anyagok esetén a pajzsmirigyhormonokat (T_3, T_4), a fehérjét, az LDH-t, vagy az ártalmatlan, nehezen oldható részecskék vagy a tüdőt irritáló aeroszolok esetén a bronchoalveoláris átmosási folyadékban lévő neutrofileket.

Fő vizsgálat

14. A fő szubakut toxicitási vizsgálat általában három koncentrációszintre, valamint szükség szerint azokkal párhuzamos negatív (levegővel kezelt) és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollokra terjed ki (lásd a 17. bekezdést). A megfelelő expozíciós szintek kiválasztásának elősegítéséhez fel kell használni minden rendelkezésre álló adatot, beleértve a szisztémás toxicitási vizsgálatok eredményeit, az anyagcserére vonatkozó és kinetikai adatokat (különös hangsúlyt kell fektetni a kinetikai folyamatokat telítő magas koncentrációszintek elkerülésére). Mindegyik vizsgált csoport legalább 10 rágcsálóból (5 hím és 5 nőstény egyedből) áll, amelyeket heti 5 napon napi 6 órára teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak 4 héten keresztül (a vizsgálat teljes időtartama 28 nap). Az állatok heti 7 napon is kitehetők a vizsgált anyagnak (például belélegezhető gyógyszerek vizsgálata esetén). Amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra, az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők a 15. bekezdésben ismertetett koncentráció-válasz összefüggés optimális feltárása érdekében. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. Napi 6 óránál rövidebb expozíciós idő alkalmazása vagy hosszabb időtartamú (például napi 22 órás), egész testfelületen keresztüli expozíciós vizsgálat szükségessége esetén indokolást kell adni (lásd a 39. iránymutatást (2)). Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt, kivéve, ha az időtartam meghaladja a 6 órát. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

15. A célkoncentrációkat úgy kell megválasztani, hogy azonosítható(k) legyen(ek) a célszerv(ek) és egyértelmű koncentráció-válasz összefüggés legyen kimutatható:

— A felső koncentrációszintnek toxikus hatásokat kell előidéznie anélkül, hogy késleltetett tüneteket vagy elhullást okozna, ami kizárná az érdemi értékelést.

— A köztes koncentrációszint(ek)et úgy kell felosztani, hogy a toxikus hatások fokozatosan növekedjenek az alsó és a felső koncentrációszint között.

— Az alsó koncentrációszint nem, vagy csak kis mértékben idézheti elő toxicitás jeleit.

Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat

16. Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat végezhető a toxicitás visszafordíthatóságának, elhúzódó vagy késve fellépő voltának a kezelést követő megfelelő hosszúságú, de legalább 14 napos időszak során történő megfigyelése érdekében. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportok öt hímből és öt nőstényből állnak, amelyeket a fő vizsgálatban megfigyelt kísérleti állatokkal egyidejűleg teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportokat a legnagyobb koncentrációban kell kitenni a vizsgált vegyi anyagnak, és ezzel párhuzamosan szükség szerint levegővel és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollok vizsgálatát is el kell végezni (lásd a 17. bekezdést).

▼M4

Kontrollállatok

17. A párhuzamosan vizsgált negatív (levegővel kezelt) kontrollállatokat a vizsgált csoportokban lévő állatokkal azonos módon kell kezelni, azzal a különbséggel, hogy a vizsgált vegyi anyag helyett szűrt levegőnek tesszük ki azokat. Amennyiben vizet vagy más anyagot használunk a vizsgálati légkör létrehozásának elősegítésére, a vizsgálathoz negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport helyett vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Vivőanyagként lehetőség szerint vizet kell használni. Ha a vivőanyag víz, a kontrollállatokat ugyanolyan relatív páratartalmú levegőnek kell kitenni, mint a vizsgált anyagnak kitett csoportokat. Az alkalmas vivőanyag kiválasztásának megfelelően elvégzett előzetes vizsgálaton vagy múltbeli adatokon kell alapulnia. Ha a vivőanyag toxicitásáról nincsenek részletes információk, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy negatív (levegővel kezelt) és vivőanyaggal kezelt kontrollt egyaránt alkalmazni kell, ez azonban erősen ellenjavallt. Ha a múltbeli adatok alapján a vivőanyag nem toxikus, nincs szükség negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoportra, és ez esetben csak vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Amennyiben a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag az előzetes vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, és ezt a vivőanyagkontrollt kell használni.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

18. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációtól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a részecskeméret csökkentése érdekében. További útmutatás a 39. iránymutatásban (2) olvasható.

Részecskeméret-eloszlás

19. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 3 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (4). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek lehetnek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék és a rostok meghaladhatják azt.

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

20. A vizsgált vegyi anyag ideális esetben vivőanyag nélkül vizsgálandó. Ha a vizsgált vegyi anyag megfelelő koncentrációjának és részecskeméretének előállításához vivőanyag alkalmazása szükséges, a víz részesítendő előnyben. Ha a vizsgált vegyi anyagot vivőanyagban oldjuk fel, minden esetben igazolni kell annak stabilitását.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

21. Az expozíciós kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy időbeli stabilitás) valós idejű nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt valamennyi lényeges dinamikus inhalációs paraméter szabályozására. A koncentráció valós idejű nyomon követése esetén a légáramlásokat elegendő expozíciónként és naponként egy alkalommal mérni. Különös figyelmet kell fordítani a csak

▼M4

orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére. Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben feltételezhető, hogy ez a szabvány nem teljesíthető, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell. Ha az expozíció első napján végzett mérések azt mutatják, hogy e gázok szintje megfelelő, rendszerint nincs szükség további mérésekre.

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

22. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt folyamatosan nyomon kell követni, és lehetőség szerint minden expozíció során óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat lehetőség szerint 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

23. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk az inhalációs kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

24. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában végzett mintavétellel megállapított koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció vagy specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű, por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű, por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát.

25. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni a vizsgálat teljes időtartama alatt, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel, illetve más becslésekkel meghatározott molekulatömeg. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) megerősíteni a megbízó által adott jellemzést.

▼M4

26. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani. Az expozíciós körülmények stabilitásának bizonyítására valós idejű nyomonkövetési eszköz – például aeroszolok esetén aeroszolfotométer, vagy gőzök esetén az összes szénhidrogéntartalmat elemző műszer – alkalmazható. A kamrabeli tényleges koncentrációt minden expozíciós napon minden expozíciós szint tekintetében legalább háromszor meg kell mérni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, expozíciós időszakonként egy mintavétel is elfogadható. Ideális esetben ezt a mintavételt a teljes expozíciós időszak folyamán kell elvégezni. Az egyes kamrakoncentráció-minták gázok és gőzök esetén legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy szilárd aeroszolok esetén pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el a kamrabeli átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és jegyzőkönyvezni kell. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét. Ehhez figyelembe kell venni a kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez és a bomláshoz szükséges időt (t_{95}). A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

27. A nagyon összetett, gázokból/gőzökből és aeroszolokból álló keverékek (például égési légkörök, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában. Éppen ezért mindegyik fázishoz (gáz/gőz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a teljes keverék, nem pedig csak az aktív összetevő vagy az indikátoranyag (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (2).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

28. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik koncentrációszint tekintetében legalább hetente meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó (APS) segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható.

29. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázbuborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának megerősítése érdekében. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (2)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában vizsgált összes koncentrációnál bizonyítható az egyezés, a további megerősítő mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni a vizsgálat eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében.

30. Gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában.

MEGFIGYELÉSEK

31. Az állatokat expozíciós időtartam előtt, alatt és után klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az állatok expozíció során megfigyelt reakciójától függően gyakoribb megfigyelések is kilátásba helyezhetők. Ha az állatok megfigyelését az azok lefogására szolgáló csövek használata, az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra rossz megvilágítása vagy az átlátszatlan légkör akadályozza, az állatokat az expozíció után alapos megfigyelésnek kell alávetni. A következő napi expozíció előtt végzett megfigyelésekkel felmérhető a toxikus hatások visszafordíthatósága vagy súlyosbodása.

▼M4

32. Minden megfigyelést rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

33. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, a légző-, keringési és idegrendszer, valamint a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára. A vizsgálati protokollba további értékelések is felvehetők, ilyenek például a kinetikai vizsgálatok, a biomonitoring, a tüdőműködés vizsgálata, a tüdőszövetben felgyülemlő, rosszul oldható anyagok visszamaradásának vizsgálata, valamint a viselkedésbeli változások megfigyelése.

TESTSÚLY

34. Az egyes állatok súlyát röviddel az első expozíció (0. nap) előtt, azt követően pedig hetente kétszer (például az expozíció nélküli hétvégén végbement felépülés bizonyítása céljából pénteken és hétfőn, vagy a szisztémás toxicitás felmérését lehetővé tevő időközönként), valamint az elhullás vagy elpusztítás időpontjában fel kell jegyezni. Amennyiben az első 2 héten semmilyen hatás nem figyelhető meg, a vizsgálat hátralevő részében a testsúly heti rendszerességgel is mérhető. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálatban alkalmazott állatok (ha vannak) súlyának heti rendszerességgel végzett mérését a felépülési időszak során is folytatni kell. A vizsgálat lezárásakor minden állat súlyát meg kell mérni röviddel az elpusztítás előtt, hogy torzításmentesen kiszámítható legyen a szervek súlyának testsúlyhoz viszonyított aránya.

TÁPLÁLÉK- ÉS VÍZFOGYASZTÁS

35. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. A felvett víz mennyisége szintén mérhető.

KLINIKAI PATOLÓGIA

36. Minden állaton – beleértve a kontroll- és kísérő (visszafordíthatósági) csoportokba tartozókat – klinikai patológiai értékelést kell végezni az elpusztításkor. Az expozíció vége és a vérvétel között eltelt időt fel kell jegyezni, különösen ha az adott végpontra gyors regeneráció jellemző. A rövid plazmabeli felezési idejű paramétereknél (például COHb, CHE és MetHb) az expozíció végét követően végzendő mintavétel.

37. A minden toxikológiai vizsgálathoz általánosan előírt klinikai patológiai paraméterek felsorolása az 1. táblázatban található. Rendszeres vizeletelemzés nem kötelező, de elvégezhető, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás alapján célszerűnek ítéljük. A vizsgálatvezető a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében további paraméterek értékelése mellett dönthet (például kolineszteráz, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin vagy Heinz-testek, kreatin-kináz, csontvelő/eritroid arány, troponinok, artériás vérgáz, laktát-dehidrogenáz, szorbit-dehidrogenáz, glutamát-dehidrogenáz és gamma-glutamil-transzpeptidáz).

▼M4

1. táblázat

Szabványos klinikai patológiai paraméterek

Hematológiai paraméterek	
vörösvértestszám	teljes vérkép
hematokrit	differenciált vérkép
hemoglobinkoncentráció	trombocitaszám
átlagos korpuszkuláris hemoglobin	véralvadási képesség (a következők egyikét kell választani):
átlagos korpuszkuláris térfogat	— prothrombin idő
átlagos korpuszkuláris hemoglobin-koncentráció	— véralvadási idő
retikulociták	— részleges prothrombin idő

Klinikai kémiai paraméterek	
glükóz (*)	alanin-aminotranszferáz
összes koleszterin	aszpartát-aminotranszferáz
trigliceridek	alkáli foszfatáz
a vérben lévő karbamid-nitrogén	kálium
összes bilirubin	nátrium
kreatinin	kalcium
összes fehérje	foszfor
albumin	klorid
globulin	

Vizeletelemzés (nem kötelező)	
megjelenés (szín és zavarosság)	összes fehérje
térfogat	glükóz
fajsúly vagy ozmolaitás	vér/vérsejtek
pH	

(*) Mivel a hosszas koplaltatás torzíthatja a kezelt állatok glükózszintjének a kontrollállatokéhoz viszonyítva mért értékét, a vizsgálatvezetőnek döntenie kell, hogy célszerű-e az állatokat koplaltatni. Koplaltatási idő alkalmazása esetén annak a vizsgált fajhoz kell igazodnia, patkány esetén például 16 óra lehet (éjszakai koplaltatás). A koplaltatás mellett mérhető glükózszint meghatározása az utolsó expozíciós héten történő éjszakai koplaltatás után, vagy a boncolás előtti éjszakai koplaltatás után végezhető el (utóbbi esetben az összes többi klinikai patológiai paraméterrel együtt kell meghatározni).

38. Amennyiben arra utaló bizonyítékot találunk, hogy az alsó légutak (azaz az alveolusok) jelentik a lerakódás és a visszamaradás elsődleges helyét, a bronchoalveoláris átmosás (BAL) lehet a legalkalmasabb technika a hipotézisen alapuló dózis-hatás paraméterek alveolitiszre, tüdőgyulladásra és foszfolipidózisra összpontosító mennyiségi elemzéséhez. Ez lehetővé teszi az alveolusok károsodása dózis-válasz és idő-lefolyás típusú változásainak megfelelő vizsgálatát. A BAL eljárás útján nyert folyadék elemezhető teljes és differenciált vérkép, összes fehérje, valamint laktát-dehidrogenáz tekintetében. Figyelembe vehetők továbbá egyéb, lizoszómakárosodásra, foszfolipidózisra, fibrózisra, valamint irritáció okozta vagy allergiás gyulladásra utaló paraméterek is, ami magában foglalhatja a gyulladást serkentő citokinek/kemokinek meghatározását. A BAL-mérések általában kiegészítik a kórszövettani vizsgálatok eredményeit, azonban nem helyettesíthetik azokat. A tüdőátmosás elvégzéséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

▼M4

MAKROSZKOPIKUS PATOLÓGIA ÉS A SZERVEK SÚLYA

39. Minden kísérleti állaton teljes kivéreztetést és (ha lehetséges) makroszkopikus boncolást kell végezni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett távolítani a vizsgálatból. Minden egyes állatnál fel kell jegyezni az utolsó expozíció és az elpusztítás között eltelt időt. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevettük, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

40. A makroszkopikus boncolás során kórszövettani vizsgálat céljából megfelelő közegben megőrizendő szervek és szövetek felsorolása a 2. táblázatban található. A [szögletes zárójelben] feltüntetett szervek és szövetek, valamint bármely egyéb szerv és szövet megőrzéséről a vizsgálatvezető saját mérlegelése alapján dönthet. A **félkövérrel** szedett szerveket a kiszáradás elkerülése érdekében a boncolás után a lehető legrövidebb időn belül meg kell tisztítani, és azok nedves súlyát meg kell mérni. A pajzsmirigy és a mellékherék súlyát csak akkor javasolt megmérni, ha szükséges, mivel az azok megtisztítása során keletkező mesterséges elváltozások akadályozhatják a kórszövettani értékelést. A szöveteket és a szerveket közvetlenül a boncolás után, és az alkalmazandó fixálószertől függően legalább 24–48 órával a megtisztítás előtt 10 %-os pufferelt formalinban vagy egyéb, megfelelő fixálószerben fixálni kell.

2. táblázat

A makroszkopikus boncolás során megőrizendő szervek és szövetek

Mellékvesék	Ondóhólyagok
Csontvelő (és/vagy friss felszívott minta)	Gerincoszlop (nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)
Agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	**Lép**
[Szemek (retina, látóideg) és szemhéjak]	Gyomor
Szív	**Herék**
Vesék	**Csecsemőmirigy**
Gégefő (3 szinten, amelyek egyikének tartalmaznia kell a gégefedő alapját)	Pajzsmirigy
Máj	Légcső (legalább 2 szinten, beleértve egy hosszirányú metszetet a carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet)
Tüdő (egy szinten készített metszet mindegyik lebenyről, beleértve a fő hörgőket)	[Húgyhólyag]
Nyirokcsomók a tüdő hilusok körüli részéről, különösen nehezen oldható, szemcsés vizsgált vegyi anyagok esetén. Alaposabb vizsgálatok és/vagy immunológiára összpontosító tanulmányok esetében további nyirokcsomók megőrzése is megfontolható, például a gátori, nyaki/állkapocs alatti és/vagy fülcse körüli részekről.	Méh
	Minden makroszkopikus elváltozás
Orr-garati szövetek (legalább 4 szinten, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát és az orrhoz társuló nyirokszövetet [NALT])	
Nyelőcső	
[Szaglógumó]	
Petefészkek	

▼M4

41. A tüdőt sértetlenül kell eltávolítani, le kell mérni, és a tüdő szerkezetének megőrzése érdekében megfelelő fixálószert kell belecsepegtetni 20-30 cm víznek megfelelő nyomáson (5). Mindegyik lebenyről metszetet kell készíteni egy szinten, beleértve a fő hörgőket, ugyanakkor tüdőátmosás alkalmazása esetén az át nem mosott lebenyről három szinten kell metszetet készíteni (nem sorozatos metszeteket).

42. Az orr-garati szöveteket legalább 4 szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát (5, 6, 7, 8, 9), lehetővé téve a laphámsejtes, átmeneti (csillószőrrel nem borított légúti), légúti (csillószőrrel borított) és szaglóhámszövet, valamint az elvezető nyirokszövet (NALT, 10, 11) megfelelő vizsgálatát. A gégefőt három szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell a gégefedő alapját (12). A légcsövet legalább két szinten kell vizsgálni, beleértve egy hosszirányú metszetet az extrapulmonális hörgők elágazásánál lévő carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet.

KÓRSZÖVETTANI VIZSGÁLATOK

43. A 2. táblázatban felsorolt összes szerv és szövet kórszövettani vizsgálatát el kell végezni a kontrollcsoportoknál és a magas koncentrációnak kitett csoportoknál, valamint a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított összes állatnál. Különös figyelmet kell fordítani a légzőrendszerre, a célszervekre, valamint a makroszkopikus elváltozásokra. Azon szerveket és szöveteket, amelyeken a magas koncentrációnak kitett csoportnál elváltozások figyelhetők meg, mindegyik csoportnál meg kell vizsgálni. A vizsgálatvezető a koncentráció-válasz összefüggés egyértelmű kimutatása érdekében dönthet úgy, hogy további csoportoknál is végezni kell kórszövettani értékelést. Kísérő (visszafordíthatóság vizsgálatára szolgáló) csoport alkalmazása esetén minden olyan szerv és szövet kórszövettani értékelését el kell végezni, amelynél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozások figyelhetők meg. Ha a magas koncentrációnak kitett csoportnál túlzott mértékű idő előtti elhullás vagy egyéb problémák veszélyeztetik az adatok szignifikanciáját, az eggyel alacsonyabb koncentrációra vonatkozóan kell kórszövettani vizsgálatot végezni. Meg kell kísérelni a makroszkopikus és mikroszkopikus megfigyelések közötti összefüggések feltárását.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

44. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyára, táplálékfelvételére, klinikai patológiai eredményeire, makroszkopikus boncolási eredményeire, szerveinek súlyára, valamint kórszövettani eredményeire vonatkozó adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit. Mind a számszerű, mind a járulékos eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni. Bármilyen általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazható, és a statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell kiválasztani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

45. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— A ketrecben való tartás körülményei, beleértve különösen az állatok ketrecenkénti számát (vagy számának változását), az alom anyagát, a környezeti hőmérsékletet és a relatív páratartalmat, a megvilágítás időtartamát, valamint a takarmány meghatározását.

▼M4

— A vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása. Forrás és múltbéli adatok is megadhatók, amennyiben azokat hasonló expozíciós, tartási és koplaltatási körülményeknek kitett állatokon gyűjtötték.

— Az állatok száma, kora és neme.

— A véletlen kiválasztás módszere.

— A vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányozást, a karantént és a betegségek kezelését.

Vizsgált vegyi anyag

— Fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt).

— Azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

Vivőanyag

— A vivőanyag használatának, valamint megválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz).

— Múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét.

Inhalációs kamra

— Az inhalációs kamra részletes leírása, beleértve annak térfogatát és vázlatrajzát is.

— Az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása.

— A hőmérséklet, a páratartalom, a részecskeméret és a tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések.

— A levegő forrása és a kondicionáló rendszer.

— Az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek.

— Nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív).

— Expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a kamrában (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— A vizsgálati légkör stabilitása.

— A hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában.

— A bevitt/elszívott levegő kezelése.

— Légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— Az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t95).

— A térfogatváltozások óránkénti száma.

— Mérőberendezések (ha vannak).

Expozíciós adatok

— A fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása.

▼M4

— Névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával).

— A vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő keverékek esetén mindegyik külön elemezhető.

— Minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (mg/l, mg/m^3 stb.), nem pedig térfogategységekben (ppm, ppb stb.) kell megadni.

— Részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σ_g), beleértve kiszámításuk módját is. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket.

Vizsgálati körülmények

— A vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak elkészítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit is.

— A vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való expozíciójára alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal).

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás megfigyelésére használt berendezések részletei (kalibrációs görbe meghatározása).

— A kamrabeli koncentráció és részecskeméret-eloszlás meghatározásához alkalmazott minták gyűjtésére használt berendezések részletei.

— Az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát is).

— Az állatok vizsgálati és kontrollcsoportokba való besorolásához alkalmazott véletlen kiválasztási módszer.

— A táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete).

— A vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása.

Eredmények

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás értékeinek táblázatos összefoglalása.

— A kamrabeli névleges és tényleges koncentráció adatainak táblázatos összefoglalása.

— Részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait is.

— A válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra (azaz a mérgezési tüneteket mutató és köztük az elhullt állatokra) vonatkozóan (ideértve a hatások jellegét, súlyosságát, megjelenésének időpontját és időtartamát is).

▼M4

— Az egyes állatok súlyának táblázatos összefoglalása.

— A táplálékfelvétel táblázatos összefoglalása.

— A klinikai patológiai adatok táblázatos összefoglalása.

— A boncolások és, ha rendelkezésre állnak, a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

— Minden egyéb mért paraméter táblázatos összefoglalása.

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— Különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszerben – például a határkoncentráció vagy a részecskeméret kapcsán – előírt feltételeknek való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására.

— Ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltételek nem teljesültek.

— A vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek következetességét, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést.

— Ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi).

— Magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (3) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat.

— Meg kell jelölni a célszerve(ke)t.

— Meg kell határozni a NOAEL és a LOAEL értékét.

SZAKIRODALOM

(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, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appéldául 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. In: Waalkes MP and 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) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼B

B.9. **ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAPOS) TOXICITÁS (DERMÁLIS)**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (A).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét (B).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta adagolják a bőrre, fokozatosan növekvő dózisokban több kísérleti állatcsoportnak, 28 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a toxicitás tüneteinek észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult állatokat és a vizsgálat végéig életben maradó állatokat is fel kell boncolni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Előkészületek**

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napig a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell osztani. A vizsgálat megkezdése előtt nem sokkal le kell nyírni a szőrt a törzs háti oldaláról. Borotválni is lehet, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A vizsgálat során általában ismételt nyírás és borotválás szükséges, rendszerint heti időközönként. A nyírás vagy borotválás során gondosan ügyelni kell arra, hogy a bőr ne sérüljön meg. A testfelület legalább 10 %-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Az állat súlyát is tekintetbe kell venni, amikor a lecsupaszítandó felületről, illetve a kezelt felület nagyságáról döntenek. Ha szilárd anyagot vizsgálnak, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy az minél jobban tapadjon a bőrhöz. A folyékony vizsgált anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni. Az adagolás heti öt-hét alkalommal történik.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. *A kísérlethez használt állatok*

Kifejlett patkány, nyúl vagy tengerimalac használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni.

▼B

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan, az átlagértéktől maximum ± 20 %-kal térhet el.

1.6.2.2. *Az állatok száma és neme*

Minden adagolási szinthez legalább 10 egészséges bőrű állatot (öt hímet és öt nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékoznak pusztítani. Ezenkívül még egy 10 fős (nemenként öt állat) kísérő állatcsoportot is kezelhetnek a legnagyobb adaggal 28 napon át a toxikus hatás visszafordíthatóságának, elhúzódó vagy késve fellépő voltának megfigyelésére 14 nappal a kezelés után. 10 kontrollállatból (nemenként öt állat) álló kísérő csoportot is használni kell.

1.6.2.3. *Dózisok*

Legalább három dózist és egy kontrollt kell használni, illetve egy vivőanyag-kontrollt, ha van vivőanyag. Az expozíciós idő legalább napi hat óra legyen. A vizsgált anyagot minden nap hasonló időpontban kell alkalmazni, az alkalmazott mennyiséget pedig meghatározott időközönként (hetente vagy hetente kétszer) hozzá kell igazítani az állatok növekedéséhez, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal kezelni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb dózist úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására az azzal kezelt csoportban jelentkezzenek a toxicitás jelei, de elhullás lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben jelentkezzen. A legkisebb adagot úgy kell kiválasztani, hogy az ne okozzon toxikus tüneteket. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmaznak, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózissal kezelt csopotokban, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyag alkalmazása súlyos bőrirritációt okoz, a koncentrációt csökkenteni kell, ami az egyéb toxikus hatások mértékének csökkenésével vagy eltűnésével járhat a legnagyobb adaggal kezelt csoportban. Ha a bőr súlyosan károsodott, szükségessé válhat a vizsgálat leállítása és egy új vizsgálat megkezdése kisebb koncentrációk mellett.

1.6.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha az előzetes vizsgálat során napi 1 000 mg/testsúlykilogrammal adagolt vizsgált anyag vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózis semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők.

1.6.2.5. *Megfigyelési időszak*

Az összes állatot meg kell vizsgálni naponta a toxikus hatások megjelenésének észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját, valamint azt az időpontot, amikor a toxikus hatás jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

▼B

1.6.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 28 napon keresztül. A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 14 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. Az expozíció időtartama napi hat óra.

A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10 %-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

Az expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel porózus gézkötéssel és nem irritáló ragtapasszal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni, azért, hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt. Alternatív megoldás lehet az ún. nyakörv védelmi eszköz használata.

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

Az összes állatot meg kell vizsgálni naponta, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A megfigyelésnek ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légző-, keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszer, valamint a szomatomotoros tevékenység és viselkedési minta változásaira. Hetente mérni kell az állatok súlyát. Ajánlott a takarmányfogyasztást is hetente mérni. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A súlyos és tartós betegség, illetve fájdalom jeleit mutató állatokat el kell távolítani, kíméletes módon leölni, és felboncolni.

A következő vizsgálatokat kell végrehajtani a vizsgálat végén minden állaton, a kontrollállatokat is ideértve:

1) vérkép, amely magában foglalja legalább a hematokrit-értéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a teljes és a fehérvérsejtszámot, a minőségi vérképet, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt;

2) a vér klinikai-kémiai vizsgálata, amely magában foglalja a máj- és vesefunkció legalább egy paraméterét: szérum alanin-aminotranszferáz (korábban glutamát-piruvát- transzaminázként volt ismert), szérum aszpartát-aminotranszferáz (korábban glutamát-oxálecetsav-transzaminázként volt ismert), karbamid-nitrogén, az albumin, a kreatinin, az össz-bilirubin és szérum összfehérjeszintjének mérését.

További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: kalcium-, foszfor-, klorid-, nátrium-, káliumszint, éhgyomorra mért glükózszint, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin és a kolineszterázaktivitás.

▼B

Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

1.6.4. **Autopszia**

A vizsgálatban részt vett minden állatot teljes boncolásnak kell alávetni. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb, még nedvesen le kell mérni a kiszáradás elkerülése miatt. A szerveket és szöveteket (máj, vese, lép, herék, mellékvesék, szív és minden jelentős sérülést vagy méretváltozást mutató szerv) alkalmas közegben fixálni kell az esetleges jövőbeni kórszövettani vizsgálathoz.

1.6.5. **Kórszövettani vizsgálat**

A nagy adaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportban szövettani vizsgálatot kell végrehajtani a tartósított szerveken és szöveteken. Azon szerveket és szöveteket, amelyek a legnagyobb dózisnál vizsgált anyagnak tulajdonítható károsodásokat mutatnak, minden alacsonyabb dózissal kezelt csoportban meg kell vizsgálni. Minden, a kísérő csoportba tartozó állatnál szövettani vizsgálatot kell végezni, külön hangsúlyt helyezve azon szervekre és szövetekre, amelyekről megállapítást nyert, hogy más kezelt csoportokban toxikus hatásokat mutatnak.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva az állatok számát a vizsgálat kezdetén és az egyes sérüléstípusokat mutató állatok számát.

Minden megfigyelt eredményt megfelelő statisztikai módszerrel ki kell értékelni. Bármilyen elismert statisztikai módszer használható.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a használt fajt, törzset, az állatok származását, a tartási körülményeket, az étrendet,

— a vizsgálati körülményeket (ideértve a kötszer típusát is: zárt vagy nem zárt),

— az adagolást (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és a koncentrációkat,

— azt a szintet, amikor még nincs toxikus hatás (NEL),

— toxikus reakcióra vonatkozó adatokat, nemek és adagolás szerinti csoportosításban,

— az elpusztulás idejét a vizsgálat során, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

— a toxikus és más hatások leírását,

— az egyes toxikus tünetek megfigyelésének időpontját és a megfigyelést követő változásukat,

— a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatokat,

— az elvégzett hematológiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét,

▼B

— az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatokat és azok valamennyi eredményét (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),

— a boncolási leleteket,

— a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetését,

— az eredmények statisztikai feldolgozását, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatását,

— az eredmények értelmezését.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét (D).

4. **SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét (E).

▼B

B.10. MUTAGENITÁS – KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VITRO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 473-nak, kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálata emlősökön (1997).

1.1. BEVEZETÉS

Az *in vitro* kromoszóma-rendellenesség vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket okoznak tenyésztett emlősállatsejtekben (1), (2), (3). A szerkezeti rendellenességek kétféle típusúak lehetnek, kromoszóma vagy kromatid. A mutációt előidéző kémiai anyagok többsége esetében az előidézett rendellenességek kromatid típusúak, de kromoszóma típusúak is előfordulnak. A poliploida gyakoriságának növekedése azt jelentheti, hogy valamely kémiai anyag potenciálisan előidézhet számszerű rendellenességeket. Azonban e módszert nem számszerű rendellenességek mérésére tervezték, és rendesen nem is erre a célra használják. A kromoszómamutációk és ehhez hasonló folyamatok számos emberi genetikai betegség okozói, bizonyítékok szólnak amellett, hogy a kromoszómamutáció és az ehhez hasonló folyamatok, amelyek változásokat okoznak az onkogénekben és a tumor szuppresszor génekben, szerepet játszanak a rák előidézésében emberekben és kísérleti állatokban.

A kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálata megállapodott sejtvonalakon, sejttörzseken vagy primer sejtkultúrákon végezhető. A vizsgálathoz használt sejteket a tenyészetben a növekedési képesség, a kariotípus stabilitása, a kromoszómaszám, kromoszómák alaki változatossága és a kromoszóma-rendellenességek spontán gyakorisága alapján kell kiválasztani.

Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint szükségessé teszik a metabolikus aktiválás valamilyen külső forrásának használatát. Ezen metabolikus aktiváló rendszer nem tudja teljesen utánozni az emlősállatokban *in vivo* meglévő körülményeket. Körültekintően kell eljárni, el kell kerülni azon körülményeket, amelyek olyan pozitív eredményekhez vezethetnének, amelyek nem tükrözik a belső mutagenitást, és a pH-érték, ill. ozmolalitás változásából vagy a magas citotoxicitási szintből származhatnak (4) (5).

E vizsgálatot azon anyagok szűrésére lehet használni, amelyek mutációt idézhetnek elő (potenciális mutagének) és rákot okozhatnak (karcinogének) emlősállatok esetében. Az e vizsgálatban pozitív eredményt adó számos vegyület emlősállatok esetében rákkeltő vegyület; azonban nincs tökéletes korreláció az itt ismertetett vizsgálat és a karciogenitás között. A korreláció függ a vizsgált anyag kémiai osztályától és egyre több bizonyíték van arra, hogy léteznek olyan rákkeltő anyagok, amelyeket e vizsgálat nem észlel, mivel úgy tűnik, hogy ezek nem a közvetlen DNS-károsító hatás révén, hanem más mechanizmussal fejtik ki a hatásukat.

Lásd még az Általános bevezetés B részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Kromatid típusú rendellenesség: szerkezeti kromoszómakárosodás, amely egy kromatid törésében vagy kromatidok közötti törésben és újraegyesítésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

▼B

Endoreduplikáció: az a folyamat, amely során valamely DNS-replikációt követően a sejtmag nem lép be a mitózis fázisába, hanem egy másik S fázist indít. Az eredmény 4, 8, 16, … kromatiddal rendelkező kromoszómák.

Gap: egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus sérülés.

Mitotikus index: a metafázisban lévő sejtek és a sejtpopuláció összes sejtjének aránya; e populáció proliferációja mértékének jelzése.

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált sejteket jellemző normál számértéktől.

Poliploida: a haploid kromoszómaszám (n) egész számú, de nem diploid (azaz 3n, 4n, és így tovább) megsokszorosódása.

Szerkezeti rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében, mint a delíciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződés.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Sejttenyészeteket kezelnek a vizsgált anyaggal mind metabolikus aktiválóval, mind anélkül. Meghatározott időközönként metafázis blokkoló szerrel (például Colcemid® vagy kolchicin) kezelik a sejteket, majd az összegyűjtött, megfestett és metafázisban lévő sejteket mikroszkóp segítségével elemezni kell, azért hogy a kromoszóma-rendellenességet megvizsgáljuk.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *Sejtek*

Különféle törzsek, sejtvonalak vagy primer sejttenyészetek, emberi sejteket is ideértve, használhatók (például kínai hörcsög fibroblasztok, ember vagy más emlős perifériás limfociták).

1.4.1.2. *Tápfolyadékok és tenyésztési körülmények*

Megfelelő tápfolyadékokat és inkubációs feltételeket (tenyésztő edények, CO_2-koncentráció, hőmérséklet és páratartalom) kell alkalmazni a tenyészetek fenntartására. A megállapodott sejtvonalaknál és -törzseknél rendszeresen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitását és a mycoplazma fertőzöttségét, nem szabad a mycoplazmát használni, ha fertőzött. Ismerni kell a kiválasztott sejtek normális sejtciklus időtartamát az adott inkubációs feltételek mellett.

1.4.1.3. *A tenyészetek előkészítése*

Megállapodott sejtvonalak és -törzsek: a sejteket törzstenyészetekből fel kell szaporítani, majd leültetni tápfolyadékba olyan sejtszámmal, hogy a tenyészetek ne érjék el a konfluens állapotot az összegyűjtés ideje előtt, és ezeket 37 °C hőmérsékleten inkubálni kell.

▼B

Limfociták: alvadásgátlóval (például heparin) kezelt teljes vért vagy egészséges donoroktól nyert szeparált limfocitákat adnak hozzá mitogéntartalmú táptalajhoz (például phytohaemagglutinin), és 37 °C hőmérsékleten inkubálják.

1.4.1.4. *Metabolikus aktiválás*

A sejteket exponálni kell a vizsgált anyaggal mind egy megfelelő metabolikus aktiválóval, mind anélkül. A legáltalánosabban használt rendszer a rágcsálóknak enziminducerrel (ilyen például az Aroclor 1254 (6), (7), (8), (9) vagy fenobarbiturát és ß-naftoflavon kombinációjával (10), (11), (12)) kezelt májából elkészített, kofaktor-kiegészítésű posztmitokondriális frakció (S9).

A posztmitokondriális frakciót rendszerint 1–10 térfogatszázalék tartományba eső koncentrációkban kell használni a végtérfogatban. Valamely metabolikus aktiváló rendszer állapota függhet a vizsgált kémiai anyag osztályától. Néhány esetben célszerű a posztmitokondriális frakció egynél több koncentrációjának használata.

Számos fejlesztés, ideértve a specifikus aktiváló enzimeket tartalmazó genetikailag módosított sejtvonalak létrehozását is, biztosíthatja az endogénaktiválás lehetőségét. A használt sejtvonalak kiválasztását tudományosan indokolni kell (például a vizsgált anyag anyagcseréjéhez a citokrom P450-es izoenzim alkalmazásának relevanciáját).

1.4.1.5. *Vizsgált anyag/előkészület*

A szilárd vizsgált anyagokat a sejtek kezelése előtt fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben és hígítani kell, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgálati rendszerekhez és/vagy hígíthatók kezelés előtt. A vizsgált anyagból friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát bizonyítják.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/Vivőanyag*

Az oldószernek/vivőanyagnak nem szabad olyan anyagnak lennie, amelyről feltehető, hogy kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal, és nem befolyásolhatja a sejtek túlélését és az S9-es aktivitást. Jól ismert oldószerektől/vivőanyagoktól eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző adatokkal. Ahol csak lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni. Vízben instabil anyagok vizsgálatakor a használt szerves oldószereknek vízmenteseknek kell lenniük. A víz molekuláris szűrő segítségével távolítható el.

1.4.2.2. *Expozíciós koncentráció*

A legnagyobb koncentráció meghatározásakor figyelembe veendő kritériumok többek között a citotoxicitás, oldhatóság a vizsgálati rendszerben és pH-érték, ill. az ozmolalitás változásai.

A citotoxicitást a fő kísérletben metabolikus aktiválással és anélkül kell meghatározni a sejtintegritás és szaporodás megfelelő mutatóit használva; ilyenek például a konfluencia mértéke, életképes sejtek száma vagy a mitotikus index. Hasznosnak bizonyul, ha a citotoxitást és oldhatóságot előzetes kísérletben meghatározzuk.

▼B

Legalább három elemezhető koncentrációt kell használni. Ha az anyag citotoxikus, e koncentrációknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt; ez rendszerint azt jelenti, hogy a koncentrációk nem több, mint 2 és √10 közötti tényezővel különböznek egymástól. A sejtek begyűjtéskor a legnagyobb koncentrációnak jelentős csökkenést kell mutatnia a konfluencia mértékében, a sejtszámban vagy mitiotikus indexben (mindegyik nagyobb, mint 50 %). A mitiotikus index a citotoxikus/citosztatikus hatásokat csak közvetett módon jelzi, és függ attól, hogy a kezelés után mennyi idő telt el. Azonban a mitiotikus index elfogadható olyan szuszpenziós kultúráknál, amelyekben a toxicitásmérések nagyon körülményesek és gyakorlatilag megvalósíthatatlanok lehetnek. A sejtciklus kinetikára vonatkozó információk, ilyen például az átlagos generációs idő (average generation time, AGT), kiegészítő információkként használhatók. Azonban az AGT általános átlag, amely nem mindig fedi fel a megkésett szubpopulációk létezését, és még a kismértékű átlagos generációsidő-növekedés is nagyon jelentős késedelmet okozhat a rendellenességek optimális kimutatásának idejében.

A relatíve nem citotoxikus anyagok esetében a maximális vizsgált koncentrációnak 5 µl/ml-nek, 5 mg/ml-nek vagy 0,01 M-nek kell lennie, attól függően, hogy ezen értékek közül melyik a legalacsonyabb.

A relatíve rosszul oldódó anyagok esetében, amelyek a nem oldódó koncentrációnál alacsonyabb koncentrációkban nem toxikusak, a legnagyobb használt adagnak a kezelési időszak végén a végleges médiumban az oldékonyság határa fölötti koncentrációban kell lennie. Néhány esetben (például amikor a toxicitás csak a legalacsonyabb nem oldódó koncentrációnál magasabb koncentrációban jön létre) ajánlatos a vizsgálatot egynél több, látható csapadékot képező koncentrációval végrehajtani. Hasznosnak bizonyulhat az oldékonyságot a kezelés elején és végén meghatározni, mivel az változhat a vizsgálati rendszerben az expozíció időtartama során a sejtek, S9-es szérum stb. jelenléte miatt. A kicsapódás szabad szemmel észlelhető. A kicsapódásnak nem szabad befolyásolnia az értékelést.

1.4.2.3. *Negatív és pozitív kontrollok*

Minden egyes kísérletben egyidejűleg negatív és pozitív (oldószer és vivőanyag) kontrollt használunk, mindkettőt metabolikus aktiválással és anélkül is. Metabolikus aktiváló alkalmazásakor a pozitív kontrollanyagnak olyannak kell lennie, amely a mutagén reakció kiváltásához aktiválást igényel.

Pozitív kontrollanyagnak ismert klasztogént kell alkalmazni expozíciókoncentrációban annak érdekében, hogy reprodukálható és észlelhető növekedést okozzon (a háttérhez képest), amely a vizsgálati rendszer érzékenységét mutatja.

A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

Metabolikus aktiválás	Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
Exogén metabolikus aktiválás nélkül	Metil-metán-szulfonát	66-27-3	200-625-0
	Etil-metán-szulfonát	62-50-0	200-536-7

▼B

Metabolikus aktiválás	Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
	N-etil-N-nitrozo-karbamid	759-73-9	212-072-2
	Mitomycin-C	50-07-7	200-008-6
	4-Nitro-kinolin-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Exogén metabolikus aktiválással	Benz[a]pirén	50-32-8	200-028-5
	Ciklofoszfamid Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Más megfelelő pozitív kontrollanyagok is használhatók. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak.

Minden begyűjtés alkalmával negatív kontrollanyagokat kell használni, amelyeknél csak oldószert és vivőanyagot alkalmaznak a kezelt médiumban, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt tenyészeteké. Ezenkívül nem kezelt kontrollanyagokat is fel kell használni, kivéve, ha léteznek olyan történeti kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy semmilyen ártalmas, mutagén hatást nem hoz létre a kiválasztott oldószer.

1.4.3. **A kísérlet végrehajtása**

1.4.3.1. *Kezelés a vizsgált anyaggal*

A proliferáló sejteket a vizsgált anyaggal kell kezelni valamilyen metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében és e nélkül. A limfociták kezelése a mitogén stimuláció után körülbelül 48 órával kezdődik.

1.4.3.2. Rendszerint két tenyészetet használnak minden egyes koncentrációnál és nagyon ajánlatos negatív (oldószer) kontrolltenyészetek használata. Ahol a történeti adatokból minimális eltérés mutatható ki a két tenyészet között (13), (14), elfogadható egyetlen tenyészet használata minden egyes koncentrációnál.

A gázokat vagy illékony anyagokat megfelelő módszerekkel, például légmentesen lezárt tenyésztőedényekben kell vizsgálni (15) (16).

1.4.3.3. *Tenyészetbegyűjtési idő*

Az első kísérletben a sejteket 3–6 órára kell kitenni a vizsgált anyag hatásának, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül, a kezelés kezdete után körülbelül 1,5 normál sejtciklusidő letelte után kezdődik a feldolgozás (12). Ha e módszer negatív eredményeket ad mind metabolikus aktiválással, mind anélkül, végre kell hajtani egy további kísérletet aktiválás nélkül, folyamatos kezeléssel körülbelül az 1,5 normál sejtciklus-időtartammal egyenlő idő letelte után végrehajtott mintavételig. Bizonyos kémiai anyagok lehet, hogy könnyebben észlelhetők 1,5 ciklusnál hosszabb kezelési/mintavételi idő alkalmazása esetén. A metabolikus aktiválással kapott negatív eredményeket esetenkénti vizsgálattal kell megerősíteni. Azokban az esetekben, ahol a negatív eredmények megerősítését nem tekintjük szükségesnek, közljük ennek indokait.

▼B

1.4.3.4. *Kromoszómapreparálás*

A sejttenyészeteket rendszerint 1-3 órán át kezelni kell Colcemid®-dal vagy kolchicinnel begyűjtésük előtt. Minden sejttenyészetet külön kell begyűjteni és feldolgozni a kromoszómák preparálásához. A kromoszómapreparáció a sejtek hipotonikus oldattal való kezelését, fixálását és megfestését foglalja magában.

1.4.3.5. *Elemzés*

Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollanyagokét is ideértve, önálló kódolással kell ellátni a mikroszkópos elemzés előtt. Mivel a fixálási eljárások gyakran a metafázisban lévő sejtek egy részének széttörését eredményezik, mely kromoszómaveszteséggel jár, ezért a kiértékelt sejtek tartalmaznak egy centromer számot, amely minden sejttípus esetében megfelel a ± 2 modális értéknek. Legalább 200, jól kiterült metafázist kell értékelni koncentrációnként és kontrollanyagonként, egyenlő arányban elosztva a megkettőzött minták között. E szám csökkenthető, amikor nagyszámú rendellenesség figyelhető meg.

Bár a vizsgálat célja a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek észlelése, fontos a poliploidok és az endoreduplikáció feljegyzése is, amennyiben ezek láthatók.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK MEGÁLLAPÍTÁSA

A kísérleti egység a sejt, ebből következően meg kell állapítani a szerkezeti kromoszóma-rendellenességgel rendelkező sejtek arányát. Fel kell sorolni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek különböző típusait arányaikkal és gyakoriságukkal együtt, kísérleti és kontrolltenyészetenként. A gap külön kerül feljegyzésre és szerepel a jelentésben, de rendszerint azokat nem kell beleszámolni a rendellenességek összgyakoriságba.

A rendellenességek megállapítására irányuló fő kísérletekben egyidejűleg minden kezelt és negatív kontrolltenyészet esetében fel kell jegyezni a citotoxicitás meghatározására irányuló tevékenységeket.

Az egyes tenyészetekhez tartozó adatokat meg kell adni. Ezenkívül minden adatot táblázat formájában kell összefoglalni.

Nem követelmény az egyértelműen pozitív reakció igazolása. A nem egyértelmű eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, amelyhez lehetőleg módosítani kell a kísérleti körülményeket. A negatív eredmények megerősítésének szükségességét az 1.4.3.3. tárgyalja. Az ellenőrző (utólagos) kísérleteknél mérlegelni kell a vizsgálati paraméterek módosítását a kiértékelt feltételek tartományának kiterjesztésére. A módosítható vizsgálati paraméterek, többek között, a koncentrációk felosztása és a metabolikus aktiválási körülmények.

2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Több különböző kritérium létezik valamely pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek számának koncentrációval összefüggő vagy reprodukálható növekedése. Először az eredmények biológiai jelentőségét kell fontolóra venni. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (3) (13). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező.

▼B

A poliploid sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag potenciálisan gátolhatja a mitiotikus folyamatokat és számos kromoszóma-rendellenességet idézhet elő. Az endoreduplikált kromoszómákkal rendelkező sejtek számának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag potenciálisan gátolhatja a sejtciklus végbemenetelét (17), (18).

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételik meg a kísérletet.

Az *in vitro* kromoszóma-rendellenesség vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált anyag szerkezeti kromoszóma-rendellenességeket idéz elő emlős szomatikus sejtek tenyészetében. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények mellett a vizsgált anyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket emlős szomatikus sejtek tenyészetében.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/-vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

— sejtek típusa és eredete,

— a felhasznált sejttípus kariotípus jellemzői és alkalmassága,

— mikoplazma hiánya, ha előfordul ilyen,

— a sejtciklus hosszúságára vonatkozó információ,

— vérdonorok neme, teljes vér vagy elkülönített limfociták, használt mitogén,

— passzálások száma, ha vannak ilyenek,

— a sejttenyészet fenntartásának módszerei, ha vannak ilyenek,

— modális kromoszómaszám.

Vizsgálati körülmények:

— metafázis-blokkoló szer meghatározása, annak koncentrációja és behatásának időtartama,

— koncentrációk és tenyészetek száma kiválasztásának indoklása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és oldékonysági határokat, ha rendelkezésre állnak,

— tápfolyadék összetétele, CO_2-koncentráció, ha van ilyen,

▼B

— a vizsgált anyag koncentrációja,

— a vivőanyag és a hozzáadott vizsgált anyag térfogata,

— inkubációs hőmérséklet,

— inkubációs idő,

— kezelés időtartama,

— sejtsszám a leültetéskor, az adott esettől függően,

— metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, az elfogadhatósági kritériumot is ideértve,

— pozitív és negatív kontrollanyagok,

— tárgylemez preparálásának módszerei,

— rendellenességek értékelésének kritériumai,

— elemzett metafázisok száma,

— a toxicitás meghatározásához használt módszerek

— kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e,

Eredmények:

— toxicitás jelei, például konfluencia mértéke, sejtciklusadatok, sejtszámok, mitiotikus index,

— kicsapódás jelei,

— a kezelt médium pH-jával és ozmolalitásával kapcsolatos adatok, ha meghatároztuk azokat,

— rendellenességek (gap-et is beleértve) meghatározása,

— kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek száma és a kromoszóma rendellenességek típusa, minden egyes kezelt és kontrolltenyészethez külön megadva,

— ploidok megfigyelt változásai,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzés, ha van ilyen,

— párhuzamos negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok,

— történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, átlagokkal és standard eltérésekkel.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **SZAKIRODALOM**

(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., Anderson, G. and Zeiger E. (1978) Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, Environs, Molec. Mutagen 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 ICPEMC 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) 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

(7) Maron, D. M. and Ames, 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 Mircrosomal System In Vitro, I. 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., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1245-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. Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, 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 Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J., (cd) 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. L., Schaich, K. M. (eds), Genotoxic Effects of Airbone 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, Mutation 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. MUTAGENITÁS – KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉGEK *IN VIVO* VIZSGÁLATA EMLŐSÖKÖN

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 475-nek, kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálata emlősökön (1997).

1.1. BEVEZETÉS

A kromoszóma-rendellenességek *in vitro* vizsgálatot állatok, rendszerint rágcsálók, csontvelősejtjeiben a vizsgált anyag által előidézett szerkezeti kromoszóma-rendellenességek észlelésére használjuk (1), (2), (3), (4). A szerkezeti kromoszóma-rendellenességek kétféle típusúak lehetnek, kromoszóma vagy kromatid. A poliploida gyakoriságának növekedése bizonyíték lehet arra, hogy valamely kémiai anyag számos rendellenességet idézhet elő. A mutációit előidéző kémiai anyagok többsége esetében az előidézett rendellenességek kromatid típusúak, de kromoszóma típusú rendellenességek is előfordulnak. A kromoszómamutációk és ehhez hasonló folyamatok számos emberi genetikai betegségek okai. Néhány érv a mellett szól, hogy a kromoszómamutációk és ehhez hasonló folyamatok, amelyek változásokat okoznak az onkogénekben és a tumorszuppresszor génekben, szerepet játszanak az emberekben és a kísérleti rendszerekben a rák kialakulásában és megszűnésében.

E vizsgálatban rendszerint rágcsálókat kell használni. A csontvelő a vizsgált fő szövet, mivel ez gazdagon vaszkularizált, és olyan gyorsan szaporodó sejtek populációját tartalmazza, amelyek könnyen izolálhatók és preparálhatók. Más kísérleti állatok és célszövetek nem képezik e módszer tárgyát.

E kromoszómarendellenesség-vizsgálat különösen alkalmas a releváns mutagéntulajdonságok értékelésére annyiban, hogy lehetővé teszi az *in vivo* metabolizmus, farmakokinetika és DNS-reparációs folyamatok tényezőinek vizsgálatát, bár ezek különbözőek az egyes fajok és különböző szövetek tekintetében. Az *in vivo* vizsgálat a valamely *in vitro* vizsgálat által észlelt, mutagén hatás további vizsgálatához is hasznos.

Ha bizonyos jelek utalnak arra, hogy a vizsgált anyag, vagy valamely reaktív metabolitja nem éri el a célszövetet, akkor e vizsgálat nem megfelelő.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Kromatid típusú rendellenesség: szerkezeti kromoszómakárosodás, amely egy kromatid törésében vagy kromatidok közötti törésben és újraegyesítésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Endoreduplikáció: az a folyamat, amely során valamely DNS-replikációt követően a sejtmag nem lép be a mitózis fázisába, hanem egy másik S fázist indít. Az eredmény 4, 8, 16,… kromatiddal rendelkező kromoszómák.

Gap: egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus sérülés.

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált sejteket jellemző normál számértéktől.

▼B

Poliploida: a haploid kromoszómaszám (n) egész számú, de nem diploid (azaz 3n, 4n, és így tovább) megsokszorosódása.

Szerkezeti rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében, mint a delíciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződés.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az állatoknak a vizsgált anyagot a megfelelő módon kell adagolni, majd a kezelés után megfelelő időpontokban el kell pusztítani azokat. Az elpusztítás előtt az állatokat metafázis-blokkoló szerrel (például kolchicin vagy Colcemid®) kell kezelni. Ezután kromoszómakészítményeket kell létrehozni a csontvelősejtekből és megfesteni azokat, majd elemezni kell a metafázisú sejteket kromoszóma-rendellenességek megállapítása céljából.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Rendszerint patkányokat, egereket és kínai hörcsögöket kell használni, jóllehet bármilyen megfelelő emlős használata lehetséges. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell használni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a relatív páratartalom értékének 50–60 % között kell lennie.

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba osztják. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek az elhelyezés miatti esetleges hatások. Ezt követően az állatokat egyenként azonosítják. Az állatokat legalább öt napig szoktatják a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. *Dózisok előkészítése*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani az összeegyeztethetőségüket bizonyító adatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

▼B

1.4.2.2. *Kontrollok*

Mindkét nemhez és minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokat alkalmaznak. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrolloknak *in vivo* szerkezeti rendellenességeket kell létrehozni expozíciós koncentrációban úgy, hogy észlelhető legyen a növekedés (a háttérhez viszonyítva). A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választják ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. Elfogadható, hogy a pozitív kontroll beadása a vizsgált anyag beadási módjától eltérjen, és hogy csak egyetlen mintavételre kerüljön sor. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
Etil-metán-szulfonát	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrozo-karbamid	759-73-9	212-072-2
Mitomicin C	50-07-7	200-008-6
Ciklofoszfamid Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilén-melamin	51-18-3	200-083-5

Minden mintavétel alkalmával a negatív kontrollcsoportban lévő állatokat is figyelembe kell venni, amelyeknek csupán oldószert adagolunk, egyébként azonos bánásmódban részesítjük azokat a kezelt állatokkal, kivéve ha a történeti kontrolladatokból elfogadható értékek állnak rendelkezésre a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek állaton belüli sokfélesége és gyakorisága tekintetében. Ha a negatív kontrolloknál csak egyetlen mintavételezést kell alkalmazni, ennek legmegfelelőbb ideje az első mintavételi idő. Ezenkívül használnak nem kezelt kontrollállatokat, kivéve, ha vannak olyan történeti vagy nyilvánosságra hozott kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy a kiválasztott oldószer/vivőanyag semmilyen ártalmas vagy mutagén hatást nem hoz létre.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Állatok száma és neme**

Minden egyes kezelt és kontrollcsoport nemenként legalább öt elemezhető állatot tartalmaz. Ha a tanulmány végrehajtásakor rendelkezésre állnak olyan adatok azonos fajták és azonos expozíciós mód használata mellett, amelyek azt mutatják, hogy nincsenek jelentős különbségek a nemek között a toxicitás tekintetében, elegendő lesz egyetlen nem vizsgálata. Ahol az emberek esetében az expozíció nemre jellemző lehet, mint például néhány gyógyszeranyag esetében, a vizsgálatot a megfelelő nemű állatokkal kell elvégezni.

1.5.2. **Kezelés lefolytatása**

A vizsgált anyagot lehetőleg egyetlen alkalommal adják be. A vizsgált anyagot két adagban is be lehet adni, ugyanazon a napon két alkalommal néhány órás időközzel, nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítésére. Más adagolási módok alkalmazását tudományosan indokolni kell.

▼B

Ha a vizsgált anyagot ugyanazon napon adják be, mintákat két különböző időpontban kell venni. Rágcsálók esetében az első mintavétel a kezelést követő 1,5 normál sejtciklusidő letelte után történik (az utóbbi rendszerint 12–18 óra között van). Mivel a vizsgált anyag felvételéhez és anyagcseréjéhez, valamint ennek a sejtciklus-kinetikára gyakorolt hatásának a bekövetkeztéhez szükséges idő befolyásolhatja a kromoszóma-rendellenesség észlelésének optimális időpontját, ezért ajánlott az első mintavétel után 24 órával ismételten mintát venni. Ha olyan adagolási módszert választanak, ahol nem egyetlen nap adagolják a vizsgált anyagot, akkor a mintavételt, az utolsó kezelés után 1,5 normál sejtciklusidő elteltekor kell elvégezni.

Az állatok elpusztítása előtt a hasüregébe adott injekcióval megfelelő adag metafázis-blokkoló szert (például Colcemid® vagy kolchicin) fecskendeznek be. Ezután az állatokból mintákat kell venni megfelelő időközönként. Egerek esetében ez az időköz körülbelül 3–5 óra; kínai hörcsögök esetében körülbelül 4–5 óra. A sejteket ki kell nyerni a csontvelőből, majd elemezni kell azokat a kromoszóma-rendellenességek megállapítása céljából.

1.5.3. **Dózisok**

Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeznek, mert nem állnak rendelkezésre alkalmas adatok, ezt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajták, törzsek, nemek és kezelési eljárás alkalmazásával hajtják végre, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmaznak (5). Ha észlelhető toxicitás, akkor három dózist használnak az első mintavételhez. E dózisoknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételnél csak a legmagasabb dózist kell használni. A legmagasabb adag az a dózis, ami olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének) adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. A legmagasabb adag olyan dózisként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jeleket a csontvelőben (például 50 %-nál nagyobb csökkenést a mitiotikus indexben).

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúlydózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatásokat nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat. Hosszabb időtartamú vizsgálatok esetében a határadag 2 000 mg/kg/testsúly/nap legfeljebb 14 napos kezelés, és 1 000 mg/kg/testsúly/nap 14 napnál hosszabb kezelés esetében. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át, inkubációs kanül segítségével vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/100g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. Magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

▼B

1.5.6. **Kromoszómapreparáció**

Közvetlenül az elpusztítás után csontvelőt kell venni, és hipotoniás oldatba tenni, majd fixálni. A sejteket ezután tárgylemezekre kell teríteni és megfesteni.

1.5.7. **Elemzés**

Meg kell határozni a mitiotikus indexet a citotoxicitás megállapításához állatonként legalább 1 000 sejtben, minden kezelt állat (pozitív kontrollállatokat is ideértve) és nem kezelt, negatív kontrollcsoportba beosztott állat esetében.

Legalább 100 metafázist kell elemezni minden egyes állatnál. Ez a szám csökkenthető amennyiben nagyszámú rendellenességet figyelnek meg. Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollokat is ideértve, egymástól függetlenül kezelni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Mivel a fixálási eljárások gyakran a metafázisban lévő sejtek egy részének széttörését eredményezik, mely kromoszómaveszteséggel jár, ezért a kiértékelt sejtek tartalmaznak egy centromer számot, amely megfelel a 2n ± 2 értéknek.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK MEGÁLLAPÍTÁSA

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. A kísérleti egység maga az állat. Minden egyes állat esetében fel kell jegyezni az értékelt sejtek számát, a sejtenkénti rendellenességek számát és a szerkezeti kromoszóma-rendellenességget mutató sejtek arányát. Fel kell sorolni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek különböző típusait a számukkal és gyakoriságukkal együtt kezelt és kontrollcsoportonként. A gap külön kerül feljegyzésre és szerepel a jelentésben, de rendszerint azokat nem kell beleszámolni a rendellenességek összgyakoriságba. Ha semmilyen bizonyíték nincs arra, hogy eltérés van a két nem között a reakciók tekintetében, összevonhatók a nemekhez kapott adatok a statisztikai elemzés céljából.

2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek számának növekedése a dózis függvényében, vagy egyetlen mintavétel alkalmával egy meghatározott dózis mellett a rendellenességet mutató sejtek számának egyértelmű növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (6). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező. A többféleképpen magyarázható eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, lehetőleg a kísérleti körülményeket módosítva.

A poliploida gyakoriságának növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag számos kromoszóma-rendellenességet idézhet elő. A reduplikáció növekedése azt jelezheti, hogy a vizsgált anyag akadályozza a sejtciklus előrehaladást (7), (8).

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

▼B

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az *in vivo* kromoszómarendellenesség-vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy valamely anyag kromoszóma-rendellenességeket idéz elő a vizsgált állatfajták csontvelőjében. Negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált körülmények mellett a vizsgált anyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket a kísérleti állatok csontvelőjében.

Értékeli kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e az általános keringési rendszerbe, illetve kifejezetten a célszövetbe (például szisztematikus toxicitás).

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/-vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

— használt fajok/törzs,

— állatok száma, kora és neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

— az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagokat és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

— pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagok,

— a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

— a dózisok kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

— a vizsgált anyag beadására vonatkozó részletek,

— a beadási mód megindokolása,

— módszerek annak ellenőrzésére, hogy elérte-e a vizsgált anyag az általános keringési rendszert vagy célszövetet, ha vannak ilyenek,

— átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

— kezelési és mintavételi menetrend részletes leírása,

— toxicitás meghatározásának módszerei,

▼B

— metafázis-blokkoló szer meghatározása, annak koncentrációja és kezelés időtartama,

— tárgylemez preparálásának módszerei,

— rendellenességek értékelésének kritériumai,

— az elemzett sejtek száma (állatonként),

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

— toxicitás jelei,

— mitiotikus index,

— rendellenességek típusa és száma, minden egyes állat tekintetében külön megadva,

— csoportonként a rendellenességek össz-száma átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— csoportonként a rendellenességeket mutató sejtek száma átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— ploidok megfigyelt változásai,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzések, ha vannak,

— az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok,

— történeti negatív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) Adler, I. 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. 275-306

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian *In vitro* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, Mutation Res., 189, 157-165

(3) Richold, M., Chandley, 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 York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141

(4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, 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. andRichold, 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., 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: 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. 1362-1364

▼B

B.12. MUTAGENITÁS – *IN VIVO* EMLŐS ERITROCITA MIKRONUKLEUSZ VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 474-nek, emlős eritrocita mikronukleusz vizsgálat (1997).

1.1. BEVEZETÉS

Az emlős mikronukleusz *in vivo* vizsgálatot rendszerint rágcsálók csontvelőjéből és/vagy perifériás véréből vett mintákban az eritrociták elemzésével annak a károsodásnak az észlelésére használják, amelyet a vizsgált anyag idéz elő a kromoszómákban vagy az eritrociták mitiotikus rendszerében.

A mikronukleusz vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek olyan citogenetikai károsodást okoznak, amelyek eredménye visszamaradó kromoszómatöredékeket vagy egész kromoszómákat tartalmazó mikronukleuszok kialakulása.

Amikor a csontvelői eritroblasztból kifejlődik a polikromáziás eritrocita, a fő sejtmag kilökődik; minden, már létrejött mikronukleusz hátramaradhat a sejtmagmentes citoplazmában. E sejtekben a fő sejtmag hiánya miatt könnyebb a mikronukleusz láthatóvá tétele. A kezelt állatokban a mikronukleált polikromáziás eritrociták gyakoriságának növekedése az előidézett kromoszómakárosodás jelzése.

E vizsgálatban általában rágcsálók csontvelőjét használják, mivel e szövetben termelődnek a polikromáziás eritrociták. A perifériás vérben lévő, mikronukleált polikromáziás eritrociták mérése is elfogadható minden olyan állatfajta esetében, amelynél már bebizonyosodott, hogy a lép képtelen eltávolítani a mikronukleált eritrocitákat vagy amelyek megfelelő érzékenységet mutattak a szerkezeti vagy számszerű kromoszóma-rendellenességeket okozó anyagok észlelésére. A mikronukleusz számos kritérium segítségével ismerhető fel. Ezek közé tartozik a mikronukleuszban egy kinetochor vagy a centromer DNS jelenlétének vagy hiányának megállapítása. A fő végcél a mikronukleusszal rendelkező polikromáziás eritrociták gyakoriságának meghatározása. A kiértékelés végcéljaként a perifériás vérben adott számú érett eritrocita közül azon normokromáziás eritrociták száma is használható, amelyek mikronukleuszt tartalmaznak, amikor az állatokat négy hétig vagy ennél hosszabb ideig kezelik.

Az *in vivo* emlős mikronukleusz vizsgálat különösen lényeges a mutagén veszély becslésében annyiban, hogy lehetővé teszi az *in vivo* metabolizmus, farmakokinetikai és DNS-reparációs folyamatok tényezőinek vizsgálatát, bár ezek eltérőek lehetnek a különböző fajok, a különböző szövetek és a különböző genetikai végpontok között. Az *in vivo* kísérlet is hasznos a valamely *in vitro* rendszer által észlelt mutagén hatás további vizsgálatához.

Ha bizonyíték van arra, hogy a vizsgált anyag vagy egy reaktív metabolitja nem éri el a célszövetet, akkor nem megfelelő e vizsgálat.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Centroméra (Kinetokór): valamely kromoszóma olyan régiója (régiói), amelyhez orsórostok kapcsolódnak a sejtosztódás során, lehetővé téve a leánykromoszómák szabályos mozgását a leánysejtek pólusaihoz.

Mikronukleusz: a sejtek fő magjától elkülönült kis járulékos mag, amelyet a mitózis (meiózis) telofázisa során hoznak létre visszamaradó kromoszóma töredékek vagy teljes kromoszómák.

Normokromáziás eritrocita: érett, riboszómákat már nem tartalmazó eritrocita, amely a riboszómákra szelektív festéssel különböztethető meg a polikromáziás eritrocitától.

Polikromáziás eritrocita: éretlen eritrocita, közbenső fejlődési szakaszban, amely még mindig tartalmaz riboszómákat, és ezért a riboszómákra szelektív festésekkel különböztethető meg az érett, normokromáziás eritrocitától.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot megfelelő módon kell az állatoknak adagolni. Csontvelő használatakor az állatokat a kezelés után, megfelelő időpontokban elpusztítják, a csontvelőt kivonják, preparálják, majd megfestik (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7). Perifériás vér használatakor a vért a kezelés után megfelelő időpontokban össze kell gyűjteni és kenetpreparátumokat kell létrehozni, majd meg kell festeni azokat (4), (8), (9), (10). Perifériás vérrel végrehajtott vizsgálatok esetén a lehető legkisebb időnek szabad csak eltelnie az utolsó expozíció és a sejtek összegyűjtése között. A preparátumokat elemezni kell a mikronukleusz jelenlétének megállapítása céljából.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Csontvelő használatakor egerek vagy patkányok javasoltak, jóllehet bármilyen megfelelő emlősfaj használható. Perifériás vér használatakor az egér az ajánlott kísérleti állat. Azonban bármilyen megfelelő emlősfaj használható, feltéve, hogy az olyan faj, amelyben a lép nem távolítja el a mikronukleusszal rendelkező eritrocitákat, vagy olyan faj, amely megfelelő érzékenységet mutatott az olyan anyagok észlelésére, amelyek szerkezeti vagy számszerű kromoszóma-rendellenességeket okoznak. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat használunk. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól és a nemenkénti átlagos értéktől legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a relatív páratartalom értékének 50–60 % között kell lennie.

▼B

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba kell osztani. Az állatokat egyenként azonosítani kell. Az állatokat legalább öt napig szoktatni kell a laboratóriumi körülményekhez. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek a ketrec elhelyezéséből adódó esetleges hatások.

1.4.1.4. *Adagok előkészítése*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/Vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitásukat bizonyító adatokkal.

1.4.2.2. *Kontrollanyagok*

Mindkét nemhez és minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív kontrollokat alkalmaznak. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrolloknak *in vivo* mikronukleuszokat kell létrehozniuk expozíciós koncentrációban úgy, hogy észlelhető legyen a növekedés (a háttérhez viszonyítva). A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. Elfogadható, hogy a pozitív kontrollanyag beadása a vizsgált anyag beadási módjától eltérő módon történjen, és hogy a mintavételezésre csak egyetlen időpontban kerüljön sor. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
Etil-metán-szulfonát	62-50-0	200-536-7
N-etil-N-nitrozo-karbamid	759-73-9	212-072-2
Mitomicin C	50-07-7	200-008-6
Ciklofoszfamid Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Trietilén-melamin	51-18-3	200-083-5

▼B

Minden mintavétel alkalmával a negatív kontrollcsoportban lévő állatokat is figyelembe kell venni, amelyeknek csupán oldószert adagolnak, egyébként azonos bánásmódban kell részesíteni azokat a kezelt állatokkal, kivéve, ha a történeti kontrolladatokból elfogadható értékek állnak rendelkezésre a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek állaton belüli sokfélesége és gyakorisága tekintetében. Ha a negatív kontrolloknál csak egyetlen mintavételezést alkalmaznak, ennek legmegfelelőbb ideje az első mintavételi idő. Ezenkívül használnak nem kezelt kontrollállatokat, kivéve, ha vannak olyan történeti vagy nyilvánosságra hozott kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy a kiválasztott oldószer/vivőanyag semmilyen ártalmas vagy mutagén hatást nem hoz létre.

Perifériás vér használatakor előkezelt minta is elfogadható párhuzamos negatív kontrollként, de csak a rövid perifériás vérvizsgálatokban (például 1–3 adagos kezelés), amikor az ebből kapott adatok a történeti kontrollanyagok várt tartományában vannak.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Állatok száma és neme**

Minden egyes kezelt és kontrollcsoport nemenként legalább öt elemezhető állatot tartalmaz (11). Ha a tanulmány végrehajtásakor rendelkezésre állnak olyan adatok azonos fajták és azonos expozíciós mód használata mellett, amelyek azt mutatják, hogy nincsenek jelentős különbségek a nemek között a toxicitás tekintetében, elegendő lesz egyetlen nem vizsgálata. Ahol az emberek esetében az expozíció nemre jellemző lehet, mint például néhány gyógyszeranyag esetében, a vizsgálatot a megfelelő nemű állatokkal kell elvégezni.

1.5.2. **A kezelés lefolytatása**

Semmilyen standard kezelési menetrend (azaz egy, kettő vagy több kezelés 24 órás időközönként) nem javasolható. A hosszabb adagolás alkalmával véletlenszerűen vett minták mindaddig elfogadhatók, amíg bebizonyosodik annak pozitív hatása erre a vizsgálatra, vagy negatív vizsgálat esetében mindaddig, amíg bebizonyosodik, hogy létrejött toxicitás vagy a határadagot használtak, és az adagolás a mintavétel idejéig folytatódott. A vizsgált anyagot két adagban is be lehet adni, ugyanazon a napon két alkalommal néhány órás időközzel, a nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítésére.

A vizsgálat kétféle módon hajtható végre:

a) az állatokat egyszer kell kezelni a vizsgált anyaggal. Legalább kétszer kell csontvelőmintákat venni, a kezelés után 24 óránál nem korábban, de a kezelés utáni 48 órát nem meghaladó időpontban, a minták közötti megfelelő időközökkel. A kezelés utáni 24 óránál korábbi mintavételt meg kell indokolni. Legalább kétszer kell perifériás vérmintákat venni, a kezelés utáni 36 óránál nem korábban kezdve, az első mintát követő megfelelő időközökkel, de 72 órát nem meghaladó időpontban. Ha valamely mintavétel alkalmával pozitív reakciót tapasztalunk, akkor nincs szükség további mintavételre;

▼B

b) ha naponként kettő vagy több alkalommal adagoljuk a vizsgált anyagot (például kettő vagy több kezelés 24 órás időközönként), egyszer kell mintákat gyűjteni az utolsó kezelést követő 18 és 24 óra között a csontvelő, és egyszer az utolsó kezelést követő 36 és 48 óra között a perifériás vér vizsgálata esetében (12).

Ezenkívül alkalmazhatók más mintavételi idők is, amikor ez az adott esetben megfelelő.

1.5.3. **Dózisok**

Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeztek, mert nem állnak rendelkezésre alkalmas adatok, ezt ugyanabban a laboratóriumban, ugyanazon fajták, törzs, nem és kezelési eljárás alkalmazásával hajtják végre, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmaznak (13). Ha észlelhető toxicitás, három dózist kell használni az első mintavételhez. E dózisoknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételnél csak a legmagasabb adagot használják. A legmagasabb adag az a dózis, amely olyan egyértelmű toxicitási jeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének) adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. A legmagasabb adag olyan adagként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jeleket (például a csontvelőben vagy a perifériás vérben az összes eritrocita között az éretlen eritrociták arányának csökkenése).

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúlydózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatásokat nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózis használatával végrehajtott teljes vizsgálat. Hosszabb időtartamú vizsgálatok esetében a határadag 2 000 mg/kg/testsúly/nap legfeljebb 14 napos kezelés, és 1 000 mg/kg/testsúly/nap 14 napnál hosszabb kezelés esetében. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/l00 g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

▼B

1.5.6. **Csontvelő/vér preparálása**

A csontvelősejteket rendszerint a femurokból vagy tibiákból kell venni közvetlenül az állatok elpusztítása után. A sejteket el kell távolítani a combcsontokból vagy sípcsontokból, preparálni kell azokat és megfesteni már ismert módszerek segítségével. A perifériás vért a farokvénából vagy más megfelelő érből kell venni. A vérsejteket azonnal, szupravitálisan meg kell festeni (8) (9) (10) vagy kenetpreparátumokat kell létrehozni, és ezután kell elvégezni a festést. A DNS-specifikus festékek (például akridinnarancs (14) vagy Hoechst 33258 plusz pironin-Y (15)) használata kiküszöbölhet néhányat a DNS-re nem jellemző festőanyag használatával mesterségesen előidézett változás közül. Ez az előny nem zárja eleve ki a hagyományos festékek (például Giemsa) használatát. További rendszerek (például cellulózoszlopok a magvas sejtek eltávolítására (16)) is használhatók, feltéve, hogy már bebizonyosodott e rendszerekről, hogy megfelelően működnek a laboratóriumban mikronukleált sejtek preparációjánál.

1.5.7. **Elemzés**

Minden egyes állatnál meg kell határozni az összes (éretlen + érett) eritrocitához viszonyítottan az éretlenek arányát, csontvelő esetében összesen legalább 200 eritrocita és perifériás vér esetében legalább 1 000 eritrocita megszámlálásával (17). Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollanyagokét is, kódolni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Allatonként legalább 2 000 éretlen mikronukleuszt kell kiértékelni a mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták előfordulásának megállapítása céljából. További információk kaphatók az érett eritrociták értékelésével abból a szempontból, hogy tartalmaznak-e mikronukleuszt. A tárgylemezek elemzésekor az összes eritrocitát tekintve, az éretlen eritrociták arányának nem szabad a kontrollérték 20 %-ánál kisebbnek lennie. Amikor az állatokat folyamatosan kezeljük négy hétig vagy ennél hosszabb ideig, állatonként legalább 2 000 érett eritrocita is kiértékelhető a mikronukleusz jelenlétének megállapítása céljából. Automatizált elemző rendszerek (képanalizáló és áramlási citometria sejtszuszpenziókra) a kézi értékelés elfogadható alternatívái, ha alkalmazásuk megfelelően indokolt és e rendszerek érvényesítettek.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell összefoglalni. A kísérleti egység maga az állat. Minden egyes állat esetében külön kell feljegyezni a kiértékelt éretlen eritrociták számát, a mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták számát és az összes eritrociták közül az éretlenek számát. Amikor az állatokat folyamatosan négy hétig vagy ennél hosszabb ideig kezeljük, az érett eritrocitákra vonatkozó adatokat is meg kell adni, ha azok megállapításra kerültek. Minden egyes állat tekintetében meg kell adni az összes eritrociták között az éretlenek arányát és, adott esetben, a mikronukleusszal rendelkező eritrociták arányát. Ha semmilyen bizonyíték nincs arra, hogy eltérés van a két nem között a reakciók tekintetében, összevonhatók a nemekhez kapott adatok a statisztikai elemzés céljából.

▼B

2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a mikronukleusszal rendelkező sejtek számának növekedése a dózis függvényében vagy egyetlen mintavétel alkalmával egy meghatározott dózis mellett a mikronukleusszal rendelkező sejtek számának egyértelmű növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (18) (19). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező. A többféleképpen magyarázható eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, lehetőleg a kísérleti körülményeket módosítva.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak, tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismétlik meg a kísérletet.

A mikronukleusz vizsgálat pozitív eredményei azt jelzik, hogy a vizsgált anyag létrehoz olyan mikronukleuszt, amely a vizsgált fajok eritrocitáiban a mitiotikus rendszer károsodásának vagy kromoszómakárosodásnak az eredménye. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem indukál mikronukleuszokat a vizsgált fajok éretlen eritrocitáiban.

Értékelni kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e az általános keringési rendszerbe, ill. kifejezetten a célszövetbe (például szisztematikus toxicitás).

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/-vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

— használt fajok/törzs,

— állatok száma, kora és neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

— az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagértéket és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

— pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagok,

— a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

▼B

— a dózisok kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

— a vizsgált anyag beadására vonatkozó részletek,

— a beadási mód megindoklása,

— módszerek annak ellenőrzésére, hogy elérte-e a vizsgált anyag az általános keringési rendszert vagy cél szövetet, ha vannak ilyenek,

— átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

— kezelési és mintavételi menetrendek részletes leírása,

— a tárgylemez preparálásának módszerei,

— toxicitás mérésének módszerei,

— mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták értékelésének kritériumai,

— az elemzett sejtek száma (állatonként),

— azok a kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

— toxicitás jelei,

— éretlen eritrociták aránya az összes eritrocitához képest,

— mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták száma, minden egyes állat tekintetében külön megadva,

— csoportonként a mikronukleusszal rendelkező éretlen eritrociták átlagértéke ± standard eltérés,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzések és alkalmazott módszerek,

— az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok és történeti negatív adatok,

— az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások

4. **SZAKIRODALOM**

(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, Mutation 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 Heddle, 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, ed. 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., Sofumi, 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 Acridime 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. 53-159

(11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pcchicrotti, 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 Sotou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30± 6 h after double dosing in the mouse peripheral 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 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

(14) Hayashi, M., Sofumi, 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 Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin 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 Recommendes Procedures, UKEMS Subcommittee 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: UKEMS Subcommittee 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

▼B

B.13/14. **MUTAGENITÁS: REVERZ MUTAGENITÁSI VIZSGÁLAT BAKTÉRIUMOKKAL**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG 471-nek, reverz mutagenitási vizsgálat baktériumokkal (1997).

1.1. BEVEZETÉS

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat a *Salmonella typhimurium* és *Escherichia coli* aminosavat igénylő törzseit használja pontmutációk észlelésére, amelyek magukban foglalják egy vagy néhány DNS bázispár szubsztitúcióját, addícióját vagy delécióját (1), (2), (3). E bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatnak az az elve, hogy észleli azon mutációkat, amelyek revertálják a kísérleti törzsekben jelen lévő mutációkat, és helyreállítja a baktériumoknak egy esszenciális aminosavat szintetizáló képességét. A revertált baktérium észlelése azon képességének a segítségével történik, hogy az növekedni tud, amikor nincs jelen a vizsgálati anyatörzs által igényelt aminosav.

A pontmutációk sok emberi genetikai betegség okozói, és számos bizonyíték van arra, hogy a testi sejtek onkogénjeinek és tumorszuppresszor génjeinek a pontmutációi szerepet játszanak a daganat képződésben emberekben és kísérleti állatokban. A reverz mutáció vizsgálatot baktériumokkal gyors, olcsó és viszonylag könnyű végrehajtani. E törzsek közül sok törzs rendelkezik néhány olyan jellemzővel, amelyek érzékenyebbekké teszik azokat mutációk észleléséhez; ilyenek a reverzió helyének DNS-szekvenciája, nagyobb molekulák iránti fokozott sejtpermeabilitás, bizonyos DNS-reparációs rendszerek kiiktatása, vagy a hibára hajlamos DNS-reparációs folyamatok serkentése. A kísérleti törzsek sajátossága néhány hasznos információt szolgáltathat a genotoxikus anyagok által előidézett mutációk típusairól. Szerkezetek sokféle változatához kapott eredmények bő adatbázisa áll rendelkezésre baktériális reverz mutagenitás vizsgálatokhoz; jól megalapozott metodikákat fejlesztettek ki különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező kémiai anyagok, beleértve az illékony vegyületeket is, vizsgálatához.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

A reverz mutagenitás vizsgálat vagy *Salmonella typhimurium*-mal vagy *Escherichia coli*-val elvégezve, azon mutációkat igazolja, amelyek valamely aminosavat (hisztidin, illetve triptofán) igénylő törzsben lépnek fel és egy olyan törzs kialakulásához vezetnek, ami a külső aminosav-ellátástól független.

Bázispárcserét okozó mutagének azok a hatóanyagok, amelyek alapvető bázisváltozást okoznak a DNS-ben. A reverziós vizsgálatban e változás az eredeti mutáció helyén vagy a baktériumgenom egy másik helyén.

Frameshift mutagének azok a hatóanyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delécióját okozzák a DNS-ben, ezzel megváltoztatva a leolvasó keretet a ribonukleinsavban.

▼B

1.3. ALAPVETŐ MEGFONTOLÁSOK

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat prokarióta sejteket használ, amelyek az olyan tényezőkben térnek el az emlőssejtektől, mint például a kémiai anyagok felvétele, metabolizmus, kromoszómaszerkezet és DNS-reparációs folyamatok. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint a metabolikus aktiválás valamilyen kívülről ható forrásának használatát teszik szükségessé. Az *in vitro* metabolikus aktiváló rendszerek nem tudják teljesen szimulálni az emlős *in vivo* körülményeket. Ebből következően a vizsgálat nem ad közvetlen tájékoztatást az emlősök esetében valamely anyag mutációt előidéző és daganatkeltő potenciáljáról.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatot rendszerint a genotoxikus aktivitás és különösen a pontmutáció-előidéző aktivitás első szűrőjeként alkalmazzák. A terjedelmes adatbázis bebizonyította, hogy sok olyan kémiai anyag, amely e vizsgálatban pozitívnak bizonyult, más vizsgálatokban is mutagénnek bizonyul. Léteznek példák olyan mutációt előidéző hatóanyagokra, amelyeket nem észlel e vizsgálat; e hiányosságok okai a vizsgált végpont különleges természetének, a metabolikus aktiválásban előforduló különbségeknek, vagy a biológiai elérhetőségben lévő különbségeknek tulajdoníthatók. Másrészről, azon tényezők, amelyek növelik a bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat érzékenységét, a mutagén aktivitás túlbecsléséhez vezethetnek.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat lehet, hogy nem bizonyul megfelelőnek bizonyos kémiai anyagosztályok értékeléséhez, ilyenek például az erősen baktericid vegyületek (például bizonyos antibiotikumok) és azok, amelyek vélhetően (vagy bizonyítottan) kifejezetten zavaró hatással vannak az emlőssejt replikációs rendszerére (például néhány topoizomeráz gátló szer és néhány nukleozid analóg). Ilyen esetekben megfelelőbbnek bizonyulhatnak az emlős mutagenitási vizsgálatok.

Sok olyan vegyület van, amely pozitív eredményt mutat e vizsgálatban és az emlősökben rákkeltő, a korreláció mégsem abszolút. Mérvadó a kémiai anyag osztálya, és léteznek olyan karcinogén anyagok, amelyeket nem észlel e vizsgálat, mivel azok más, nem genotoxikus mechanizmusokon, vagy olyan mechanizmusokon keresztül fejtik ki a hatásukat, amelyek nincsenek jelen baktériumokban.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Baktériumsejtek szuszpenzióit kezelik a vizsgált anyaggal exogén metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében és anélkül. A lemezöntéses (plate incorporation) módszernél e szuszpenziókat közvetlenül be kell keverni a felülöntő agarba, és minimális táptalajra helyezni. Az előinkubációs módszer esetében az expozíciós keveréket inkubálni kell, és csak ezután kell azt bekeverni a felül öntő agarba a minimál táptalajra helyezés előtt. Mindkét módszer alkalmazásakor két vagy három napig tartó inkubálás után meg kell számolni a revertáns telepeket, és össze kell hasonlítani azt az oldószer kontroll-lemeztenyészeteken lévő spontán revertáns telepek számával.

Már több különböző eljárást írtak le a bakteriális reverz mutagenitás vizsgálat végrehajtására. A leggyakrabban használt eljárások közé tartoznak a lemezöntéses módszer (1), (2), (3), (4) az előinkubációs módszer (2), (3), (5), (6), (7), (8) a fluktuációs módszer (9), (10) és a szuszpenziós módszer (11). Már leírtak módosított változatokat gázok vagy gőzök vizsgálatához (12).

▼B

A módszerben leírt eljárások elsősorban a lemezöntéses és az előinkubációs módszerekhez tartoznak. Ezek közül bármelyik alkalmas kísérletek végrehajtására, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Néhány anyag hatékonyabban észlelhető az előinkubációs módszer segítségével. Ezen anyagok olyan kémiai anyagosztályokhoz tartoznak, amelyek rövid szénláncú alifás nitrozaminokat, kétvegyértékű fémeket, aldehideket, azo festékeket és diazo-vegyületeket, pirrlizidin alkaloidokat, allil és nitrovegyületeket tartalmaznak (3). Azt is felismerték, hogy a mutagének bizonyos osztályai nem mindig észlelhetők az olyan szokásos eljárásokkal, mint például a lemezöntéses vagy előinkubációs módszer. Ezeket „különleges eseteknek" kell tekinteni és észlelésükre alternatív eljárásokat kell használni. A következő „különleges esetek" azonosíthatók (az észlelésükhöz használható eljárásokra adott példákkal együtt): azo festékek és diazo-vegyül etek (3), (5), (6), (13), gázok és illékony kémiai anyagok (12), (14), (15), (16) és glikozidok (17), (18). A standard eljárástól való eltérést tudományosan meg kell indokolni.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Előkészületek**

1.5.1.1. *Baktériumok*

Friss baktériumtenyészeteket kell létrehozni a tenyésztés késői logaritmikus vagy korai stacioner fázisáig (körülbelül 10^9 sejt/ml). Késői stacioner fázisban lévő tenyészeteket nem szabad használni. Lényeges, hogy a kísérletben használt tenyészetek nagy arányban tartalmazzanak életképes baktériumokat. Ezt az arányt vagy történeti kontrolladatokból, vagy minden egyes vizsgálatban külön kiszélesztéssel az életképes sejtek számának meghatározásával lehet megadni.

A javasolt inkubációs hőmérséklet 37 °C.

Legalább öt baktériumtörzset kell használni. Ezek közül négy törzs az S. typhinuriumhoz (TA 1535; TA 1537 vagy TA97a vagy TA97; TA98; és TA100) tartozik, amelyekről már bebizonyosodott, hogy megbízhatóan és reprodukálhatóan reagálnak a különböző laboratóriumokban. E négy *S. typhimurium* törzsnek GC bázispárjai vannak a primer reverziós helyen, és ismert, hogy esetleg nem mutatnak ki bizonyos oxidatív mutagéneket, keresztkötő ágenseket és hidrazinokat. Az ilyen anyagok *E. coli* WP2 törzsekkel vagy *S. typhimurium* TA102-vel (19) észlelhetők, amelyek egy AT bázispárral rendelkeznek a primer reverziós helyen. Ezért tehát a következő törzsek kombinációja javasolt:

— S. typhimurium TA 1535, és

— S. typhimurium TA1537 vagy TA97 vagy TA97a, és

— S. typhimurium TA98, és

— S. typhimurium TA100, és

— E. coli WP2 uvrA, vagy E. coli WP2 uvrA (pKM101), vagy S. typhimurium TA102.

A keresztkötő mutagének észleléséhez előnyben részesíthető a TA102 használata, vagy az E. coli-nak egy DNS-reparációban kiválónak bizonyuló törzse (ilyen például az E. coli WP2 vagy E. coli WP2 (pKM10l)) alkalmazása.

▼B

A törzstenyészet elkészítéséhez, az indikátor ellenőrzéséhez és tárolásához elfogadott eljárásokat kell használni. Minden fagyasztott törzstenyészet-készítmény esetében igazolni kell a tenyésztéshez szükséges aminosavat (hisztidin *S. typhimurium* törzsek és triptofán *E. coli* törzsek esetében). Más fenotípus-jellemzőket hasonlóképpen kell ellenőrizni, nevezetesen: R-faktor plazmidok jelenlétét vagy hiányát, ahol szükséges (azaz ampicillin rezisztenciát TA98, TA100 és TA97a vagy TA97, WP2 uvrA és WP2 uvrA (pKM10l) törzsekben és amplicin plusz tetraciklin rezisztenciát TA102-es törzsben); a specifikus mutációk jelenléte (azaz rfa mutáció *S. typhimurium*-ban kristályibolyára való érzékenységen keresztül és uvrA mutáció *E. coli*-ban vagy uvrB mutáció *S. typhimurium*-ban, ibolyántúli fényre való érzékenységen keresztül) (2), (3). A törzseknek a laboratórium történeti kontrolladataiból várt gyakoriság tartományokon belüli és lehetőleg a szakirodalomban közölt tartományon belüli spontán revertáns telep lemeztenyésztési számokat is kell adniuk.

1.5.1.2. *Táptalaj*

Megfelelő minimál agart (például Vogel-Bonner minimál E ingredienseket és glukózt tartalmazót) és hisztidint, biotint vagy tiptofánt tartalmazó felülöntő agart alkalmazunk, azért hogy több sejtosztódást lehessen megfigyelni (1), (2), (9).

1.5.1.3. *Metabolikus aktiválás*

A baktériumot kezelni kell a vizsgált anyaggal, mind megfelelő metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében, mind anélkül. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorral kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amelyet enziminducerrel, ilyen például az Aroclor 1254 (1), (2), vagy a fenobarbiturát és ß-naftoflavon (18), (20), (21) kombinációjával kezelt rágcsálók májából készítették. A poszt-mitokondriális frakciót rendszerint 5-től 30 térfogatszázalékig terjedő koncentrációkban használják az S9-keverékben. Valamely metabolikus aktiváló rendszer kiválasztása és állapota függhet a vizsgálatra kerülő kémiai anyag osztályától. Meghatározott esetekben megfelelőnek bizonyulhat a poszt-mitokondriális felülúszás egynél több koncentrációjának használata. Azofestékek és diazo-vegyületek esetében megfelelőbbnek bizonyulhat valamilyen redukciós metabolikus aktiváló rendszer használata (6) (13).

1.5.1.4. *Vizsgált anyag/előkészítés*

A szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben, vagy ha szükséges, hígítani kell a baktérium kezelése előtt. A folyékony vizsgált anyagokat közvetlenül hozzá lehet adni a vizsgált rendszerekhez és/vagy hígíthatók kezelés előtt. Friss készítményeket kell használni, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát jelzik.

Oldószerként nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal, és kompatibilisnek kell lennie a baktérium túlélésével és az S9-es aktivitással (22). Ha a jól ismert oldószertől eltérő oldószereket használnak, ezek használatát alá kell támasztania az összeegyeztethetőségüket jelző adatokkal. Elsőként valamilyen vizes oldószer használatát kell megfontolni. Vízzel instabil anyagok vizsgálatakor a használt szerves oldószereknek vízmenteseknek kell lenniük.

▼B

1.5.2. **Vizsgálati körülmények**

1.5.2.1. *Vizsgált törzsek (lásd az 1.5.1.1. alatt)*

1.5.2.2. *Expozíciós koncentráció*

A vizsgált anyag legnagyobb koncentrációjának meghatározásakor figyelembe veendő kritériumok közé tartozik többek között a citotoxicitás és az oldékonyság a végső keverékben.

Hasznosnak bizonyulhat a toxicitás és az oldékonyság meghatározása egy előzetes kísérletben. A citotoxicitás a revertáns telepek számának csökkenésével, a háttér táptalaj kitisztulásának vagy csökkenésének, vagy a kezelt tenyészetek túlélési rátájának segítségével észlelhető. Valamely anyag citotoxicitása valószínűleg megváltozik metabolikus aktiváló rendszerek jelenlétében. Az oldhatatlanságot a végső keverékben a tényleges vizsgálati körülmények között szabad szemmel látható csapadék képződéseként lehet felismerni.

Oldható, nem citotoxikus anyagok esetében a javasolt maximális kísérleti koncentráció 5 mg/lemez vagy 5 µl/lemez. Az 5 mg/lemeznél vagy 5 µl/lemeznél nem oldódó, nem citotoxikus anyagok esetében egy vagy több kísérleti koncentrációnak nem oldódónak kell lennie a végső keverékben. Azon vizsgált anyagokat, amelyek már 5 mg/-lemez vagy 5 ul/lemez alkalmazása esetén citotoxikusak, egészen a citotoxikus koncentrációig kell vizsgálni. A kicsapódás nem zavarhatja az értékelést.

A vizsgált anyag legalább öt különböző elemezhető koncentrációját használják körülbelül fél log-fázis (azaz √10) intervallumokkal az első kísérletben. Megfelelőek lehetnek ennél kisebb intervallumok valamilyen koncentráció-hatás viszony vizsgálatakor. Megfontolható 5 mg/lemez, vagy 5 µl/lemez koncentrációt meghaladó vizsgálat jelentős mennyiségű potenciálisan mutagén szennyeződéseket tartalmazó anyagok értékelésekor.

1.5.2.3. *Negatív és pozitív kontrollok*

Minden egyes vizsgálatban egyidejűleg, törzsre jellemző pozitív és negatív (oldószer) kontrollanyagokat alkalmaznak, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Olyan pozitív kontrollanyag-koncentrációkat kell kiválasztani, amelyek bizonyítják az egyes vizsgálatok hatékonyságát.

Metabolikus aktiváló rendszert alkalmazó vizsgálatok esetében a pozitív kontroll referenciaanyagot (anyagokat) a használt baktériumtörzsek típusa alapján kell kiválasztani.

A következő anyagok példaként szolgálnak a metabolikus aktiválással végrehajtott vizsgálathoz alkalmas pozitív kontrollanyagokra:

CAS-szám	EINECS-szám	Név
781-43-1	212-308-4	9,10- Dimetil-antracén
57-97-6	200-359-5	7,12- Dimetilbenz[a]antracén
50-32-8	200-028-5	Benzo[a]pirén
613-13-8	210-330-9	2-aminoanthracene

▼B

CAS-szám	EINECS-szám	Név
50-18-0		Ciklofoszfamid
6055-19-2	200-015-4	Ciklofoszfamid monohidrát

A következő anyag alkalmas pozitív kontrollanyag reduktív metabolikus aktiváló módszerhez:

CAS-szám	EINECS-szám	Név
573-58-0	209-358-4	Kongó vörös

A 2-Amino-antracént nem szabad használni az S9-es keverék hatékonyságának egyetlen indikátoraként. Ha használunk 2-Amino-antracént, akkor az S9 minden egyes adagját egy olyan mutagénnel is jellemezni kell, amely mikroszómális enzimekkel, ilyen például a Benzo[a]pirén, Dimetil-benzantracén, történő metabolikus aktiválást igényel.

A következő anyagok példák a törzsre jellemző pozitív kontrollanyagokra azon kísérletekben, amelyeket exogén metabolikus aktiváló rendszer nélkül hajtunk végre.

CAS-szám	EINECS-szám	Anyag	Törzs
26628-22-8	247-852-1	Nátrium-azid	TA 1535 és TA 100
607-57-8	210-138-5	2-Nitro-fluorén	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-Amino-akridin	TA 1537, TA 97 és TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 és TA 97a
80-15-9	201-254-7	Kumén-hidroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	Mitomicin C	WP2 uvrA és TA 102
70-25-7	200-730-1	l-etil-3-nitro-l-N-nitrozo-guanidin	WP2, WP2uvrA és WP2uvrA(pK M101)
56-57-5	200-281-1	4-nitroquinoline-l -oxide	WP2, WP2uvrA és WP2uvrA(pK M101)
3688-53-7		Furil-furamid (AF2)	Plazmidhordozó törzsek

Használhatók más megfelelő pozitív kontroll referenciaanyagok is. Olyan pozitív kontrollanyagok használatát kell mérlegelni, amelyek ugyanazon kémiai osztályba tartoznak, mint a vizsgált anyag, ha rendelkezésre állnak ilyenek.

A vizsgálatba bevonják a vizsgált anyagot nem tartalmazó, egyedül oldószerből vagy vivőanyagból álló és egyébként a kezelt csoportokkal azonos módon kezelt negatív kontrollanyagokat. Ezenkívül nem kezelt kontrollokat is használnak, kivéve, ha vannak olyan történeti kontrolladatok, amelyek bizonyítják, hogy semmilyen káros vagy mutagén hatást nem idéz elő a kiválasztott oldószer.

▼B

1.5.3. **A kísérlet végrehajtása**

A lemezöntéses módszer (1), (2), (3), (4) esetében metabolikus aktiválás nélkül, rendszerint 0,05 ml vagy 0,1 ml vizsgált oldatot, 0,1 ml friss baktériumtenyészetet (amely körülbelül 10^8 életképes sejtet tartalmaz) és 0,5 ml steril pufferoldatot összekevernek 2,0 ml rétegelt felülöntő agarral. Metabolikus aktiválással végrehajtott vizsgálathoz rendszerint megfelelő mennyiségű posztmitokondriális frakciót (a metabolikus aktiváló keverékben 5-től 30 térfogatszázalékig terjedő tartományban) tartalmazó 0,5 ml metabolikus aktiváló keveréket összekevernek felülöntő agarral (2,0 ml), a baktériummal és vizsgált anyaggal/vizsgált oldattal együtt. Összekeverjük minden egyes kémcső tartalmát, és egy minimális felülöntő agar felületére öntjük. Engedjük, hogy az agar inkubálás előtt megszilárduljon.

Előinkubációs módszer (2), (3), (5), (6) esetében a vizsgált anyagot/-vizsgált oldatot előinkubálják a vizsgált törzzsel (körülbelül 10^8 életképes sejtet tartalmaz) és steril pufferoldattal vagy a metabolikus aktiváló rendszerrel (0,5 ml), rendszerint 20 percig vagy ennél hosszabb ideig 30–37 °C hőmérsékleten a felülöntő agarral való összekeverés és minimális agar lemez felületére öntés előtt. Rendszerint 0,05 vagy 0,1 ml vizsgált anyagot/vizsgált oldatot, 0,1 ml baktériumot és 0,5 ml S9 keveréket vagy steril pufferoldatot keverünk 2 ml felülöntő agarhoz. A kémcsöveket levegőztetjük az előinkubálás során rázókészülék segítségével.

A változás megfelelő becsléséhez három lemezt kell használni minden egyes dózisszinten. Ha tudományosan indolkolt, két lemez használata elfogadható. Valamely lemez esetenkénti elvesztése nem szükségképpen érvényteleníti a vizsgálatot.

Gázok vagy illékony anyagok megfelelő módszerekkel, például légmentesen zárt edényekben, vizsgálhatók (12), (14), (15), (16).

1.5.4. **Inkubálás**

Egy adott vizsgálatban részt vevő minden lemezt 37 °C hőmérsékleten 48-–2 órán át inkubálnak. Az inkubációs időtartam után meg kell számolni lemezenként a revertáns telepek számát.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az adatokat a lemezenkénti revertáns telepek számaként kell megadni. Mind a negatív (oldószerkontroll és nem kezelt kontroll, ha használatra került) mind a pozitív kontroll-lemezeken lévő revertáns telepek számát is fel kell jegyezni. Meg kell adni az egyes lemezekhez tartozó számokat, lemezenként a revertáns telepek átlagértékét és a standard eltérést a vizsgált anyaghoz és a pozitív és negatív (nem kezelt és/vagy oldószer) kontrollokhoz képest.

A nyilvánvalóan pozitív reakció igazolása nem szükséges. A többféleképpen magyarázható eredményeket további, lehetőleg a kísérleti körülmények módosításával végrehajtott vizsgálattal kell tisztázni. A negatív eredményeket külön kísérletekkel kell megerősíteni. Azon esetekben, ahol nem tekintjük szükségesnek a negatív eredmények megerősítését, meg kell indokolni e döntést. Megfontolandó az utólagos ellenőrző kísérletekben a vizsgált körülmények tartományának kiterjesztése érdekében a vizsgálati paraméterek módosítása. A módosítható vizsgálati paraméterek, többek között a koncentrációfelosztás, a kezelés módszere (lemezöntéses vagy folyadék előinkubációs) és a metabolikus aktiválási körülmények lehetnek.

▼B

2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a metabolikus aktiváló rendszer használatával vagy anélkül legalább egy törzsben a lemezenkénti revertáns telepek számának koncentrációval kapcsolatos növekedése a vizsgált tartományban és/vagy reprodukálható növekedése egy vagy több koncentráció mellett (23). Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények értékelésének elősegítésére (24). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

A bakteriális reverz mutagenitás vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy az anyag bázis szubsztitúcióval vagy kereteltolásokkal (frameshift) pontmutációkat idéz elő a *Salmonella typhimurium* és/vagy az *Escherichia coli* génállományában. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem mutagén a vizsgált fajokban.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/-vivőanyagban, ha ismert.

Törzsek:

— használt törzsek,

— sejtek száma tenyészetenként,

— a törzs jellemzői.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgált anyag lemezenkénti mennyisége (mg/lemez vagy µl/-lemez), és a koncentrációnként használt lemezek számának, valamint az alkalmazott dózisok indoklása,

— használt táptalajok,

— metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, az elfogadhatósági kritériumot is ideértve,

— kezelési eljárások.

Eredmények:

— toxicitás jelei,

— kicsapódás jelei,

— az egyes lemezek számértékei,

▼B

— lemezenként a revertáns telepek átlagértéke és a standard eltérés,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzések, ha vannak,

— az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res. 31, pp. 347-364

(2) Maron, D. M. and Ames, 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/Mannalian Microsomal Assay: A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox 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. (1987). 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, Mutation Res., 38, pp. 33-42

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. 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 Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Rec. 307, pp. 335-344

(13) Prival, M. J., Bell. S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaugham, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine 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. 247-258

(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 Salmonella typhimurium, Cancer Res., 39, pp. 3780-3782

(18) Tamura, G, Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980). Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinel Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, pp. 4961-4965

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G (1990), Comparison of Salmonella typhimurium 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., 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, pp. 175-177

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, 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., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Subcommittee 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. **MUTAGENITÁSVIZSGÁLAT ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS SZŰRÉSE GÉNMUTÁCIÓ VIZSGÁLATA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*-BEN**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A *Saccharomyces cerevisiae* nevű élesztőgomba számos haploid, illetve diploid törzse használható fel arra, hogy a vizsgált vegyület által metabolikus aktivációval, illetve a nélkül kiváltott génmutáció jelenléte kimutatható legyen.

Haploid törzsekben kialakított, előrehaladó mutációs rendszereket kell felhasználni, például a vörös, adeninfüggő élesztőgombák (*ade*-1, *ade*-2) mutációját, illetve kettős adeninfüggő fehér mutánsokat, illetve olyan szelektív rendszereket, mint a kanavnain és a cikloheximid rezisztenciaindukciója.

A leginkább értékelt reverz mutációs rendszer a haploid XV 185-14C törzset alkalmazza, amely az *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* l-l és *trp* 5-48 „ochre” nonszensz mutációkat hordozza; ezek bázis-szubsztitúció típusú mutációt kiváltó mutagénekkel visszafordíthatók, amelyek helyspecifikus, illetve „ochre” szupresszor mutációkat váltanak ki. Az XV 185-14C jelzésű élesztőgombatörzs hordozza a *his* 1-7 markert is, egy főként második helyet érintő mutációkkal visszafordítható „missense” mutációt, valamint a *hom* 3-10 markert, amelyet kereteltolódást („frameshift”) okozó mutagének fordítanak meg.

Diploid *S. cerevisiae* törzsekben az egyetlen általánosan használt törzs a D_7, amely az *ilv* 1-92 mutációra homozigóta.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

A vizsgált vegyületek oldatait és a kontrollt a megfelelő vivőanyag felhasználásával közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt kell elkészíteni. Vízben nem oldódó szerves vegyületek esetében 2 térfogatszázalékos koncentrációt nem meghaladó szerves oldószer, például etanol, aceton vagy dimetil-szulfoxid (DMSO) használható. A vivőanyag a végső koncentrációban nem befolyásolhatja jelentősen a sejtek életképességét és növekedési jellemzőit.

▼B

Az anyagcsere aktiválása

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának egy megfelelő exogén anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában is ki kell tenni.

A leggyakrabban használt rendszer az enzimindukáló szerrel előkezelt rágcsálómáj szövetből készített poszt-mitokondriális frakció kofaktorral kiegészítve. Az anyagcsere-aktiválásra más fajok, szövetek, poszt-mitokondriális frakciók vagy eljárások használata is alkalmas lehet.

Vizsgálati körülmények

Indikátor törzsek

A génmutációs vizsgálatok során leggyakrabban alkalmazott törzs a haploid XV 185-14C és a diploid, D_7 jelzésű törzs. Más törzsek is megfelelőek lehetnek.

Tápoldatok

A mutáns- és a túlélősejt-számok meghatározásához a megfelelő tenyésztési tápoldatokat kell alkalmazni.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Pozitív, kezeletlen és oldószeres kontrollokat egyidejűleg kell alkalmazni. Minden egyes mutációs végponthoz a megfelelő pozitív kontrollvegyületeket kell használni.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyagnak legalább öt, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. Mérgező anyagoknál a legnagyobb vizsgált koncentráció a túlélési arányt nem csökkentheti 5–10 %-ot meghaladó mértékben. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig kell vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

Inkubációs körülmények

A lemezeket négy-hét napig 28–30 °C hőmérsékleten, sötétben kell inkubálni.

Spontán mutációs gyakoriság

Az általánosan elfogadott normál tartományon belüli spontán mutációs gyakorisággal rendelkező szubkultúrákat kell használni.

▼B

A lemezek száma

A génmutációval előállított prototrófok, illetve a sejtéletképesség vizsgálatára valamennyi koncentráció esetében legkevesebb három lemezt kell alkalmazni. A *hom* 3-10-hez hasonló alacsony mutációs gyakoriságú markereket használó meghatározások során azonban meg kell növelni a lemezek számát, hogy statisztikailag értékelhető mennyiségű adatot kapjunk.

A kísérlet végrehajtása

A *S. cerevisiae* törzsek kezelését rendszerint folyékony közeges eljárással végezzük, amely stabil vagy növekedési fázisban levő sejteket alkalmaz. Az induló vizsgálatokat osztódó sejteken kell végezni: folyamatos rázás mellett 1-5 × 10^7 sejt/ml koncentrációjú élesztőgombát kezelnek a vizsgált anyaggal legfeljebb 18 órán át, 28–37 ^{o}C hőmérsékleten; ha szükséges, a megfelelő mennyiségben anyagcsere-aktiváló rendszert is adnak hozzá kezelés közben. A kezelés végén a sejteket centrifugálják, kimossák, és megfelelő táptalajon szétterítik. Inkubáció után a lemezeken kell megszámolni a túlélő sejteket és a génmutáció kialakulását. Ha az első vizsgálat negatív eredményt ad, egy második meghatározást is kell végezni, stabil, nem osztódó sejtek felhasználásával. Ha az első vizsgálat pozitív, azt egy megfelelő független kísérlettel kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva a megszámolt telepek számát, a mutánsok számát, a túlélési arányt és a mutációs gyakoriságot. Valamennyi eredményt független vizsgálatokkal kell megerősíteni. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a felhasznált törzs,

— a vizsgálat körülményei: stabil, nem osztódó állapotú vagy osztódó sejtek, a tápfolyadékok összetétele, az inkubációs hőmérséklet és időtartam, az anyagcsereaktiváló rendszer,

— kezelési körülmények: koncentrációk, a kezelési eljárás és időtartama, a kezelési hőmérséklet, a pozitív és negatív kontrollok,

— a megszámolt telepek mennyisége, a mutánsok száma, a túlélési arány és a mutációs gyakoriság, a dózis-hatás összefüggés, ha alkalmas, az adatok statisztikai értékelése,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.16. **MITOTIKUS REKOMBINÁCIÓ-VIZSGÁLAT *SACHAROMYCES CEREVISIAE*-BEN**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba esetében a mitotikus rekombináció két gén között (vagy még gyakrabban egy gén és annak centrom erje között), illetve géneken belül mutatható ki. A két gén közötti eseményt mitotikus átkereszteződésnek (crossing over) nevezzük, és eredménye egy reciprok termék, míg a génkonverziónak nevezett, génen belüli esemény leggyakrabban nem reciprok jellegű. Az átkereszteződés rendszerint recesszív homozigóta telepek vagy szektorok előállításával mutatható ki heterozigóta törzsekben, míg a génkonverzió ugyanazon gén két hibás alléljét hordozó auxotróf heteroallélikus törzsben előállított prototróf revertáns révén vizsgálható. A mitotikus génkonverzió kimutatásához leggyakrabban alkalmazott törzs a D_4 (*ade* 2 és *trp* 5 lokuszon heteroallélikus), a D_7 (a *trp* 5 lokuszon heteroallélikus), a BZ_{34} (heteroallélikus az *arg* 4 lokuszon) és a JD1 (heteroallélikus a *his* 4 és *trp* 5 lokuszon). A vörös és a rózsaszín homozigóta szektorokat termelő mitotikus átkereszteződés kimutatására a D_5 vagy a D_7 jelzésű törzset használhatjuk (amelyek egyaránt kimutatják a mitotikus génkonverziót és az *ilv* 1-92 helyen kialakuló reverz mutációt is). Mindkét törzs heteroallélikus az *ade* 2 komplementer alléljai szempontjából.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

A vizsgált vegyületek oldatait és a kontrollt a megfelelő vivőanyag felhasználásával közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt kell elkészíteni. Vízben nem oldódó szerves vegyületek esetében 2 térfogatszázalékos koncentrációt nem meghaladó szerves oldószer, például etanol, aceton vagy dimetil-szulfoxid (DMSO) használható. A vivőanyag a végső koncentrációban nem befolyásolhatja jelentősen a sejtek életképességét és növekedési jellemzőit.

Az anyagcsere aktiválása

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának egy megfelelő exogén anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában is ki kell tenni. A leggyakrabban használt rendszer az enzimindukáló szerrel előkezelt rágcsálómáj szövetből készített poszt-mitokondriális frakció ko-faktorral kiegészítve. Az anyagcsere-aktiválásra más fajok, szövetek, poszt-mitokondriális frakciók vagy eljárások használata is alkalmas lehet.

▼B

Vizsgálati körülmények

Indikátor törzsek

A leggyakrabban alkalmazott törzs a diploid D_4, D_5, D_7 és JD1 jelzésű törzsek. Más törzsek is megfelelőek lehetnek.

Tápoldatok

A túlélő sejtek és a mitotikus rekombináció gyakoriságának meghatározásához a megfelelő tenyésztési tápoldatokat kell alkalmazni.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Pozitív, kezeletlen és oldószeres kontrollokat egyidejűleg kell alkalmazni. Minden egyes rekombinációs végponthoz a megfelelő pozitív kontrollvegyül eteket kell használni.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyagnak legalább öt, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. A figyelembe veendő tényezők közé tartozik a citotoxicitás és az oldhatóság. A legalacsonyabb koncentráció nem befolyásolhatja a sejtek életképességét. Mérgező anyagoknál a legnagyobb vizsgált koncentráció nem csökkentheti a túlélési arányt 5–10 %-ot meghaladó mértékben. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig kell vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

A sejteket nyugalmi, nem osztódó állapotban vagy osztódáskor kell a vizsgált anyaggal legfeljebb 18 órán keresztül kezelni. Mindazonáltal a hosszú kezelési idők alatt a sejtkultúrát mikroszkóppal kell vizsgálni, hogy nem képződtek-e spórák, amelyek jelenléte érvénytelenné teszi a vizsgálatot.

Inkubációs körülmények

A lemezeket négy-hét napig 28–30 °C hőmérsékleten, sötétben kell inkubálni. A mitotikus átkereszteződés révén képződött vörös és rózsaszín homozigóta szektorok kimutatására használt lemezeket még további egy vagy két napig kell hűtve (körülbelül 4 °C-on) tartani a számlálás előtt a megfelelő, pigmentált telepek kifejlődése érdekében.

Spontán mitotikus rekombinációs gyakoriság

Általánosan elfogadott, normál spontán mitotikus rekombinációs gyakorisággal rendelkező szubkultúrákat kell használni.

▼B

A lemezek száma

A génmutáció révén keletkezett prototrófok, illetve a sejtéletképesség vizsgálatára valamennyi koncentráció esetében legkevesebb három lemezt kell egyidejűleg alkalmazni. A mitotikus átkereszteződés által létrehozott recesszív homozigózis vizsgálatakor azonban meg kell növelni a lemezek számát, hogy megfelelő mennyiségű telepet kapjunk.

A kísérlet végrehajtása

A *S.cerevisiae* törzsek kezelését rendszerint folyékony közeges eljárással kell végezni, amely stabil vagy növekedési fázisban levő sejteket alkalmaz. Az induló vizsgálatokat osztódó sejteken kell végezni: folyamatos rázás mellett 1-5 × 10^7 sejt/ml koncentrációjú élesztőgombát kell kezelni a vizsgált anyaggal legfeljebb 18 órán át, 28–37 °C hőmérsékleten; ha szükséges, a megfelelő mennyiségben anyagcsere-aktiváló rendszert is adunk hozzá kezelés közben.

A kezelés végén a sejteket centrifugálni kell, ki kell mosni, és megfelelő táptalajon szét kell teríteni. Inkubáció után a lemezeken meg kell számolni a túlélő sejteket és a génmutáció kialakulását.

Ha az első vizsgálat negatív eredményt ad, egy második meghatározást is kell végezni, stabil, nem osztódó sejtek felhasználásával. Ha az első vizsgálat pozitív, azt egy megfelelő független kísérlettel kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva a megszámolt telepek számát, a rekombinánsok számát, a túlélési arányt és a rekombinációs gyakoriságot.

Valamennyi eredményt független vizsgálatokkal kell megerősíteni.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a felhasznált törzs,

— a vizsgálat körülményei: stabil, nem osztódó állapotú vagy osztódó sejtek, a tápfolyadékok összetétele, az inkubációs hőmérséklet és időtartam, az anyagcsere-aktiváló rendszer,

— kezelési körülmények: koncentrációk, a kezelési eljárás és időtartama, a kezelési hőmérséklet, a pozitív és negatív kontrollok,

— a megszámolt telepek mennyisége, a rekombinánsok száma, a túlélési arány és a rekombinációs gyakoriság, a dózis-hatás összefüggés, ha alkalmas, az adatok statisztikai értékelése,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

▼B

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.17. MUTAGENITÁS – *IN VITRO* GÉNMUTÁCIÓ-VIZSGÁLAT EMLŐSSEJTEKEN

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 476-nak, *in vitro* génmutáció-vizsgálat emlőssejteken (1977).

1.1. BEVEZETÉS

Az *in vitro* génmutáció-vizsgálat emlőssejteken kémiai anyagok által előidézett génmutációk észlelésére használható. Alkalmas sejtvonalak például az L5178Y egér limfomasejtek, a CHO, CHO-AS52-es és V79-es kínai hörcsög sejtvonalak és a TK6-os emberi limfoblasztoid törzsek (1). E törzsekben a legáltalánosabban használt genetikai végpontok a mutációt a timidin kinázban (TK) hipoxantin-guanin foszforibozil-transzferázban (HPRT) és a xantin-guanin foszforibozil-transzferáz (XPRT) transz-génjében mérik. A TK, HPRT és XPRT mutáció vizsgálatok a genetikai események különböző spektrumát észlelik. A TK és XPRT autosom helye lehetővé teheti az X-kromoszómákon a HPRT helyen nem észlelt genetikai események (például nagy delíciók) észlelését (2), (3), (4), (5), (6).

Az emlőssejteken végzett *in vivo* sejt génmutáció vizsgálatban megállapodott sejtvonalak és törzsek tenyészetei használhatók. A felhasznált sejtek a tenyészetben való növekedési képesség és a spontán mutációs gyakoriság stabilitása alapján kerülnek kiválasztásra.

Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatokhoz rendszerint a metabolikus aktiválás valamilyen exogén forrásának használata szükséges. E metabolikus aktiváló rendszer nem tudja teljes mértékben utánozni az emlős *in vivo* körülményeket. Ki kell szűrni azon körülményeket, amelyek fennállása esetén olyan pozitív eredmények születnek, amelyek nem tükrözik a belső mutációt előidéző képességet és valószínűleg a pH, ill. az ozmolalitás változásából vagy a magas citotoxicitási szintből származnak (7).

E vizsgálat azon anyagok kiszűrésére használható, amelyek mutációt idézhetnek elő és rákot okozhatnak emlősállatok esetében. Az e vizsgálatban pozitív eredményt adó számos vegyület emlősállatok esetében rákkeltő vegyület; azonban nincs tökéletes korreláció az itt ismertetett vizsgálat és a rákkeltő képesség között. A korreláció függ a vizsgált anyag kémiai osztályától és egyre több bizonyíték van arra, hogy léteznek olyan karcinogén anyagok, amelyeket e vizsgálat nem észlel, mivel úgy tűnik, hogy más, nem genotoxikus mechanizmusokon keresztül vagy olyan mechanizmusokon keresztül fejtik ki a hatásukat, amelyek nincsenek jelen baktériumokban (6).

Lásd még az Általános bevezetés B részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Előre/oda (forward) mutáció: a mutáns alak szülőktől származó típusától eltérő olyan génmutáció, amely a kódolt protein enzimaktivitásának változását vagy elvesztését eredményezi.

Báziscserét okozó mutagének: azok az anyagok, amelyek egy vagy több bázispár szubsztitúcióját okozzák a DNS-ben.

Frameshift mutagének: azok az anyagok, amelyek egy vagy több bázispár addícióját vagy delícióját okozzák a DNS molekulához vagy molekulából.

▼B

Fenotípusos expressziós idő: z az időtartam, amely során a meg nem változott (eredeti) géntermékek kiürülnek az újonnan mutálódott sejtekből.

Mutációs gyakoriság: a megfigyelt mutáns sejtek aránya az életképes sejtek számával osztva.

Relatív össznövekedés: a sejtek számának növekedése az idő függvényében a sejtek kontrollpopulációjával összehasonlítva; ez a negatív kontrollhoz viszonyított szuszpenziós növekedés és a negatív kontrollhoz viszonyított klónképző készség szorzata.

Relatív szuszpenziós növekedés: a sejtszám növekedése az expressziós időtartam során a negatív kontrollhoz viszonyítva.

Életképesség: a kezelt sejtek klónozási hatékonysága szelektív körülmények között, szelektív médiumba való leültetés idején, az expressziós időszak után.

Túlélési ráta: a kezelt sejtek klónképző készsége a kezelési időszak végén; a túlélést rendszerint a kontroll sejtpopuláció túléléséhez viszonyítva fejezik ki.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A $TK^{+/-} > TK^{-/-}$ mutáció miatt timidin kináz deficiens sejtek ellenállnak a pirimidin bázisanalóg trifluoro-timidin (TFT) citotoxikus hatásainak. A timidin-kináz proficiens sejtek érzékenyek a TFT-re, ami a celluláris metabolizmus gátlását okozza, és megállítja a további sejtosztódást. Így tehát a mutáns sejtek képesek sejtburjánzásra TFT jelenlétében, míg a normál sejtek, amelyek timidin-kinázt tartalmaznak, nem képesek erre. Ehhez hasonlóan, a HPRT vagy XPRT deficiens sejtek 6-thioguaninnal (TG) vagy 8-azaguaninnal (AG) szembeni rezisztencia alapján választhatók ki. A vizsgált anyag tulajdonságait gondosan szemügyre kell venni, ha bázisanalógot vagy a szelektív ágenshez hasonló vegyületet vizsgálunk az emlőssejt génmutáció vizsgálatok valamelyikében. Például megvizsgáljuk a vizsgált anyag által gyaníthatóan okozható szelektív toxicitást a mutáns és nem mutáns sejtek tekintetében. Így kell megerősíteni a kiválasztó rendszer/hatóanyag megfelelőségét a szelektív ágenshez szerkezetileg hasonló kémiai anyagok vizsgálatakor (8).

Szuszpenzióban vagy egy rétegben növő tenyészetben (monolayer) lévő sejteket kezelünk a vizsgált anyaggal, metabolikus aktiválással és anélkül, megfelelő időtartamig, a citotoxicitás meghatározására és a fenotipusos expresszió lehetővé tételére a mutáns kiválasztása előtt (9), (10), (11), (12), (13). A citotoxicitást rendszerint a kezelési időtartam után a tenyészetek relatív klónképző készségnek (túlélési ráta) vagy relatív össznövekedésnek mérésével lehet meghatározni. A kezelt tenyészeteket elegendő időtartamig, amely a kiválasztott lokuszok és sejttípusok jellemzője, tartjuk a tápfolyadékban az előidézett mutációk közel optimális fenotipusos expressziójának lehetővé tételére. A mutációs gyakoriságot úgy határozzuk meg, hogy leültetünk ismert számú sejtet a szelekciós ágenst tartalmazó tápfolyadékba a mutáns sejtek kimutatására, valamint a szelekciós ágenst nem tartalmazó tápfolyadékban lévő ismert számú sejtre a klónképző készség (életképesség) meghatározására. Megfelelő inkubációs idő után megszámolják a telepeket. A mutációs gyakoriságot a szelektív médiumban lévő mutáns telepek és a nem szelektív táptalajban lévő telepek számából határozzák meg.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *Sejtek*

Különböző sejttípusok állnak rendelkezésre e vizsgálathoz, ilyenek például az L5178Y, CHO, CHO-AS52, V79 vagy TK6-os sejtek szubklónjai. Az e vizsgálatban használt sejttípusoknak bizonyítottan érzékenyeknek kell lenniük a kémiai mutagén anyagokra, magas klónképző készséggel és alacsony spontán mutációs gyakorisággal kell rendelkezniük. A sejteket ellenőrizni kell mikoplazma-szennyeződés szempontjából, és nem szabad használni azokat, ha szennyezettek.

A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy előre meghatározott érzékenységű és hatásosságú legyen. A sejtek számának, tenyészeteknek és a használt vizsgált anyag koncentrációinak e meghatározott paramétereket kell tükrözniük (14). A kezelést túlélők és az e vizsgálatban az egyes szakaszokban használt életképes sejtek minimális számának a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Általános iránymutatás, hogy olyan sejtszámot kell használni, amely legalább 10-szerese a spontán mutációs gyakoriság inverzének. Azonban ajánlatos legalább 10^6 sejt használata. A használt sejtrendszerre vonatkozó megfelelő történeti adatoknak kell rendelkezésre állniuk a vizsgálat ellentmondásmentességének igazolására.

1.4.1.2. *Tápfolyadék és tenyésztési körülmények*

Megfelelő tápfolyadékot és inkubációs körülményeket (tenyésztő edények, hőmérséklet, CO^2 -koncentráció és páratartalom) kell biztosítani. A tápfolyadékot az e vizsgálatban használt szelekciós rendszereknek és sejttípusnak megfelelően választják ki. Olyan inkubációs körülményeket kell létrehozni, hogy biztosítva legyen a sejtek növekedése az expressziós időszak során és mind a mutáns, mind a nem mutáns sejtek kolóniaképzése optimális legyen.

1.4.1.3. *Tenyészetek előkészítése*

A sejteket törzstenyészetekről kell felszaporítani, leültetni tápfolyadékba és 37 °C hőmérsékleten inkubálni. A tenyészeteket, mielőtt e vizsgálatban felhasználnák, lehet hogy meg kell tisztítani az előzetesen már létező mutáns sejtektől.

1.4.1.4. *Metabolikus aktiválás*

A sejteket a vizsgált anyaggal kezelik, mind megfelelő metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében, mind anélkül. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorral kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amelyet enziminducerrel, ilyen például az Aroclor 1254 (15), (16), (17), (18), vagy a fenobarbiturát és β-naftoflavon (19), (20) kombinációjával kezelt rágcsálók májából készítettek.

A posztmitokondriális frakciót rendszerint 1–10 térfogatszázalék koncentráció tartományban használják a végtérfogatban. Valamely metabolikus aktiváló rendszer kiválasztása és állapota függhet a vizsgálatra kerülő kémiai anyag osztályától. Meghatározott esetekben megfelelőnek bizonyulhat a posztmitokondriális frakció egynél több koncentrációjának használata.

▼B

Számos fejlesztés, beleértve a speciális aktiváló enzimeket eltávolító, genetikailag szerkesztett törzsek létrehozását is, biztosíthatja az endogén aktiválás lehetőségét. A használt törzsek kiválasztását tudományosan indokolni kell (például a vizsgált anyag anyagcseréjéhez a citokróm P450-es izoenzim alkalmazásának relevanciájával).

1.4.1.5. *A vizsgált anyag/előkészítés*

A szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben, vagy ha szükséges, hígítani kell a baktérium kezelése előtt. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül hozzáadhatók a vizsgált rendszerekhez és/vagy hígíthatók kezelés előtt. Friss készítményeket kell használni, kivéve ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát jelzik.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer*

Oldószerként nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal, és összeegyeztethetőnek kell lennie a baktérium túlélésével és az S9-es aktivitással. Ha a jól ismert oldószertől eltérő oldószereket használnak, ezek használatát alá kell támasztani a kompatibilitásukat jelző adatokkal. Elsőként valamilyen vizes oldószer használatát kell megfontolni. Vízben instabil anyagok vizsgálatakor a használt szerves oldószereknek vízmenteseknek kell lenniük. A víz valamilyen molekulaszűrő alkalmazásával távolítható el.

1.4.2.2. *Expozíciós koncentrációk*

A legnagyobb koncentráció meghatározásakor megfontolandó kritériumok közé a következők tartoznak: citotoxicitás, a vizsgálati rendszerben való oldhatóság és pH-érték vagy ozmolalitás változások.

A citotoxicitást a fő kísérletben metabolikus aktiválással és anélkül határozzák meg a sejtintegritás és szaporodás olyan megfelelő mutatóinak segítségével, mint például a relatív klónképző készség (túlélési ráta) vagy a relatív össznövekedés. Hasznosnak bizonyulhat a citotoxicitás és az oldékonyság meghatározása előzetes kísérletben.

Legalább négy elemezhető koncentrációt kell használni. Ahol létezik citotoxicitás, e koncentrációknak át kell fogniuk egy a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt; ez rendszerint azt fogja jelenteni, hogy a koncentrációszinteket nem nagyobb, mint egy 2 és √10 közötti tényező választja el egymástól. Ha a legnagyobb koncentráció a citotoxicitáson alapul, ennek körülbelül 10–20 % (de nem kevesebb, mint 10 %) relatív túlélést (relatív klónképző készséget) vagy relatív össznövekedést kell eredményeznie. Viszonylag nem citotoxikus anyagok esetében a legnagyobb vizsgált koncentrációnak 5 mg/ml-nek, 5 μl/ml-nek vagy 1,01 M-nak, amelyik ezek közül a legkisebb, kell lennie.

▼B

A rosszul oldódó anyagokat a tenyésztési körülmények melletti oldékonyságuk határáig vagy azon túl kell vizsgálni. Meg kell határozni az oldhatatlanság bizonyítékát abban a végső kezelési médiumban, amely hatásainak a sejtek ki vannak téve. Hasznosnak bizonyulhat az oldékonyság értékelése a kezelés kezdetén és végén, mivel az oldékonyság változhat a vizsgálati rendszerben az expozíció során a sejtek, S9, és a szérum stb. jelenléte miatt. Az oldódás hiánya szabad szemmel észlelhető. A kicsapódás nem befolyásolhatja az értékelést.

1.4.2.3. *Kontrollanyagok*

Minden kísérletben negatív és pozitív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagot használnak egyidejűleg, metabolikus aktiválással és anélkül. Metabolikus aktiválás alkalmazásakor a pozitív kontroll kémiai anyagnak olyannak kell lennie, amely a mutagén reakció kiváltásához aktiválást igényel.

A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

Aktivációs körülmények	Lokusz	Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
Exogén metabolikus aktiválás nélkül	HPRT	Etil-metán-szulfonát	62-50-0	200-536-7
		N-etil-N-nitrozo-karbamid	759-73-9	212-072-2
	TK (kicsi és nagy telepek)	Metil-metán-szulfonát	66-27-3	200-625-0
	XPRT	Etil-metán-szulfonát	62-50-0	200-536-7
		N-etil-N-nitrozo-karbamid	759-73-9	212-072-2
Exogén metabolikus aktiválással	HPRT	3 -Metil -kol antrén	56-49-5	200-276-4
		N-nitrozo-dimetil-amin	62-75-9	200-549-8
		7,12-Dimetil-benz[a]antracén	57-97-6	200-359-5
	TK (kicsi és nagy telepek	Ciklofoszfamid	50-18-0	200-015-4
		Ciklofoszfamid monohidrát	6055-19-2	
		Benz[a]pirén	50-32-8	200-028-5
		3 -Metil -kol antrén	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrozo-dimetil-amin (magas S9-es szintekhez)	62-75-9	200-549-8
		Benz[a]pirén	50-32-8	200-028-5

Használhatók más megfelelő pozitív kontroll referenciaanyagok, például ha valamely laboratórium rendelkezik 5-Bróm 2'-dezoxi-uridinre vonatkozó (Cas-száma 59-14-3, Einecs-száma 200-415-9) történeti adatbázissal, e referenciaanyag is használható. Azon pozitív kontroll kémiai anyagok használatát is meg kell fontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos kémiai osztályba tartoznak, ha rendelkezésre állnak ilyenek.

▼B

Használni kell negatív kontrollanyagokat, amelyek csak oldószert vagy vivőanyagot tartalmaznak a kezelési médiumban, és a kezelésük ugyanolyan módon történik, mint a kezelt csoportoké. Ezenkívül nem kezelt kontrollokat is használni kell, kivéve, ha léteznek olyan történeti kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy semmilyen káros vagy mutagén hatása nincs a kiválasztott oldószernek.

1.4.3. **A kísérlet végrehajtása**

1.4.3.1. *Kezelés a vizsgált anyaggal*

A proliferáló sejteket kezelni kell a vizsgált anyaggal, mind metabolikus aktiválással, mind anélkül. Az expozíciónak alkalmas időtartamig kell tartania (ez rendszerint 3–6 óra). Az expozíciós idő kiterjedhet egyetlen vagy több sejtciklusra.

Minden egyes vizsgált koncentrációhoz két párhuzamos vagy egy (szimpla) kezelt tenyészet használható. Szimpla tenyészetek használatakor meg kell növelni a koncentrációk számát az elemzéshez megfelelő számú tenyészet biztosítása érdekében (legalább 8 elemezhető koncentráció létezzen). Két párhuzamos negatív (oldószer) kontrolltenyészetet kell használni.

Gázok vagy illékony anyagok megfelelő módszerekkel, például légmentesen zárt edényekben vizsgálhatók (21), (22).

1.4.3.2. *A túlélési ráta, az életképesség és mutációs gyakoriság meghatározása*

Az expozíciós időszak végén a sejteket le kell mosni, begyűjteni és leültetni a klónképző készség meghatározása és a mutáns fenotípusok eltávolításának érdekében. A citotoxicitás mérését a tenyészetek relatív klónképző készségének (túlélési ráta) vagy a relatív össznövekedésének meghatározásával, rendszerint a kezelési időtartam után kell megkezdeni.

Minden egyes lokusznak szüksége van egy meghatározott minimális időre az újonnan indukált mutánsok közel optimális fenotípusos kifejlődéséhez (a HPRT és XTRT legalább 6–8 napot és a TK legalább 2 napot igényel). A sejteket szelektív ágenst tartalmazó tápfolyadékban kell tenyészteni a mutánsok számának, illetve a klónképző készség hatékonyságának meghatározása céljából. Az életképesség (amelyet a mutációs gyakoriság kiszámítására használunk) mérése az expressziós idő végén kezdődik nem szelektív médiumba való ültetéssel.

Ha a vizsgált anyag az L5178Y $TK^{+/-}$ vizsgálatban pozitív eredményt ad, telepméretmegállapítást kell végezni a vizsgált tenyészetek közül legalább egynél (a legnagyobb pozitív koncentrációnál) és a negatív és pozitív kontrolloknál. Ha a vizsgált anyag az L5178Y $TK^{+/-}$ vizsgálatban negatív eredményt ad, a telepméret-megállapítást a negatív és pozitív kontrollokon kell végrehajtani. A $TK6TK^{+/-}$-t használó vizsgálatokban is végrehajtható telepméret megállapítás.

▼B

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Meg kell adni a citotoxicitást és az életképességet, telepszámokat és mutációs gyakoriságot a kezelt és kontrolltel epek tekintetében. Ha az L5178Y $TK^{+/-}$ vizsgálat pozitív eredményt ad, a telepeket a kis és nagy telepek kritériuma segítségével értékelik a vizsgált anyag legalább egy koncentrációja (legnagyobb pozitív koncentráció) mellett és a negatív és pozitív kontroll esetében. Már részletesen megvizsgálták mind a nagy, mind a kis telepmutánsok molekuláris és citogenetikus természetét (23) (24). A $TK^{+/-}$ vizsgálatban a telepeket a normálisan növekvő (nagy) és lassan növekvő (kis) telepek kritériuma segítségével értékelik (25). A jelentős mértékű genetikai károsodást szenvedett mutáns sejtek esetében meghosszabbodtak a kétszerezési idők, és így ezek kis telepeket alkotnak. E károsodás jellemzően a teljes génveszteségektől a kariotípusosan felismerhető kromoszóma-rendellenességekig terjed. A kis telepmutánsok létrejötte nagymértékű kromoszóma-rendellenességeket előidéző kémiai anyagokkal volt kapcsolatos (26). A kevésbé súlyosan érintett mutáns sejtek a szülősejtekhez hasonló ütemben növekednek és nagy telepeket alkotnak.

Meg kell adni a túlélési rátát (relatív klónképző készség) vagy a relatív össznövekedést. A mutációs gyakoriságot a mutáns sejtek száma és a túlélő sejtek száma hányadosaként kell kifejezni.

Fel kell jegyezni az egyes tenyészetek adatait. Ezen adatokat táblázat formájában kell összefoglalni.

A nyilvánvalóan pozitív reakció igazolása nem szükséges. A többféleképpen magyarázható eredményeket további, lehetőleg a kísérleti körülmények módosításával végrehajtott vizsgálattal kell tisztázni. A negatív eredményeket külön kísérletekkel kell megerősíteni. Azon esetekben, ahol nem tekintik szükségesnek a negatív eredmények megerősítését, meg kell indokolni e döntést. Megfontolandó az utólagos ellenőrző kísérletekben a vizsgált körülmények tartományának kiterjesztése érdekében a vizsgálati paraméterek módosítása. A módosítható vizsgálati paraméterek, többek között, a koncentráció intervallumok és a metabolikus aktiválás.

2.2. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a mutációs gyakoriság koncentrációval kapcsolatos növekedése vagy reprodukálható növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények kiértékelésének elősegítésére. Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

▼B

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az emlős *in vitro* sejt génmutáció vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált anyag génmutációkat idéz elő a felhasznált, tenyésztett emlőssejtekben. A reprodukálható pozitív koncentráció-hatás viszonynak van a legnagyobb jelentősége. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem idéz elő génmutációkat a felhasznált, tenyésztett emlőssejtekben.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/-vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

— sejtek típusa és eredete,

— sejttenyészetek száma,

— passzálások száma, ha van ilyen,

— sejttenyészet fenntartásának módszerei, ha van ilyen,

— micoplazma hiánya.

Vizsgálati körülmények:

— koncentrációk és tenyészetek száma kiválasztásának indoklása, beleértve például a citotoxicitási adatokat és az oldékonysági határokat, ha rendelkezésre állnak,

— tápfolyadék összetétele, CO^2-koncentráció,

— a vizsgált anyag koncentrációja,

— az oldószer és a hozzáadott vizsgált anyag mennyisége,

— inkubációs hőmérséklet,

— inkubációs idő,

— kezelés időtartama,

— sejtsűrűség a kezelés időtartama alatt,

— metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, az elfogadhatósági kritériumot is ideértve,

— pozitív és negatív kontrollok,

▼B

— expressziós időtartam hosszúsága (beleértve a leültetett sejtek számát, szubtenyészeteket és tápfolyadékok cseréjét),

— szelekciós ágens,

— kritériumok, amelyek eldöntik, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekintendők-e,

— az életképes és mutáns sejtek számának megállapítására használt módszerek,

— azon telepek meghatározása, amelyek méretét és típusát figyelembe vettük (beleértve a „kis” és „nagy” telepekre vonatkozó kritériumokat is).

Eredmények:

— toxicitás jelei,

— kicsapódás jelei,

— a kezelési médium pH-jára és ozmolalitására vonatkozó adatok, ha ezek meghatározásra kerültek,

— telepméret, ha kiértékelésre került legalább a pozitív és negatív kontrollok esetében,

— a laboratórium alkalmassága a kis telepmutánsok észlelésére az L5178Y $TK^{+/-}$ rendszerrel, ahol szükséges,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzés, ha van ilyen,

— az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatai,

— történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatok, tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel.

— mutációs gyakoriság.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindal, K. R. (eds.) (1987), Banbury Report 28; Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York

(2) Chu, E. H. Y. and Mailing H. V. (1968), Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci. 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. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 196, pp. 17-36

(10) Li. A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. V., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, 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-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, Mutation Res,. 189, pp. 135-141

(11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci 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., Tindal., K. R. and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, Mutation Res. 160, pp. 133-147

(13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure 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 S. 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 Mazzaccoro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, Mutation Res. 46, pp. 365-373

(16) 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

▼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 Ames, 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. 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, pp. 175-177

(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, 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: Ticce, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), Genotoxic Effects of Airbone 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. Sci, 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 Trifluoronthymidine, Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res. 151, pp. 161-174

(25) Yandell, D. W., Dryja, T. P. and Little, 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. **DNS-KÁROSODÁS ÉS -REPARÁCIÓ – NEM TERVEZETT DNS-SZINTÉZIS (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS, UDS) – EMLŐSSEJTEK *IN VITRO***

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A nem szabályszerű DNS-szintézis- („unscheduled DNA synthesis”, UDS) vizsgálat a kémiai vagy fizikai hatással indukált károsodás területéről kimetszett és eltávolított DNS-szakasz helyreállításához szükséges DNS-szintézist vizsgálja. A meghatározás alapja a tríciummal jelölt timidin (^{3}H-TdR) beépülése olyan emlőssejtek DNS-molekuláiba, amelyek nem a sejtciklus S fázisában vannak. A ^{3}H-TdR felvétele a kezelt sejtek DNS-molekuláiba autoradiográfiás technikával vagy folyadékszcintillációval (LSC = liquid scintillation counting) mérhető. Azt az esetet kivéve, amikor primer patkány máj sejtet alkalmaznak, a kultúrában tenyésztett emlőssejteket exogén anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében, illetve hiányában kezelik a vizsgált anyaggal. Az UDS folyamata *in vivo* rendszerekben is mérhető.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

A vizsgált anyagokat, a kontroll-, illetve a referenciaanyagokat a sejtek kezelését megelőzően tápfolyadékban kell előkészíteni, vagy a megfelelő vivőanyagban feloldani, illetve szuszpendálni, majd a tápfolyadékban tovább hígítani a vizsgálathoz használatos mértékben. A vivőanyag végső koncentrációja a kultúrában nem befolyásolhatja a sejtek életképességét.

A vizsgálathoz patkánymájsejtek, illetve emberi limfociták primer kultúrái vagy stabil sejtvonalak (például emberi diploid fibroblasztok) használhatók.

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő emlősanyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában is ki kell tenni.

Vizsgálati körülmények

A kultúrák száma

Legalább két kultúra kell minden vizsgálati ponton az autoradiográfiás mérésekhez és hat kultúra (vagy ennél kevesebb, ha tudományosan megindokolható) az LSC UDS-meghatározáshoz.

▼B

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálathoz alkalmazni kell egyidejűleg pozitív és negatív (kezeletlen és/vagy vivőanyag-) kontrollt, metabolikus aktiválással és a nélkül.

A patkánymájsejt-vizsgálat pozitív kontrolljai sorában említendő a 7,12-dimetil-benzantracén (7,12-DMBA), illetve a 2-acetilamin-fluorén (2-AAF). Stabil sejtvonalak használata esetén a 4-nitrokinolin-N-oxid (4-NQO) lehet példa a pozitív kontrollra mind az autoradiográfiás, mind a folyadékszcintillációs módszer számára metabolikus aktiválás nélkül; ha metabolikus aktiválórendszereket is alkalmazunk, az N-dimetil-nitrózamin lehet a pozitív kontroll.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyagnak több, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. A legnagyobb vizsgált koncentráció bizonyos fokú citotoxicitást kell, hogy mutasson. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig szükséges vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

Sejtek

A sejtkultúrák fenntartását a megfelelő tápfolyadékban, CO_2-koncentráció, páratartalom és hőmérséklet mellett kell végezni. A stabil sejtvonalakat időnként ellenőrizni kell a Mycoplasma-szennyeződés szempontjából.

Anyagcsere-aktiválás

Metabolikus aktiválórendszert primer máj sejteken nem kell alkalmazni. A stabil sejtvonalakat és a limfocitákat a vizsgált anyaggal mind a megfelelő metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében, mind annak hiányában kezelni kell.

A kísérlet végrehajtása

A sejtkultúrák elkészítése

Stabil sejtvonalakat kell törzstenyészetekből (például tripszines emésztéssel vagy rázassál) létrehozni, ezeket megfelelő sűrűségben tenyésztőedényekbe kell áttenni, és 37 °C-on inkubálni.

Patkánymájsejtek rövid távú tenyészeteit úgy hozzák létre, hogy a frissen disszociált májsejteket megfelelő tápfolyadékban hagyják megtapadni a növekedési felületen.

Emberi limfocitatenyészeteket hozunk létre a megfelelő technikák alkalmazásával.

▼B

A sejttenyészetek kezelése a vizsgált anyaggal

Primer patkánymájsejtek

Frissen izolált patkánymájsejteket megfelelő időn keresztül ^{3}H-TdR-t tartalmazó tápfolyadékban kezelik a vizsgált anyaggal. A kezelési idő végén a tápfolyadékot leszívják a sejtekről, amelyeket leöblítenek, fixálnak és megszárítanak. A tárgylemezeket autoradiográfiás emulzióba merítik (vagy filmcsíkokat is használhatunk), exponálják, előhívják, megfestik és kiértékelik.

Stabil sejtvonalak és limfociták

Autoradiográfiás technikák: A sejttenyészetet a megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal, majd ezt követően ^{3}H-TdR-el. A kezelési idő a vizsgált anyag jellegétől, a metabolizáló rendszerek aktivitásától és a sejtek típusától függ. Az UDS maximumának észleléséhez a vizsgált anyaggal együtt vagy néhány perccel a vizsgált anyag adása után ^{3}H-TdR-t adnak a rendszerhez. A kétféle eljárás közötti választás attól függ, van-e kölcsönhatás a vizsgált anyag és a ^{3}H-TdR között. Az UDS és a félig konzervatív DNS-replikáció közötti különbségtétel érdekében az utóbbi például argininhiányos tápoldattal, alacsony szérumtartalommal vagy a tápoldathoz adott hidroxi-karbamiddal gátolható.

Az UDS folyadékszcintillációval történő (LSC) mérése: A vizsgált anyaggal való kezelést megelőzően a sejtek S fázisba lépését a fent leírtak szerint kell gátolni; majd az autoradiográfiás módszernél leírtak szerint kell a sejteket kezelni a vizsgált anyaggal. Az inkubációs idő végén a DNS-t kivonják a sejtekből, és meghatározzák a teljes DNS-tartalmat, illetve a ^{3}H-TdR-beépülés mértékét.

Megjegyzendő, hogy a fenti technikák során – ha emberi limfocitákat használnak – a nem stimulált tenyészetekben a félig konzervatív DNS-replikáció gátlása szükségtelen.

Elemzés

Autoradiográfiás meghatározások

Az UDS-nek a sejttenyészetben való meghatározásához az S-fázisú magokat nem kell számításba venni. Koncentrációnként legalább 50 sejtet számolnak. A tárgylemezeket számlálás előtt kóddal látják el. Minden lemezen több, véletlenszerűen választott, egymástól távol eső látóteret számolnak meg. A ^{3}H-TdR beépülését a citoplazmába úgy határozzák meg, hogy minden megszámolt sejtben három, sejtmag nagyságú citoplazma-látóteret számolnak meg.

LSC-módszerrel végzett meghatározások

Az LSC-vel végzett UDS-meghatározások során minden koncentráció és kontroll esetében megfelelő mennyiségű tenyészetet használnak fel.

▼B

Valamennyi eredményt független vizsgálatokkal kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni.

2.1. AUTORADIOGRÁFIÁS MEGHATÁROZÁSOK

A citoplazmában megfigyelhető ^{3}H-TdR-beépülés mértékét és a sejtmag felett található szemcsék számát külön kell feljegyezni.

Átlagos, közepes és modulált értéket használhatunk a ^{3}H-TdR-citoplazma eloszlási mértékének, valamint a magonként látható szemcsék számának jellemzésére.

2.2. LSC-MÓDSZERREL VÉGZETT MEGHATÁROZÁSOK

Az LSC-módszerrel végzett meghatározások esetén a ^{3}H-TdR-beépülést dpm/μg DNS-ben fejezzük ki. Az átlagos dpm/μg DNS-érték a normál szórással együtt felhasználható a beépülés eloszlásának leírására.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a felhasznált sejtek, a sejtek sűrűsége és a passzálások száma kezeléskor, a sejtkultúrák száma,

— a sejtkultúrák fenntartásához használt módszerek: tápfolyadékok, hőmérséklet, szén-dioxidkoncentráció,

— a vizsgált anyag, a vivőanyag, koncentrációik és a vizsgálathoz használt koncentrációk indokolása,

— a felhasznált metabolikus aktiválórendszerrel kapcsolatos adatok,

— a kezelési protokoll,

— a pozitív és a negatív kontrollok,

— a használt autoradiográfiás eljárás,

— a sejtek S fázisba lépésének megakadályozására használt eljárások,

— a DNS kivonására és a teljes DNS-tartalom meghatározására használt eljárások az LSC technika során,

— a dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,

— az eredmények statisztikai feldolgozása,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

▼B

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.19. *IN VITRO* EMLŐSSEJTTESTVÉR-KROMATIDKICSERÉLŐDÉS-(SISTER CHROMATID EXCHANGE, SCE) VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A testvérkromatidcsere- (SCE = Sister Chromatid Exchange) vizsgálat a megkettőződő kromoszóma két testvérkromoszóma-állománya (kromatidja) közötti reciprok DNS-csere kimutatására szolgáló, rövid távú módszer. Az SCE technika gyakorlatilag homológ lokuszok közötti DNS-replikációs termékek cseréjét jelenti. A csere feltehetően a DNS-lánc eltörését és újbóli összeforrását is magában foglalja, bár a jelenség molekuláris háttere kevéssé ismert. Az SCE jelenségének észleléséhez a testvérkromoszóma-állományok eltérő jelölésére van szükség, amely úgy valósítható meg, hogy két sejtcikluson át bróm-dezoxi-uridint (BrdU) építenek be a kromoszomális DNS-molekulába.

Az emlőssejteket *in vitro*, metabolikus aktiválórendszer jelenlétében, illetve a nélkül kezelik a vizsgált anyaggal, amennyiben ez megfelelő, majd a sejteket két replikációs cikluson keresztül tenyésztik BrdU-t tartalmazó tápoldatban. Az orsóképződést gátló anyaggal való kezelést (pl. kolchicin) követően, amely azt a célt szolgálja, hogy a sejteket a mitózisnak egy metafázisszerű szakaszában (c-metafázis) gyűjtse össze, a sejteket összegyűjtik, és kromoszómakészítményeket állítanak elő.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

— A vizsgálathoz primer tenyészetek (emberi limfociták) vagy stabil sejtvonalak (pl. kínaihörcsögpetefészek-sejtek) használhatók. A sejtvonalakat ellenőrizzük Mycoplasma-szennyeződés szempontjából.

— Megfelelő tápoldatot és inkubációs feltételeket (pl. hőmérséklet, tenyésztőedény, CO_2-koncentráció, páratartalom) kell biztosítani.

— A vizsgált anyagot tápoldatban készítik el, vagy a sejtek kezelését megelőzően a megfelelő vivőanyagban oldják, illetve szuszpendálják. A vivőanyag végleges koncentrációja a tápközegben nem befolyásolhatja jelentős mértékben a sejtek életképességét, illetve szaporodását, az SCE gyakoriságára gyakorolt hatását pedig oldószeres kontrollal kell ellenőrizni.

▼B

— A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában egyaránt ki kell tenni. A másik lehetőség, hogy belső metabolikus aktivitással rendelkező sejttípusokat használnak, ám ilyenkor az aktivitás jellegét és mértékét ismerni kell, hogy az megfeleljen a vizsgált kémiai osztálynak.

1.6.2. *Vizsgálati körülmények*

Kultúrák száma

Minden vizsgálati ponthoz legalább két kultúrát kell használni.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálatnak pozitív kontrollként tartalmaznia kell egy közvetlenül ható vegyületet és egy metabolikus aktiválást igénylő vegyületet is; ezenkívül negatív (vivőanyag-) kontrollt is kell használni.

Néhány példa a pozitív kontrollként felhasználható anyagokra:

— közvetlenül ható vegyületek:

  — etil-metán-szulfonát,

— közvetve ható vegyületek:

  — ciklofoszfamid.

Ahol szükséges, alkalmazni lehet még egy pozitív kontrollt is, amely a vizsgált anyaggal egyező vegyületosztályba tartozik.

Expozíciós koncentrációk

A vizsgált anyagnak legalább három, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. A legnagyobb vizsgált koncentrációnak jelentős toxikus hatást kell kiváltania, de ezzel együtt megfelelő mértékű sejtosztódást kell lehetővé tennie. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig kell vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

1.6.3. *A kísérlet végrehajtása*

Sejttenyészetek készítése

Stabil sejtvonalakat hoznak létre törzstenyészetekből (például tripszines emésztéssel vagy rázassál), ezeket megfelelő sűrűségben tenyésztőedényekbe teszik át, és 37 °C-on inkubálják. Egy sejtrétegű (monolayer) kultúrákhoz a tenyésztőedényenkénti sejtszámot úgy kell beállítani, hogy a tenyésztési időszak végén (az összegyűjtéskor) a sejtréteg folyamatossága ne haladja meg jelentősen az 50 %-os arányt. A sejteket másik lehetőségként szuszpenziós tenyészetben is tarthatják. Az emberi limfocitatenyészeteket heparinnal kezelt vérből állítják elő a megfelelő technikával, és 37 °C-on inkubálják.

▼B

Kezelés

Az exponenciális osztódási szakaszban lévő sejteket a vizsgált anyaggal megfelelő időn keresztül kezelik; a legtöbb esetben egy vagy két óra elegendő, de a kezelés bizonyos esetekben meg is hosszabbítható két teljes sejtciklus erejéig. A megfelelő szintű saját metabolikus aktivitással nem rendelkező sejteket a vizsgált anyaggal a megfelelő metabolikus aktiválórendszer jelenlétében, illetve a nélkül is kezelni kell. A kezelés végén a sejtek környezetéből kimossák a vizsgált anyagot, majd BrdU jelenlétében két replikációs cikluson keresztül folytatják a tenyésztést. A kezelés másik lehetősége, hogy a sejteket két teljes sejtcikluson át egyszerre kezeljük a vizsgált anyaggal és a BrdU-val.

Az emberi limfocitatenyészeteket akkor kezelik, amikor azok félszinkron állapotban vannak.

A sejtek elemzésére a kezelést követő második osztódáskor kerül sor, így biztosítják, hogy a legérzékenyebb osztódási szakaszok során fejthesse ki a vegyi anyag a hatását. Minden olyan sejttenyészetet, amelyhez BrdU-t adtunk, sötétben vagy tompa fénynél kell tartani a tenyésztési időszak végéig, hogy csökkentsük a BrdU-t tartalmazó DNS fotolízisét.

A sejtek összegyűjtése

A tenyészeteket egy-négy órával a sejtek összegyűjtése előtt orsóképződést gátló vegyülettel (pl. kolchicinnel) kezeljük. Valamennyi tenyészetet külön-külön gyűjtjük be és dolgozzuk fel a kromoszómapreparáláshoz.

Kromoszóma-előkészítés és -festés

A kromoszómakészítményeket standard citogenetikai módszerekkel állítják elő. A lemezek megfestése az SCE-jelenség kimutatására többféle technikával is elvégezhető (pl. fluoreszcens és Giemsa-festés).

Elemzés

Az elemzett sejtek számát az SCE-jelenség spontán gyakorisága alapján kell meghatározni. Rendszerint minden tenyészetből legalább 25, jól szétterült metafázist elemeznek az SCE-k szempontjából. Az elemzéshez a tárgylemezeket kóddal látják el. Az emberi limfocitákban csak a 46 centromert tartalmazó metafázisokat elemezzük. Stabil sejtvonalak esetében csak a modális szám ± 2 centromert tartalmazó metafázisokat elemeznek. Fel kell tüntetni, hogy a jelzés centromerikus váltását SCE-nek vesszük-e, vagy sem. Az eredményeket további független vizsgálattal kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Az SCE-k számát metafázisonként és az egyes metafázisokban kimutatható SCE-k számát kromoszómánként minden kezelt és kontrolltenyészet esetében külön meg kell adni.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

▼B

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a felhasznált sejtek, sejtkultúrák fenntartásának módszere,

— a vizsgálat körülményei: a tápoldatok összetétele, a szén-dioxid-koncentráció, a vizsgált anyag koncentrációja, a felhasznált vivőanyag, az inkubációs hőmérséklet, a kezelés időtartama, a felhasznált orsóképződést gátló vegyület, annak koncentrációja és az azzal történő kezelés időtartama, a felhasznált aktiválórendszer, a pozitív és a negatív kontrollok,

— a sejtkultúrák száma vizsgálati pontonként,

— a lemezkészítéshez használt technika részletes leírása,

— az elemzett metafázisok száma (az adatokat külön kell megadni minden sejtkultúrára),

— az SCE átlagos száma sejtenként és kromoszómánként (az adatokat külön kell megadni minden sejtkultúrára),

— az SCE-számolás/besorolás kritériumai,

— a dózisok megválasztásának indokai,

— a dózis-hatás összefüggés, ha van,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.20. **NEMHEZ KÖTÖTT RECESSZÍV LETÁLIS VIZSGÁLAT *DROSOPHILA MELANOGASTERBEN***

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A nemhez kötött, recesszív letális (SLRL Test = sex-linked recessive lethal test) vizsgálat Drosophila melanogaster használatával mutációk jelenlétét – pont mutációkat vagy kisebb törléseket – mutatja ki a rovar csíravonalában. A vizsgálattal az előrehaladó mutáció követhető, és az X kromoszóma mintegy 800 lokuszán van lehetőség a mutációk szűrésére; ez az X-kromoszóma összes lokuszának mintegy 80 %-át jelenti. Az X kromoszóma pedig a teljes haploid genom mintegy egyötödét képviseli.

A Drosophila melanogaster X-kromoszómájának mutációi fenotípusosan a mutáns gént hordozó hímeken jelennek meg. Ha valamely mutáció hemizigóta állapotban halálos, annak jelenlétére a heterozigóta nőstények által normál esetben kiköltött két hím osztály egyikének hiánya utal. Az SLRL-vizsgálattal különleges módon megjelölt és elrendezett kromoszómák segítségével fel lehet ismerni az említett sajátosságokat.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Törzsek

Jól jellemzett, vad típusú törzshöz tartozó hímek és a Muller-5 elnevezésű törzsből származó nőstények használhatók. Más, megfelelően jelölt nőstény törzsek is használhatók, ha van többszörös inverz X-kromoszómájuk.

Vizsgált anyag

A vizsgált anyagokat vízben oldják. A vízben nem oldódó anyagokat a megfelelő vivőanyagban is lehet oldani vagy szuszpendálni (pl. etanol és Tween-60, illetve Tween-80 keverékében), majd vízzel, illetve sóoldattal hígítani a beadás előtt. A dimetil-szulfoxidot (DMSO) lehetőleg ne használják vivőanyagként.

▼B

Az állatok száma

A vizsgálatot előre meghatározott érzékenységgel és felbontóképességgel kell megtervezni. A megfelelő kontroliban megfigyelt spontán mutációs gyakoriság jelentősen befolyásolja az elemzésre szánt kezelt kromoszómák számát.

Az adagolás módja

Az anyagot szájon át, injekcióval, illetve gázzal vagy párával való expozíció útján adagolhatjuk. A vizsgált anyagot táplálékként cukoroldatban adhatók be. Szükség esetén az anyagokat 0,7 %-os NaCl-oldatban is feloldhatjuk, és azt a mellkasba vagy a hasüregbe fecskendezhetjük.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Negatív (vivőanyag-) és pozitív kontrollokat is alkalmazni kell. Ha azonban megfelelő történeti laboratóriumi adatok állnak rendelkezésre, kontrollokra nincs szükség.

Expozíciós szintek

Három expozíciós szintet kell alkalmazni. Előzetes felmérésre a vizsgált anyag egyetlen koncentrációját használják, ez lehet a legnagyobb elviselhető koncentráció, vagy pedig az, amely a toxicitás bizonyos jeleit kiváltja. A nem mérgező anyagoknál a legnagyobb, gyakorlatilag még megvalósítható koncentrációt használják.

A kísérlet végrehajtása

A vizsgált anyaggal vad típusú (három-öt napos) hímeket kezelnek, majd egyenként pároztatják a Muller-5 törzsből vagy más, megfelelően jelölt törzsből származó szűz nőstényekkel (a törzsekben többszörös inverz X-kromoszómának kell lennie). A nőstényeket kétháromnaponta friss szűz állatokra cserélik le, hogy a teljes csírasejtciklust le tudják fedni. E nőstények utódait megvizsgálják a halálos hatások szempontjából, amelyek megnyilvánulhatnak a kezelés alatt az érett spermára, a középső szakaszban és a kései stádiumban lévő spermatidákra, a korai spermatidákra, illetve az elősejtekre és az ősondósejtekre gyakorolt hatásban.

A fenti keresztezésekből származó heterozigóta F1 nőstényeket engedik egyedenként párzani (vagyis csoportonként egy nőstényt) a testvéreikkel. Az F2 nemzedékben minden tenyészetben meghatározzák a vad típusú hímek hiányát. Ha egy tenyészet minden jel szerint a szülői X-kromoszómában a halálos gént hordozó F1 nősténytől származik (vagyis egyetlen hímet sem találtak a kezelt kromoszómával), annak a nősténynek az azonos genotípusú leányait is vizsgálni kell annak bizonyítására, hogy a letalitás megismétlődike a következő generációban.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni a vizsgált X-kromoszómák, a terméketlen hímek, valamint a halálos kromoszómák számának az egyes adagolási koncentrációknál, illetve párosítási időszakoknál az egyes kezelt hímekre történő bemutatásához. A hímenként észlelhető eltérő nagyságú csoportok (klaszterek) számát rögzíteni kell. Ezen eredményeket külön vizsgálattal is meg kell erősíteni.

▼B

Megfelelő statisztikai módszerek alkalmazásával kell értékelni a nemhez kötött, recesszív halálos mutációs vizsgálatokat. Az egy hímtől eredő recesszív letális mutációk csoportjait a megfelelő statisztikai módszerekkel kell vizsgálni és értékelni.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— törzs: a használt Drosophila törzsek és fajták, a rovarok kora, a kezelt hímek száma, a steril hímek száma, a létrejött F2 tenyészetek száma, a leszármazottak nélküli F2 tenyészetek száma, az egyes csírasejtstádiumokban észlelt, halálos génmutációt hordozó kromoszómák száma,

— a kezelt csoportok méretének meghatározásához használt kritériumok,

— a vizsgálati feltételek: a kezelési és a mintavételi ütemterv részletes ismertetése, az expozíciós szintek, a toxicitási adatok, a negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollok, ha szükséges,

— a letális mutációk számlálásának kritériumai,

— dózis-hatás összefüggés, ha van,

— az eredmények statisztikai feldolgozása,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.21. ***IN VITRO*** **EMLŐSSEJT-TRANSZFORMACIÓS VIZSGÁLATOK**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az emlőssejtkultúra-rendszerek felhasználhatók a rosszindulatú *in vivo* átalakulással összefüggésbe hozott kémiai vegyületek által kiváltott *in vitro* fenotípusos változások kimutatására. A széles körben alkalmazott sejtvonalak közé tartozik a C3H10$T_{1/2}$, a 3T3, az SHE, a Fischer jelzésű patkánysejtvonal; a vizsgálatok a sejtek morfológiai változásain, fókuszképződésén vagy félszilárd agaron való megtelepedésiképesség-változásain alapulnak. Kevésbé széles körben használt rendszerek is léteznek, amelyek más fiziológiai vagy morfológiai változásokat mutatnak ki a sejtekben, a rákkeltő anyagokkal történő kezelést követően. Az *in vitro* vizsgálatok egyetlen végpontja esetében sem bizonyított az a mechanizmus, amely a hatás és a karcinogén folyamat összefüggését magyarázza. Egyes vizsgálati rendszerek alkalmasak tumorpromoterek kimutatására. A citotoxicitást a vizsgált anyagnak a kolóniaképző képességre (klónozási hatékonyság) vagy a kultúrák növekedési sebességére gyakorolt hatásával határozhatják meg. A citotoxicitás mérése azt a célt szolgálja, hogy megállapítsák, a vizsgált anyag adagja toxikológiailag releváns volt-e, de nem használható minden mérésnél a transzformációs gyakoriság kiszámítására, hiszen egyes vizsgálatok esetében hosszabb inkubációra és/vagy ismételt szélesztésre van szükség.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Sejtek

Az alkalmazott transzformációs vizsgálattól függően számos sejtvonal vagy primer sejttenyészet jöhet szóba. A vizsgálatot végző személynek biztosítania kell, hogy az elvégzendő vizsgálat során a megfelelő fenotípusos változás következik be az ismert rákkeltő hatású anyaggal való expozíciót követően, és hogy a vizsgálatot végző személy által vezetett kutatólaboratóriumban végzett vizsgálat megbízhatósága és érvényessége bizonyított és dokumentálható.

Tápfolyadék

Olyan tápfolyadékot és vizsgálati körülményeket kell alkalmazni, amelyek a legjobban illenek a használt transzformációs vizsgálathoz.

▼B

Vizsgált anyag

A vizsgált anyagokat a sejtek kezelését megelőzően tápfolyadékban vagy megfelelő vivőanyagban kell előkészíteni vagy feloldani, illetve szuszpendálni. A vivőanyag végső koncentrációja a kultúrában nem befolyásolhatja a sejtek életképességét, növekedési sebességét vagy a transzformáció előfordulási gyakoriságát.

Anyagcsere-aktiválás

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában egyaránt ki kell tenni. A másik lehetőség, hogy belső metabolikus aktivitással rendelkező sejttípusokat használunk, ám ilyenkor az aktivitás jellegét és mértékét ismerni kell, hogy az megfeleljen a vizsgált kémiai osztálynak.

Vizsgálati körülmények

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálatnak pozitív kontrollként tartalmaznia kell egy közvetlenül ható vegyületet és egy metabolikus aktiválást igénylő vegyületet is; ezenkívül negatív (vivőanyag-) kontrollt is kell használni.

Néhány példa a pozitív kontrollként felhasználható anyagokra:

— közvetlenül ható vegyületek:

  — etil-metán-szulfonát,

  — béta-propiol akton,

— közvetve ható vegyületek:

  — 2-acetoamin-fluorén,

  — 4-dimetil-amino-azo-benzén,

  — 7,12-dimetil-benzantracén.

Ahol szükséges, alkalmazni lehet még egy pozitív kontrollt is, amely a vizsgált anyaggal egyező vegyületosztályba tartozik.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyag több koncentrációját kell alkalmazni. E mennyiségeknek koncentrációfüggő mérgező hatást kell eredményezniük, amelyek jellemzője, hogy a legnagyobb vizsgált koncentrációval alacsony túlélési arány jár, míg a legalacsonyabb koncentrációval kezelt csoportban a túlélés megközelítőleg megegyezik a negatív kontrollcsoportéval. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig szükséges vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

▼B

A kísérlet végrehajtása

A sejteket a felhasznált vizsgálati rendszer függvényében megfelelő ideig kezelik az anyaggal, ami adott esetben a tápfolyadék cseréjét követő ismételt adagolást jelenthet (és szükség esetén friss anyagcsere-aktiváló keveréket), hosszabb expozíció esetében. A szükséges belső metabolikus aktivitással nem rendelkező sejteket a megfelelő metabolikus akti válórendszer jelenlétében, illetve hiányában is kezelni kell a vizsgált anyaggal. A kezelés végén a sejtek környezetéből kimossák az anyagot, és olyan, megfelelő körülmények között tenyésztik, amelyek mellett a vizsgált, transzformált fenotípus megjelenhet, és a transzformáció előfordulási gyakorisága meghatározható. Valamennyi eredményt független vizsgálattal kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely számos fajtát jelenthet attól függően, hogy milyen meghatározást végzünk, pl. telepszám, pozitív telepek, illetve a transzformált sejtek száma. Ahol szükséges, a túlélési arányt a kontrollértékek százalékában, a transzformációs gyakoriságot pedig a túlélő sejtekre eső transzformált sejtek számának arányában kell megadni. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a felhasznált sejttípus, a sejtkultúrák száma, a sejtkultúrák fenntartásának módszere,

— a vizsgálat körülményei: a vizsgált anyag koncentrációja, a felhasznált vivőanyag, az inkubációs idő, a kezelés gyakorisága és időtartama, a sejtsűrűség a kezelés alatt, a felhasznált külső anyagcsere-aktiváló rendszer, a pozitív és negatív kontrollok, a megfigyelt fenotípus leírása, a használt szelektív rendszer (ha alkalmazható), a dózisok megválasztásának indokolása,

— az életképes és transzformált sejtek megszámlálásához használt módszer,

— az eredmények statisztikai feldolgozása,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.22. **DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A domináns letális (halálos) hatások embrionális, illetve magzati elhalást okoznak. A domináns letális hatások indukálása azt jelzi, hogy az illető vizsgált anyag a vizsgált állatfaj esetében hatást gyakorolt a csíraszövetekre. Az általánosan elfogadott nézet szerint a domináns letális hatások kromoszómakárosodásra vezethetők vissza (szerkezeti és számbeli rendellenességek). Nőstény állatok kezelése esetén az embrió elpusztulása az anyag toxikus hatása miatt is bekövetkezhet.

Általában hím állatokat kezelnek a vizsgált anyaggal, és a kezelt állatokat kezeletlen szűz nőstényekkel pároztatják. A különféle csírasejtstádiumok külön vizsgálhatók, ha egymás után következő pároztatási időközöket alkalmazunk. Az egy nőstényre jutó élettelen, beágyazódott embriók számának növekedése a kezelt csoportban a kontrollcsoportban tapasztalható hasonló adathoz képest a beágyazódás utáni veszteséget tükrözi. A beágyazódás előtti veszteségeket a sárgatestek száma alapján vagy a kezelt és kontrollcsoportokban az összes beágyazódott embriók számának összehasonlításából lehet kiszámítani. Az összes domináns letális hatás a beágyazódás előtti és utáni elhalás összegéből adódik. Az összes domináns letális hatás kiszámítása a kezelt csoportban az egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számának a kontrollcsoportban egy nőstényre jutó, élő beágyazódott embriók számával történő egybevetésén alapul. A beágyazódott embriók számának csökkenése bizonyos időközönként sejtpusztulás eredménye is lehet (azaz spermatociták és/vagy ondósejt-előalakok pusztulásáé).

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni.

▼B

Vizsgálati körülmények

Az adagolás módja

A vizsgált vegyületet rendszerint csak egyszer kell beadni. Toxikológiai információk alapján ismételt kezelés is lehetséges. Az általánosan alkalmazott adagolási módok a szájon át történő intubálás és az intraperitoneális injekció. Más alkalmazási módok is megfelelőek lehetnek.

A kísérlethez felhasznált állatok

A javasolt kísérleti állat a patkány vagy az egér. Az egészséges, ivarérett állatokat véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani.

Az állatok száma és neme

Megfelelő létszámban kell kezelt hímeket felhasználni, figyelembe véve az értékelni kívánt biológiai jellemző spontán variációit. A létszám meghatározása során a kimutatás korábban már meghatározott érzékenységi szintjét és a szignifikancia mértékét kell alapul venni. Egy tipikus vizsgálatban például minden adagolási csoportban a hímek számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy minden párzási időszakban 30 és 50 közötti nősténynél alakuljon ki vemhesség.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Minden vizsgálatban negatív (vivőanyag-) és pozitív kontrollokat is kell alkalmazni. Ha azonban elfogadható pozitív kontrolleredmények állnak rendelkezésre ugyanazon laboratóriumban nemrégiben elvégzett vizsgálatokból, ezeket fel lehet használni az egyidejű kontrollok alkalmazása helyett. A pozitív kontrollanyagokat csak megfelelően alacsony dózisban lehet alkalmazni (pl. MMS, intraperitoneálisan, 10 mg/kilogramm dózisban) a vizsgálat érzékenységének kimutatására.

Adagolási szintek (dózis)

Rendszerint három adagolási szintet (dózis) alkalmazunk. A nagy dózisnak toxikus tüneteket vagy csökkent termékenységet kell okoznia a kezelt állatokon. Egyes esetekben egyetlen nagy dózis is elegendő lehet.

Határérték-vizsgálat

A nem mérgező anyagokat egyszeri beadással 5 gramm/kg mennyiségben vagy ismételt beadással 1 gramm/kg/nap dózisban kell adagolni.

A kísérlet végrehajtása

Számos kezelési protokoll áll rendelkezésre. A leginkább elterjedt módszer a vizsgált anyag egyszeri beadása. Más kezelési protokoll is alkalmazható.

A kezelést követően minden egyes hímet megfelelő időközönként egymás után egy vagy két kezeletlen szűz nősténnyel pároztatnak. A nőstényeket legalább egy ivarzási ciklus erejéig a hímekkel kell tartani, illetve addig, amíg a párzásra sor nem került, ami a hüvelyben a sperma jelenlétéből, illetve a hüvelyi dugó megjelenéséből határozható meg.

▼B

A kezelést követő párzások számát a kezelési protokoll határozza meg, és azt úgy kell kialakítani, hogy a kezelés után a csírasejtképződés összes fázisából lehessen mintát venni.

A nőstényeket a vemhesség második felében pusztítják el, és a méh tartalmát megvizsgálva megállapítják az élő és elhalt implantátumok számát. A petefészkek vizsgálatával meghatározható a sárgatestek száma.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, bemutatva a hímek számát, a vemhes nőstények számát, valamint a nem vemhes nőstények számát. Minden párzás eredményét egyedileg kell jegyzőkönyvezni, egyenként azonosítva a hímet és a nőstényt. Minden nőstény esetében fel kell jegyeznünk a párzás hetét, a hím állatnak beadott dózist és az élő és az elhalt implantátumok gyakoriságát.

A teljes domináns letális hatás kiszámítása a kezelt csoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számának a kontrollcsoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számával történő egybevetésén alapul. Az elhalt és az élettelen implantátumok arányát hasonlítjuk össze a kezelt és a kontrollcsoport között a beágyazódás utáni veszteség elemzése céljából.

Ha az adatokat korai és kései elhalásként értékelték, azt a táblázatokban világosan jelezni kell. Ha vizsgálták a beágyazódás előtti veszteséget is, akkor azt is jegyzőkönyvezni kell. A beágyazódás előtti veszteségeket a sárgatestek számának és az implantátumok számának eltéréséből vagy a méhenkénti átlagos implantátumszám fogyatkozásából számíthatják ki a kontrollpárzásokhoz viszonyítva.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a kísérlethez felhasznált állatok fajtája, törzse, kora és súlya, mindkét nembeli állatok száma a vizsgálati és a kontrollcsoportokban,

— a vizsgált anyag, a vivőanyag, a vizsgált dózisok és azok kiválasztásának indokolása, a pozitív és a negatív kontrollok, a toxicitási adatok,

— az adagolás módja és a kezelés ütemezése,

— párzási ütemterv,

— a párzás igazolására használt módszer,

— az elpusztítás időpontja,

— a domináns letális mutációk számlálásának kritériumai,

— a dózis-hatás összefüggés, ha van,

▼B

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.23. EMLŐS SPERMIOGONIÁLIS KROMOSZÓMA-RENDELLENESSÉG VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 483-nak, emlős spermiogoniális kromoszómarendellenesség-vizsgálat (1997).

1.1. BEVEZETÉS

Az emlős spermiogoniális kromoszómarendellenesség-vizsgálat célja azon anyagok azonosítása, amelyek strukturális kromoszóma-rendellenességeket okoznak emlősök spermiogonális sejtjeiben (1), (2), (3), (4), (5). A strukturális rendellenességek kétféle típusúak lehetnek, kromoszóma vagy kromatid. A kémiai mutagének többsége esetében az előidézett rendellenességek kromatid típusúak, de kromoszóma típusú rendellenességek is előfordulnak. E módszert nem a számszerű rendellenességek mérésére tervezték és szokásosan nem is e célra használják. A kromoszómamutációk és ehhez hasonló folyamatok számos emberi genetikai betegség okozói.

E vizsgálat a spermiogoniális ivarsejtekben a kromoszómális történéseket mutatja ki, és ezért várhatóan előre jelezheti az ivarsejtek öröklődő mutációjának indukcióját.

E vizsgálathoz általában rágcsálókat kell használni. Ez az *in vivo* citogenetikus vizsgálat észleli a kromoszóma-rendellenességeket a spermiogoniális mitózisokban. Más célsejtek nem képezik tárgyát e módszernek.

A spermiogoniumokban a kromatid típusú rendellenességek észleléséhez a kezelést követő első mitiotikus sejtosztódást az előtt kell megvizsgálni, mielőtt elvesznének ezen elváltozások az azt követő sejtosztódásokban. A kezelt spermiogonium őssejtekről további információk kaphatók a diakinezi s-m etafázis I-ben, a kromoszóma típusú rendellenességek meiótikus kromoszómaelemzésével.

Ezt az *in vivo* vizsgálatot annak vizsgálatára tervezték, hogy az ivarsejtekben is aktívak-e a testi sejtek mutagénei. Ezenkívül a spermiogonium-vizsgálat a mutációs kockázat kiértékeléséhez is lényeges annyiban, hogy lehetővé teszi az *in vivo* metabolizmus, farmakokinetika és DNS-reparáció tényezőinek vizsgálatát.

A herékben a spermiogoniumok számos generációja van jelen, amik a kémiai anyaggal szembeni érzékenység egész spektrumát átfogják. Így tehát az észlelt rendellenességek a kezelt spermiogonium-populációk halmozott reakcióját jelentik az egyre nagyobb számú differenciált spermiogonium-sejtek predominanciájával. A heréken belüli helyzetüktől függően, a spermiogoniumok különböző generációi exponálódhatnak vagy nem a keringés révén a fizikai és fiziológiai Sertoli sejtgát és a vér-here gát miatt.

Ha bizonyos jelek utalnak arra, hogy a vizsgált anyag vagy valamely reaktív metabolitja nem éri el a célszövetet, akkor e vizsgálat nem megfelelő.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Kromatid típusú rendellenesség: szerkezeti kromoszómakárosodás, amely egy kromatid törésében vagy kromatidok közötti törésben és újraegyesítésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú rendellenesség: szerkezeti kromoszómakárosodás, amely a két kromatid azonos helyén történt törésben, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Gap: egyetlen kromatid szélességénél kisebb és a kromatidok minimális átrendeződését okozó akromatikus sérülés.

Számszerű rendellenesség: a kromoszómák számának eltérése a felhasznált sejteket jellemző normál számértéktől.

Poliploida: a haploid kromoszómaszám (n) egészszámú, de nem diploid (azaz 3n, 4n, és így tovább) megsokszorosódása.

Szerkezeti rendellenesség: a sejtosztódás metafázisának mikroszkopikus vizsgálata során észlelhető változás a kromoszóma szerkezetében, mint a delíciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli vagy a kromoszómák közötti átrendeződés.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az állatoknak megfelelő expozíciós módon adagolják a vizsgált anyagot és a kezelés után megfelelő időpontokban elpusztítjuk őket. Az elpusztítás előtt az állatokat metafázis-blokkoló szerrel (például kolchicin vagy Colcemid®) kell kezelni. Ezután kromoszómakészítményeket hozunk létre az ivarsejtekből és megfestjük azokat, majd elemezni kell a metafázisú sejteket a kromoszóma-rendellenességek megállapítására.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Rendszerint patkányokat, egereket és kínai hörcsögöket használnak, jóllehet bármilyen megfelelő emlős használata szóba jöhet. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell használni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a páratartalom értékének 50–60 % között kell lennie.

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba osztják. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek az elhelyezés miatti esetleges hatások. Ezt követően az állatokat egyenként kell azonosítani. Az állatokat legalább öt napig szoktatják a laboratóriumi körülményekhez.

▼B

1.4.1.4. *Dózisok előkészítése*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve, ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitásukat bizonyító adatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

1.4.2.2. *Kontrollok*

Mindkét nemhez és minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokat kell alkalmazni. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrolloknak *in vivo* szerkezeti rendellenességeket kell létrehozniuk expozíciós koncentrációban úgy, hogy észlelhető legyen a növekedés (a háttérhez viszonyítva).

A pozitív kontrollkoncentrációkat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. Elfogadható, hogy a pozitív kontroll beadása a vizsgált anyag beadási módjától eltérjen, és hogy csak egyetlen mintavételre kerüljön sor. Adott esetben azon pozitív kontrollanyagok használatát kell megfontolni, amelyek a vizsgált anyaggal azonos osztályba tartoznak. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
Ciklofoszfamid Ciklofoszfamid monohidrát	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Ciklohexil-amin	108-91-8	203-629-0
Mitomicin C	50-07-7	200-008-6
Akrilamid monomer	79-06-1	201-173-7
Trietilén-melamin	51-18-3	200-083-5

Minden mintavétel alkalmával a negatív kontrollcsoportban lévő állatokat is figyelembe kell venni, amelyeknek csupán oldószert adagolnak, egyébként azonos bánásmódban kell részesíteni azokat a kezelt állatokkal, kivéve, ha a történeti kontrolladatokból elfogadható értékek állnak rendelkezésre a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek állaton belüli sokfélesége és gyakorisága tekintetében. Ezenkívül használunk nem kezelt kontrollállatokat, kivéve, ha vannak olyan történeti vagy nyilvánosságra hozott kontrolladatok, amelyek azt mutatják, hogy a kiválasztott oldószer/vivőanyag semmilyen ártalmas vagy mutagén hatást nem hoz létre.

▼B

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Állatok száma**

Minden egyes kezelt- és kontrollcsoport legalább öt elemezhető hím állatot tartalmaz.

1.5.2. **Kezelés lefolytatása**

A vizsgált anyagot lehetőleg egyetlen alkalommal adják be. A vizsgált anyagot két adagban is be lehet adni, ugyanazon a napon két alkalommal néhány órás időközzel, nagy mennyiségű anyag beadásának megkönnyítésére. Más adagolási módok alkalmazását tudományosan indokolni kell.

A legnagyobb adaggal kezelt csoportnál a kezelés után két különböző időpontban mintát kell venni. Mivel a sejtciklus kinetikájára hatással lehet a vizsgált anyag, körülbelül 24 és 48 órával a kezelés után kell mintát venni. Az egyéb adagok estében a kezelés utáni 24 órában vagy 1,5 sejtciklusidő eltelte után kell mintát venni, kivéve ha más időpontról bebizonyosodott, hogy az megfelelőbb a hatások észlelésére (6).

Ezenkívül más mintavételi idők is alkalmazhatók. Olyan kémiai anyagok esetében, amelyek kromoszóma-visszamaradást idézhetnek elő vagy amelyek S fázistól független hatásokat fejthetnek ki, megfelelőbbnek bizonyulhatnak a korábbi mintavételi idők (1).

Valamely megismételt kezelés célszerűségét eseti alapon kell megállapítani. Megismételt kezelés esetén az állatokat 24 órával (1,5 sejtciklusidő) az utolsó kezelés után elpusztítják. További mintavételi idők alkalmazhatók, ahol szükséges.

Elpusztítás előtt az állatok hasüregébe adott injekcióval megfelelő adag metafázist blokkoló szert (például Colcemid® vagy kolchicin) fecskendezünk be. Ezután az állatokból mintákat kell venni megfelelő időközönként. Egerek esetében ez az időköz körülbelül 3–5 óra; kínai hörcsögök esetében ez az időköz körülbelül 4–5 óra.

1.5.3. **Dózisok**

Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeznek, mert nem állnak rendelkezésre alkalmas adatok, ezt ugyanabban a laboratóriumban, ugyanazon fajták, törzsek, nemek és kezelési menetrend alkalmazásával hajtják végre, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmaznak (7). Ha észlelhető toxicitás, három dózist használnak az első mintavételhez. E dózisoknak át kell fogniuk egy, a maximálistól a már csak kissé vagy az egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételnél csak a legmagasabb adagot használják. A legmagasabb adag az a dózis, amely olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak.

▼B

Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének) adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. A legmagasabb adag olyan adagként is definiálható, amely létrehoz valamilyen toxicitási jelet a spermiogonium-sejtekben (például az első és második meiotikus metafázis esetében a spermiogonium mitózis arányának csökkenése; e csökkenésnek nem szabad 50 %-nál nagyobbnak lennie).

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúly dózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatásokat nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a három dózisszint használatával végrehajtott teljes vizsgálat. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/l00 g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

1.5.6. **Kromoszómapreparáció**

Közvetlenül az elpusztítás után sejtszuszpenziót vesznek mindkét heréből, azokat hipotonizálni kell, majd fixálni. A sejteket ezután elterítjük a tárgylemezen és megfestjük.

1.5.7. **Elemzés**

Minden egyes állat esetében legalább 100 jól kiterült metafázist kell elemezni (azaz csoportonként minimum 500 metafázist). E szám csökkenthető, amennyiben nagyszámú rendellenesség figyelhető meg. Minden tárgylemezt, a pozitív és negatív kontrollokat is ideértve, önállóan kódolni kell a mikroszkópos elemzés előtt. Mivel a fixálási eljárások gyakran a metafázisban lévő sejtek egy részének széttörését eredményezik, mely kromoszóma veszteséggel jár, ezért a kiértékelt sejtek tartalmaznak egy centromer számot, amely megfelel a 2n ± 2 értéknek.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az egyes állatok adatait táblázat formájában kell megadni. A kísérleti egység maga az állat. Minden egyes állat esetében fel kell jegyezni a strukturális kromoszóma-rendellenességekkel rendelkező sejtek számát és a sejtenkénti kromoszóma-rendellenességek számát. Fel kell sorolni a szerkezeti kromoszóma-rendellenességek különböző típusait a számukkal és gyakoriságukkal együtt kezelt és kontrollcsoportonként. A gap külön kerül feljegyzésre és szerepel a jelentésben, de rendszerint azokat nem kell beleszámolni a rendellenességek összgyakoriságba.

▼B

Ha mitózist, valamint meiózist figyelnek meg, meg kell határozni a spermiogonium-mitózisok arányát az első és második meiotikus metafázisokhoz viszonyítva, állatonként 100 osztódó sejt összes mintájában valamennyi kezelt és negatív kontrollállathoz tartozó citotoxicitás méréseként az esetleges citotoxikus hatás megállapítása érdekében. Ha csak mitózist figyelnek meg, a mitózisindexet állatonként legalább 1 000 sejtben kell meghatározni.

2.2. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Különböző kritériumok léteznek a pozitív eredmény meghatározására, ilyen például a kromoszóma-rendellenességeket mutató sejtek relatív számának növekedése a dózis függvényében, vagy egy meghatározott időben történő mintavétel alkalmával egyetlen dózis-csoportban a rendellenességet mutató sejtek számának egyértelmű növekedése. Először meg kell vizsgálni az eredmények biológiai jelentőségét. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények kiértékelésének elősegítésére (8). Valamely pozitív reagálás tekintetében nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező. A többféleképpen magyarázható eredményeket további vizsgálattal kell tisztázni, lehetőleg a kísérleti körülményeket módosítva.

E rendszerben nem mutagén anyagnak tekintendő az a vizsgált anyag, amelyhez tartozó eredmények nem elégítik ki a fenti kritériumokat.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az *in vivo* spermiogonium kromoszómarendellenesség-vizsgálatból kapott pozitív eredmények azt jelzik, hogy valamely anyag strukturális kromoszóma-rendellenességeket idéz elő a kísérleti állatfajták ivarsejtjeiben. A negatív eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált körülmények mellett, a vizsgált anyag nem idéz elő kromoszóma-rendellenességeket a kísérleti állatfajták ivarsejtjeiben.

Értékelni kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e a célszövetbe.

3. **VIZSGÁLATI JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/-vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

— használt fajok/törzs,

— állatok száma, kora,

— az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

— az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagértéket és a standard eltérést is ideértve.

▼B

Vizsgálati körülmények:

— a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

— a dózisok kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag beadási módjának indoklása,

— a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó adatok,

— a vizsgált anyag beadására vonatkozó adatok,

— a kiválasztott elpusztítási időpontok indoklása,

— átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

— kezelési és mintavételi menetrend részletes leírása,

— toxicitás meghatározásának módszerei,

— metafázis-blokkoló szer azonosítása, annak koncentrációja és kezelési időtartama,

— tárgylemez preparálásának módszerei,

— rendellenességek értékelésének kritériumai,

— az elemzett sejtek száma (állatonként),

— azon kritériumok, amelyek meghatározzák, hogy a vizsgálatok pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen értelmezhetőnek tekintendők-e.

Eredmények:

— toxicitás jelei,

— mitotikus index,

— spermiogonium mitózisok aránya az első és második meiotikus metafázisokhoz viszonyítva,

— rendellenességek száma és típusa az egyes állatokban,

— csoportonként a rendellenességek össz-száma,

— csoportonként a rendellenességeket mutató sejtek száma,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzések, ha vannak,

— az egyidejűleg elvégzett negatív kontrollokra vonatkozó adatok,

— történeti negatív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— az egyidejűleg elvégzett pozitív kontrollokra vonatkozó adatok,

— ploidia megfigyelt változásai.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

▼B

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Adler, I. D. (1986), Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specification, 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), Cytogenetic 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 Tests, Cytogenetics and Cell Genetics, 3, pp. 289–294

(4) Richold, M., Ashby, J., Bootman, 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, Melbourne, 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., Clarc, 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. **EGÉRFOLT- (SPOT) TESZT**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Ez egy *in vivo* vizsgálat egéren, amelynek során fejlődő embriókat kezelnek a vizsgált vegyülettel. A fejlődő embrióban a célsejtek a melanoblasztok, a célgének pedig azok, amelyek a hátszőrzet pigmentációjáért felelősek. A fejlődő embriók több ilyen, a szőrszínt kódoló génre heterozigóták. Ha valamely pigmentsejt egy ilyen génjében mutáció következik be, vagy elvész a domináns alléi (különböző genetikai események hatására), az utódsejtben a recesszív fenotípus jelenik meg, aminek az a következménye, hogy a születő egér szőrzete egy foltban eltérő színű lesz. Meghatározzák az ilyen foltokkal született mutáns egerek számát, és gyakoriságukat összehasonlítják a csak oldószerrel kezelt embriókból keletkező utódnemzedékben előforduló foltosodási gyakorisággal. Az egérfoltosodási vizsgálat a magzati sejtek feltételezett szomatikus mutációinak kimutatására alkalmas.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni.

A kísérlethez felhasznált állatok

A T törzshöz tartozó (nonagouti, a/a; csincsilla, rózsaszín szemű, $c^{ch}p/c^{ch}p$; barna, b/b; halvány, rövid fülű, d se/d se; tarka foltos, s/s) egereket vagy a HT törzshöz tartozó egerekkel (halvány, nonagouti, rövid lábú, pa a bp/pa a bp; szürke pihés, ln fz/ln fz; gyöngy pe/pe) vagy a C57BL (nonagouti, a/a) törzshöz tartozó egerekkel párosztatnak. Más megfelelő keresztezés, például az NMRI (nonagouti, a/a; albínó, c/c) és a DBA (nonagouti, a/a; barna, b/b; halvány d/d) törzsek között is használható, ha nonagouti utódaik lesznek.

▼B

Az állatok száma és neme

Megfelelő számú vemhes nőstényt kezelnek, hogy elegendő túlélő utód legyen minden dózishoz. A minta nagyságát a kezelt egereken megfigyelt foltok száma és a kontrolladatok nagyságrendje határozza meg. A negatív eredmény csak akkor fogadható el, ha a legnagyobb dózissal kezelt csoport nőstényeitől származó legalább 300 utódot vizsgáltak meg.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Olyan egyidejűleg alkalmazott kontrollegércsoport adatainak is rendelkezésre kell állniuk, amelyeket csak vivőanyaggal (negatív kontroll) kezeltek. A vizsgálat érzékenységének növelése érdekében az ugyanazon laboratóriumból származó történeti kontrolladatokat lehet összesíteni, ha azok homogének. Ha az aktuális vizsgálat nem mutatott ki mutagenitást a vizsgált anyagra, olyan pozitív kontrollvizsgálat eredményeinek kell rendelkezésre állniuk, amelyet nemrégiben végeztek ugyanazon laboratóriumban valamely ismert, mutagén hatású vegyülettel.

Az adagolás módja

Általánosan alkalmazott módszer a vemhes nőstények szájon át történő intubálása vagy az intraperitoneális injekció. Belélegeztetés vagy egyéb módszer is alkalmazható, ha szükséges.

Adagolási szintek (dózisok)

Legalább két adagolási szintet kell alkalmazni, amelyek közül az egyik toxikus tüneteket okoz, vagy csökkentett alomszámot eredményez. A nem mérgező anyagoknál a gyakorlatban kivitelezhető legnagyobb dózist kell használni.

A kísérlet végrehajtása

A vemhesség 8., 9., illetve 10. napján egyszeri dózist adnak, a vemhesség első napjának a hüvelyi dugó megjelenését tekintve. E napok a fogamzás utáni 7,25., 8,25. és 9,25. napnak felelnek meg. Az említett napokat követően is alkalmazható további kezelés.

Elemzés

Az utódokat kóddal látják el, és a születés utáni harmadik és negyedik hét között megszámolják foltjaikat. Háromfajta foltot különböztetnek meg:

a) fehér foltok a hasfal középvonalától számított 5 mm-en belül, amelyek feltehetőleg a sejtpusztulás következményei (WMVS);

b) sárga, agouti-szerű foltokat az emlők, a nemi szervek, a torok, a váll és a lágyék területein, valamint a homlokon, amelyek valószínűleg a hibás differenciáció (MDS) következményei; és

c) pigmentált és fehér foltokat véletlenszerűen elszórtan a szőrzeten, amelyek valószínűleg szomatikus mutáció (RS) következményei.

▼B

Mindhárom csoportban megszámolják a foltokat, de genetikai szempontból csak az utolsó, az RS játszik szerepet. Az MDS és az RS közötti különbségtételnél problémás esetekben a szőrminta fluoreszcens mikroszkóp alatti vizsgálata dönt.

Az utódok nyilvánvaló makroszkópos morfológiai rendellenességeit fel kell jegyezni.

2. **ADATOK**

Az adatokat feltüntetésekor meg kell adni az összes vizsgált utód és az egy vagy több vélt szomatikus mutációs foltot mutató egyedek számát. A kezelt és a negatív kontrollcsoportok adatait összevetik megfelelő statisztikai módszerek alkalmazásával. Az adatokat almonként is megadják.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a keresztezéshez használt törzsek,

— a vemhes nőstények száma a vizsgálati és a kontrollcsoportokban,

— az átlagos alomszám a vizsgálati és a kontrollcsoportokban születéskor és a szoptatástól való elválasztáskor,

— a vizsgált anyag dózisa(i),

— a felhasznált oldószer,

— a vemhesség napja, amikor a nőstény megkapta a kezelést,

— az anyag adagolásának módja,

— az összes utód száma, a WMVS, MDS és RS típusú eltérésekkel rendelkező utódok száma a vizsgálati és a kontrollcsoportban,

— jelentős morfológiai rendellenességek,

— az RS-eltéréssel rendelkező állatok dózis-hatás összefüggései, ha lehetséges,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.25. **EGÉREN VÉGZETT ÖRÖKLETES TRANSZLOKÁCIÓS VIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az egéren végzett örökletes transzlokációs vizsgálat az első utódnemzedékből kinyerhető szerkezeti és számbeli kromoszómaváltozásokat mutatja ki. A kimutatott kromoszómaváltozások típusai a reciprok transzlokáció és – ha nőstény utódokat is vizsgálunk – az X-kromoszóma-veszteség. A transzlokáció-hordozók és az XO-nőstények csökkent termékenységgel rendelkeznek, ezen állatokat az F1 utódnemzedékből ennek alapján válogatjuk ki a citogenetikai elemzéshez. Bizonyos transzlokáció-típusok teljes sterilitást eredményeznek (X-autoszóma és c-t típus). A transzlokációk citogenetikai vizsgálattal hím állatok (vagy F1 hímek vagy F1 nőstények hím utódai) meiotikus sejtjeiben a diakinézis-I. metafázisban figyelhetők meg. Az XO-nőstények a csontvelői sejtek mitózisa során megfigyelhető, mindössze 39 kromoszóma jelenléte alapján azonosíthatók.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást.

A z a d a g o l á s m ó d j a

A vizsgált anyagot orális intubálással vagy intraperitoneális injekcióval kell bejuttatni. Más alkalmazási módok is megfelelőek lehetnek.

A k í s é r l e t h e z f e l h a s z n á l t á l l a t o k

A tenyésztés megkönnyítése és a citológiai megerősítő vizsgálatok miatt e vizsgálatokat egereken végzik. Nincs szükség különleges egértörzsre. Mindazonáltal a törzs átlagos alomszáma nyolcnál nagyobb és viszonylag állandó legyen.

Egészséges, ivarérett állatokra van szükség.

▼B

Az állatok száma és neme

Az állatok száma a spontán transzlokáció gyakoriságától és a pozitív eredmény eléréséhez szükséges minimális indukciós aránytól függ.

A vizsgálatot rendszerint F1 hím utódok elemzésével végzik. Dózisonként legalább 500 hím F1 utódot kell megvizsgálni. Ha F1 nőstény utódokat is használunk, 300 hímre és 300 nőstényre van szükség.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Egyidejűleg végzett vizsgálatokból és történeti kontrollvizsgálatokból megfelelő kontrolladatoknak kell rendelkezésre állniuk. Ha nemrégen ugyanezen laboratóriumban elvégzett vizsgálatokból elfogadható pozitív kontrolleredmények állnak rendelkezésre, egyidejűleg alkalmazott kontrollok helyett ezek is használhatók.

Adagolási szintek (dózisok)

Egy adagolási szintet vizsgálnak, rendszerint azt a legnagyobb dózist, amely minimális toxikus hatást fejt ki, de még nem befolyásolja a szaporodási viselkedést vagy a túlélést. A dózis-hatás összefüggés megállapításához még legalább két alacsonyabb adaggal kezelt csoportra is szükség van. Nem mérgező anyagoknál a legnagyobb megengedhető adagot használják.

A kísérlet végrehajtása

Kezelés és pároztatás

Kétféle kezelési protokoll áll rendelkezésre. A leggyakrabban alkalmazott a vizsgált anyag egyszeri adagolása. Másik lehetőség a vizsgált anyag adagolása heti hét napon át, 35 napon keresztül. A kezelések utáni pároztatások számát a kezelési protokoll határozza meg, amelynek biztosítania kell, hogy a csírasejtképződés minden kezelt fázisából legyen mintavétel. A párzási időszak végén a nőstényeket egyedileg ketrecbe kell zárni. Elléskor feljegyzik a napot, az alomszámot és az utódok nemét. Valamennyi hím utódot elválasztják, és a nőstény utódokkal nem foglalkoznak, hacsak nem akarják felhasználni azokat is a vizsgálatban.

A transzlokáció-heterozigócia vizsgálata

Az alábbi két módszer egyike használható:

— az F1 utódok termékenységének vizsgálata és a lehetséges transzlokációk utólagos igazolása citogenetikai elemzéssel,

— valamennyi hím F1 utód citogenetikai vizsgálata termékenységvizsgálattal végzett előzetes kiválogatás nélkül.

a) Termékenységvizsgálat

Az F1 utód csökkent termékenységét az alomszám megfigyelésével és/vagy az ezen állattal pároztatott nőstények méhtartalmának vizsgálatával mutathatják ki.

A normális, illetve csökkent termékenység kritériumait a felhasznált egértörzs sajátságainak megfelelően kell meghatározni.

▼B

Alomszám-megfigyelések: A vizsgálandó F_1 hímeket ugyanazon vizsgálatból vagy ugyanazon tenyészetből származó nőstényekkel együtt ketrecekbe zárják. A ketreceket a párzás utáni 18. naptól kezdődően naponta megvizsgálják. Az alom létszámát és az F_2 utódok nemét elléskor feljegyzik, az almot ezután eltávolítják. Ha F_1 nőstény utódokat vizsgálnak, a kis almok F_2 utódait további vizsgálatok céljaira megtartják. A nőstény transzlokációhordozókat bármely hím utódjuk transzlokációs citogenetikai vizsgálatával azonosíthatják. Az XO-nőstényeket az utódok ivari megoszlásának változásából ismerhetik fel, a hímek és nőstények aránya 1:1-ről l:2-re változik. A normál F_1 állatokat egy több egymást követő lépésből álló eljárásban kivonják a vizsgálatból, ha az első F_2 alom létszáma eléri vagy meghaladja az előre meghatározott normál értéket, ellenkező esetben viszont a második vagy harmadik F_2 almot is megfigyelik.

Azon F_1 állatokat, amelyeket még a harmadik F_2 alom után sem lehet normálisnak tekinteni, vagy tovább vizsgálják a velük pároztatott nőstények méhtartalmának elemzésével, vagy rögtön citogenetikai vizsgálatnak vetik alá.

A méhtartalom elemzése: A transzlokáció-hordozók alomlétszámának csökkenése az embrionális elhalálozásnak tudható be, ezért nagyszámú elhalt implantátum jelzi a vizsgált állatban kialakult transzlokációt. A vizsgálandó F_1 hímeket két-három nősténnyel pároztatjuk. A fogamzás napját a hüvelyi dugó reggelente történő, napi vizsgálatával állapítják meg. A nőstényeket 14–16 nappal később elpusztítják, és méhükben meghatározzák és feljegyzik az élő, illetve elhalt embriók számát.

b) Citogenetikai elemzés

Levegőn végzett szárítás módszerével herepreparátumokat állítunk elő. A transzlokációhordozókat a primer spermatociták I. típusú diakinézis-metafázisban megjelenő polivalens konfigurációi alapján azonosítjuk. Legalább két sejtet kell találni polivalens asszociációval ahhoz, hogy kijelenthessük, a vizsgált állat transzlokáció-hordozó.

Ha nem végeztünk tenyésztési szelekciót, minden F_1 hímet egyenként kell citogenetikailag megvizsgálni. Hímenként legkevesebb 25 I. típusú diakinézis-metafázisban levő sejtet kell mikroszkóposan megvizsgálni. A kis herékkel, illetve a diakinézis előtti meiotikus károsodással rendelkező F_1 hímeknél, valamint azon F_1 nőstényeknél, amelyeknél felmerül az XO-károsodás gyanúja, el kell végezni a spermatogoniumsejtek vagy a csontvelői sejtek mitotikus metafázisainak vizsgálatát is. Egy szokatlanul hosszú és/vagy rövid kromoszóma jelenléte mind a tíz sejtben egy bizonyos, hímsterilitást okozó transzlokációra utal (c-t típus). Egyes X-autoszóma-transzlokációkat, amelyek szintén hímsterilitást okoznak, csak a mitotikus kromoszómák sávos elemzésével lehet kimutatni. Ha mind a 10 mitózisban 39 kromoszómát találunk, az a nőstény XO-kromoszóma eltérését bizonyítja.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni.

Minden párzási időszakra megadják a szülői párosításból származó átlagos alomszámot és a nemek arányát születéskor és a szoptatástól való elválasztáskor.

▼B

Az F_1 állatok termékenységvizsgálatát, a normálpárok átlagos alomszámát és az F_1 transzlokáció-hordozók egyedenkénti alomszámát is bemutatják. A méhtartalom-elemzésnél a normálpárok élő és elhalt implantátumainak átlagos számát viszonyítják az F_1 transzlokáció-hordozók párosításából származó élő és elhalt implantátumok egyedenkénti számához.

Az I. típusú diakinézis-metafázis citogenetikai elemezésekor a különféle típusú polivalens konfigurációk számát és a teljes sejtszámot sorolják fel minden transzlokáció-hordozó esetében.

A steril F_1 egyedeknél a teljes párzási számot és a párosodási időszak hosszát jegyzik fel. Megadják a herék súlyának és a citogenetikai elemzés eredményének adatait.

Az XO-nőstények esetében az átlagos alomszámot, az F_2 nemzedék ivararányát és a citogenetikai elemzés eredményeit kell megadni.

Ha az F_1 transzlokáció-hordozókat termékenységvizsgálattal előszelektáljuk; ilyenkor a táblázatoknak azt is be kell mutatniuk, hogy ezek közül hány állat bizonyult heterozigótának a transzlokáció szempontjából.

A negatív és a pozitív kontrollvizsgálatok adatait egyaránt jegyzőkönyvezni kell.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— az egértörzs neve, az állatok kora, a kezelt állatok testsúlya,

— a szülő állatok száma nemenként a vizsgálati és a kontrollcsoportokban,

— a vizsgálati feltételek, a kezelés részletes leírása, dózisok, oldószerek, a párzási ütemterv,

— az utódok száma és neme nőstényenként, a transzlokáció-elemzésre szánt utódok száma és neme,

— a transzlokáció-elemzés időpontja és kritériumai,

— a transzlokáció-hordozók száma és részletes ismertetése, beleértve a tenyésztési adatokat és a méhtartalom adatait is, ha alkalmazhatók,

— a citogenetikai eljárások és a mikroszkópos elemzés részletei, lehetőség szerint képekkel,

— az eredmények statisztikai feldolgozása,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

▼B

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.26. **SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, RÁGCSÁLÓKON VÉGZETT 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

E szubkrónikusorálistoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 408-nak (1998).

1.1. BEVEZETÉS

Egy vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt adagolású szubkrónikus orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut vagy a 28 napos ismételt adagolású toxicitásvizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. A 90 napos vizsgálat a szoptatási időszak befejeztétől a felnőttkorba váltás periódusát is átfogó időszakban a hosszabb ideig tartó, ismételt expozícióból adódó lehetséges egészségkárosodásra vonatkozó információkat tárja fel. A vizsgálat tájékoztat a fontosabb toxikus hatásokról, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét, és becslést ad az expozíció kimutatható káros hatással nem járó szintjére (NOAEL) nézve, amit fel lehet használni a krónikustoxicitás-vizsgálatok dózisszintjeinek kiválasztásához és az emberi expozíció biztonsági kritériumainak megállapításához.

A módszer nagy hangsúlyt fektet a neurológiai végpontokra, és jelzi az immunrendszerre és a szaporodásra gyakorolt hatásokat. Szintén hangsúlyt kap a kísérleti állatok gondos klinikai megfigyelésének szükségessége is a lehető legtöbb információ megszerzése érdekében. E vizsgálat lehetővé teszi azon vegyi anyagok körének megállapítását, amelyek potenciálisan neurotoxikus hatásokkal járnak, vagy kedvezőtlen hatásokat gyakorolnak az immunrendszerre vagy a szaporítószervekre, és ennélfogva további, mélyreható kutatások és vizsgálatok elvégzését indokolják.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Dózis: a vizsgált anyag beadott mennyisége. A dózis mennyiségét tömegben (gramm vagy milligramm) vagy a vizsgált anyag és a vizsgált állat tömegének hányadosában (pl. milligramm anyag/-testtömeg kilogramm), vagy állandó táplálékbeli koncentráció formájában (ppm vagy milligramm/táplálék-kilogramm) fejezik ki.

Adagolás: általános meghatározás, ami a dózist, az adagolás gyakoriságát és időtartamát tartalmazza.

NOAEL: a „kimutatható káros hatással nem járó dózisszint” (no observed adverse effect level) rövidítése, és azon legmagasabb adagolási szintet jelöli, amelynél még nem észlelhető a kezeléssel összefüggésben lévő kedvezőtlen hatás.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta, szájon át adják be több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként más-más adagolási szinten, 90 napon keresztül. A szer beadásának időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében gondosan megfigyelik. Az elpusztult, illetve az elpusztított állatokat felboncolják, illetőleg a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat is elpusztítják és felboncolják.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Az állatok előkészítése**

A laboratóriumi körülményekhez legalább öt napon keresztül hozzászoktatott és korábbi kísérleti eljárásoknak még alá nem vetett, egészséges állatokat használnak. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és/vagy életkor szerint leírják. Az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportokba osztják be. A ketreceiket olyan módon helyezik el, hogy az elhelyezésükből adódó lehetséges hatásokat a minimumra lehessen csökkenteni. Minden állatot számmal jelölnek meg az egyedi azonosíthatóság céljából.

1.4.2. **A dózisok előkészítése**

A vizsgált anyagot gyomorszondán át, az állatok táplálékába vagy az ivóvízbe keverve adják be. A szájon át történő beadás módszerét a vizsgálat céljától, valamint a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően választják meg.

Szükség esetén a vizsgált anyagot feloldják vagy szuszpendálják alkalmas vivőanyagban. Amennyiben lehetséges, úgy elsősorban a vizes oldat/szuszpenzió használata javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukoricaolaj) oldat/szuszpenzió alkalmazása jöhet számításba, és ezt követheti a másfajta vivőanyagokban történő feloldás. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük. Meghatározzák a vizsgált anyag stabilitását a beadás körülményei között.

1.4.3. **Vizsgálati körülmények**

1.4.3.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

A javasolt faj a patkány, de a rágcsálók más fajai (pl. egerek) is felhasználhatók. Kísérleti célokra általánosan használt, laboratóriumi törzsekből származó fiatal, egészséges, felnőtt állatokat használnak. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek (nulliparák) vagy vemhesek. Az adagolást az elválasztás után a lehető legrövidebb időn belül célszerű elkezdeni, de mindenképpen az állatok kilenchetes kora előtt. A vizsgálat kezdetén az állatok testtömege csak minimálisan térhet el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú krónikustoxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik el, akkor mindkét kísérlethez ugyanabból a törzsből való, azonos eredetű állatokat használnak.

1.4.3.2. *Az állatok száma és neme*

Minden egyes dózisszinthez legalább 20 állatot (10 hímet és 10 nőstényt) alkalmaznak. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a csoport létszámát a kísérlet során elpusztítani szándékozott állatok számával megnövelik. A vegyi anyagra vagy annak egy közeli analógiájára vonatkozó korábbi ismeretekre alapozva fontolóra lehet venni egy további, 10 állatból (5 hím és 5 nőstény) álló ún. kísérőcsoport használatát a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, hogy a kezelés időszakát követően meg lehessen figyelni a toxikus hatás reverzibilitását vagy tartósságát. Az ilyen, kezelés utáni időszak hosszát a megfigyelt hatások figyelembevételével határozzák meg.

▼B

1.4.3.3. *Dózisszintek*

Legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollszintet alkalmaznak, kivéve, ha határérték-vizsgálatra kerül sor (lásd az 1.4.3.4. pontot). A dózisszintet ismételt dózis- vagy dózisbehatároló vizsgálatok eredményeire lehet alapozni, figyelembe véve minden korábbi, a vizsgált vagy azzal rokon anyagokra vonatkozó, rendelkezésre álló toxikológiai és toxikokinetikai adatot. Ha a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságai vagy biológiai hatásai nem szabnak korlátokat, akkor a legmagasabb adagolási szintet úgy választják ki, hogy az az állat halála vagy súlyos szenvedése nélkül idézze elő a toxicitást. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik, azzal a céllal, hogy bemutassák a dózisszinttől függő hatásokat és a kimutatható káros hatással nem járó dózisszintet (NOAEL). A csökkenő dózisok beállításához gyakran kétszeres-négyszeres hosszúságú időszakok bizonyulnak optimálisnak, és sokszor tanácsos egy negyedik kezelt csoport alkalmazása, igen nagy dózisbeli különbség (pl. több mint 6–10-szeres) alkalmazásával.

A kontrollcsoport vagy kezeletlen állatokból áll, vagy a vivőanyag ellenőrzésére szolgál, ha a vizsgált anyag adagolásának elősegítésére vivőanyagot használnak. A vizsgált anyaggal való kezeléstől eltekintve a kontrollcsoportban lévő állatokat a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik. Ha vivőanyagot használnak a vizsgált anyag beadásához, akkor a kontrollcsoport a vivőanyagot a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kapja. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal viszik be, és emiatt az állatok kevesebb táplálékot vesznek magukhoz, akkor egy párhuzamosan táplált kontrollcsoport használata hasznos lehet annak megállapításához, hogy a csökkent étvágy a táplálék ízletességével vagy a vizsgálati modellben beállt toxikológiai változásokkal áll-e összefüggésben.

Figyelembe veszik a vivőanyag és – esettől függően – más adalékanyagok alábbi jellemzőit: a felszívódásra, eloszlásra vagy anyagcserére gyakorolt hatás, a vizsgált anyagnak a szervezetben való visszatartására, ill. a vizsgált anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatás, amely módosíthatja a toxikus jellemzőket; és az állatok táplálék- és vízfelvételére vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatás.

1.4.3.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha a kísérlet során a legalább 1 000 mg/testtömeg kg/nap dózisszint, ill. a táplálékban vagy ivóvízben beadott anyagmennyiség megfelelő koncentrációja (a testtömeg alapján végzett számítások szerint) és az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határértékvizsgálat alkalmazható, kivéve, ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **A dózisok beadása**

A kísérleti állatoknak a vizsgált anyagot 90 napon keresztül heti hét napon át, naponta adagolják. Bármely más adagolási rendszer – pl. heti öt nap – célszerűségét indokolni kell. Ha a vizsgált anyagot gyomorszondán át adják be, akkor ennek vagy egy megfelelő intubációs kanülnek a segítségével egyetlen adagban juttatják be a szert. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. E mennyiség nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeget, kivéve a vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100g testtömeg adható. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi adagolási szinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

▼B

A táplálékkal vagy ivóvízzel adagolt anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt és a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal együtt adják be, akkor vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják. A kiválasztott módszert megjelölik. Gyomorszondán át történő adagolás esetén a dózist minden nap azonos időpontban adják be, mennyiségét a kísérleti állat testtömegéhez igazítják, és azonos mennyiséget adnak be minden alkalommal. Ha a 90 napos vizsgálatot egy hosszan tartó krónikustoxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik, akkor a két kísérletben azonos étrendet alkalmaznak.

1.5.2. **Megfigyelések**

A megfigyelési időszak legalább 90 nap. A kísérőcsoportban lévő állatokat, amelyekkel további megfigyeléseket terveznek, megfelelő hosszúságú időszakra kezelés nélkül tartják, hogy a toxikus hatások késleltetett előfordulását vagy megmaradását, vagy visszafordíthatóságát megfigyeljék.

Általános klinikai megfigyelést végeznek naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Feljegyzik a kísérleti állatok klinikai kórállapotát. Naponta legalább kétszer, rendszerint a nap elején és végén megvizsgálják az összes állatot, hogy nem mutatják-e a morbiditás és mortalitás jeleit.

A vizsgált anyag hatásának való első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően hetente egyszer az összes állatot részletes klinikai vizsgálatoknak vetik alá. E megfigyeléseket azon ketreceken kívül, ahol egyébként tartják őket, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában végzik el. A megfigyeléseket gondosan feljegyzik, lehetőleg a vizsgálatot végző laboratórium által meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy a megfigyelési feltételek változatlanok legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük, de nem korlátozandók a következőkre: a bőr, a bunda, a szemek és a nyálkahártyák állapotának, a vizelet- és ürülékkiválasztás és az autonóm mozgások (pl. könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupilla mérete, szokatlan légzési ritmusok) változásaira. A testtartás, a járás bizonytalansága, a kézbevételre bekövetkezett változások, valamint a tónusos vagy klónusos görcsök, sztereotip viselkedés (pl. túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (pl. öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is feljegyzik (1).

A vizsgált anyag beadását szemtükörrel vagy más, egyenértékű eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet a vizsgálatsorozat végén megismételnek, lehetőleg az összes állaton, de legalább a nagy dózist kapott egyedeken és a kontrollcsoport tagjain. Ha a szemben elváltozást tapasztalnak, az összes állatot megvizsgálják.

Az expozíciós időszak vége felé és a 11. hétnél semmiképpen sem korábban elvégezik a különböző típusú (1) ingerekre (hallószervi, vizuális, önérzékelési ingerek) mutatott reakciók vizsgálatát (2), (3), (4), a fogás/szorítás erejének becslését (5) és a motoros aktivitás felmérését (6). A követendő eljárások további részletei a megfelelő szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárásokat is lehet alkalmazni.

A vizsgálatsorozat végén lefolytatott funkcionális megfigyelésektől el lehet tekinteni, ha ilyen jellegű adatok más vizsgálatok alapján rendelkezésre állnak, és a napi klinikai megfigyelések nem tártak fel funkcionális hiányosságokat.

▼B

Kivételesen a funkcionális megfigyelésektől azon csoportok esetében is el lehet tekinteni, amelyek egyébként olyan mértékű toxicitás jeleit produkálják, ami már jelentős mértékben megzavarná a funkcionális vizsgálat eredményeit.

1.5.2.1. *Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás*

Minden állatot hetente legalább egyszer lemérnek. A felvett táplálék mennyiségét hetente legalább egyszer lemérik. Ha a vizsgált anyagot az ivóvízbe keverik, akkor a vízfogyasztást is legalább hetente lemérik. A vízfogyasztás a táplálékkal és a gyomorszondával történő bejuttatásra alapozott vizsgálatoknál is figyelembe vehető tényező, mivel ezek során az ivási szokások megváltozhatnak.

1.5.2.2. *Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok*

Vérmintákat vesznek egy megnevezett helyről és – amennyiben lehetséges – ezeket megfelelő körülmények között tárolják. A vizsgálati időszak végén az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként vérmintát vesznek.

A vizsgálati időszak végén és az esetleges időközi vérmintavétel alkalmával a következő hematológiai vizsgálatokat végzik el: hematokrit, hemoglobin koncentráció, vörösvértestszám, leukocitaszám (teljes és differenciált vérkép), trombocitaszám és a véralvadási idő/-képesség mérése.

A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként elvégzett vérvétel során szerzett mintán végzik el (eltekintve a haldokló és/vagy időközben leölt egyedektől). A hematológiai vizsgálatokhoz hasonló módon időközbeni mintavételt lehet végezni klinikai biokémiai vizsgálatok céljaira. A vérvétel előtti éjszaka ajánlatos az állatokat koplaltatni ([1]). A vérplazma-és vérszérummeghatározások során vizsgálandó elemek: nátrium, kálium, vércukor, összkoleszterin, karbamid, vér karbamid-nitrogén szintje, kreatinin, összprotein és albumin, továbbá több mint két, májkárosodást jelző enzim (pl. alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alkalikus foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz és szorbit-dehidrogenáz). További enzimek vizsgálatát (májjal vagy más szervekkel kapcsolatosakat), és az epesavak mérését, amelyek bizonyos körülmények között hasznos információkkal szolgálhatnak, szintén be lehet vonni a vizsgálatok körébe.

Kiegészítésként, a vizsgálatok utolsó hetében, amikor a vizeletet előre meghatározott időpontokban gyűjtik, az alábbi vizeletmintavizsgálatokat lehet elvégezni: megjelenés, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek.

Ezeken túlmenően megfontolható az általános szöveti roncsolódás szérummarkereinek vizsgálata. Más vizsgálatokat is elvégeznek, ha a vizsgált anyagnak ismert vagy feltételezhető hatása van a kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen pl. a kalcium, a foszfát, éhgyomorra mért triglicerid, specifikus hormonok, a methemoglobin és a kolinészteráz mérése. Ezeket az értékeket az egyes besorolási osztályokhoz tartozó vegyi anyagokra nézve vagy eseti alapon célszerű meghatározni.

([1]) A szérum- és a plazmavizsgálatok, de főleg a glükóz meghatározása miatt ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy ha a vizsgálatokat megelőző koplaltatás nélkül végzik, akkor a kapott eredmények meglehetősen változatosak lennének, ami így a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését megnehezítené. Más oldalról megközelítve a kérdést, azt is el kell ismerni, hogy a koplaltatás befolyásolja a kísérleti állatok (rendes) anyagcseréjét, különösen azon tanulmányok esetében, ahol a vizsgált anyagot a táplálékkal adagolják, és így következik be az expozíció. Ha mégis az éjszakai koplaltatás mellett döntenek, akkor a tanulmány negyedik hetében, a funkcionális megfigyeléseket követően meg kell határozni a klinikai biokémiai paramétereket.

▼B

Rugalmas hozzáállásra van szükség, amely vizsgált fajtól és az adott vizsgált anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

Ha a rendelkezésre álló kiinduló adatok nem bizonyulnak elegendőnek, akkor megfontolandó a hematológiai és klinikai biokémiai változók meghatározása az adagolás kezdete előtt. Általában nem javasolt az ilyen adatok meghatározása a kezelés megkezdése előtt (7).

1.5.2.3. *Autopszia*

A vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának vetik alá, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek szervei. Az összes állat máját, veséit, mellékveséit, heréit és mellékheréit, méhét, petefészkeit, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét (eltekintve a haldokló és/vagy időközben leölt egyedektől) megtisztítják minden rátapadt szövettől, és a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül megmérik a kiszáradás megelőzése érdekében.

Az alábbi testszöveteket mind a szövetek típusának megállapítása, mind pedig a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok szempontjából célszerű fixálni: minden szövetet, amin van makroszkópikus változás, az agyat (a reprezentatív részek között a nagyagyat, kisagyat és a nyúltagyat/nyúltagyi hidat), a gerincvelőt (három szinten: nyaki, mellkasi középső szakasz és ágyéktájék), a hipofízist, a pajzsmirigyet és mellékpajzsmirigyet, a csecsemőmirigyet, a nyelőcsövet, a nyálmirigyeket, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Peyer-plakkot), a májat, a hasnyálmirigyet, a veséket, a mellékveséket, a lépet, szívet, a légcsövet és a tüdőket (ezeket felfújt állapotban kell rögzíteni és fixálni), az aortát, ivarmirigyeket, a méhet, a járulékos ivarszerveket, a nőstények emlőmirigyeit, a prosztatát, a húgyhólyagot, az epehólyagot (egérnél), a nyirokcsomókat (egyet lehetőleg a vizsgált anyag beadási útvonalába eső, egyet pedig egy attól távoli helyről véve, a keringési rendszerre gyakorolt hatások megállapításához), a perifériás idegeket (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, egy metszetet a csontvelőből (és/vagy egy, friss csontvelőből felszívott mintát), a bőrt és a szemeket (ha a szemészeti vizsgálatok elváltozásokat jeleztek). A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükségesnek tűnhet. A fentieken túl megőriznek minden olyan más szervet is, amelyek a vizsgált anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszerveknek tekinthetők.

1.5.2.4. *Kórszövettani vizsgálatok*

A tartósított szerveket és szöveteket mind a kontrollcsoport, mind a magas dózissal kezelt csoport összes egyede esetében teljes kórszövettani vizsgálatnak vetik alá. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, e vizsgálatot az összes többi, különböző dózissal kezelt csoport egyedeire is kiterjesztik.

Minden makroszkopikus eltávozást megvizsgálnak.

Ún. kiegészítő csoport használata esetén az egyedek azon szerveit és szöveteit vizsgálják meg, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. ADATOK

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a kísérlet során, valamint az elpusztulás és az elpusztítás időpontját; hány egyed mutatta toxicitás jeleit, a megfigyelt toxicitás jeleinek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát.

Amennyiben lehetséges, a nyers adatokat megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel értékelik ki. A statisztikai módszert már a vizsgálat tervezésének idején kiválasztják.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – tartalmazza a következő információkat:

2.2.1. **A vizsgált anyag**

— fizikai megjelenése, tisztasága és fizikai-kémiai tulajdonságai,

— azonosító adatok,

— vivőanyag (ha van): a vivőanyag – ha az nem víz – kiválasztásának indoklása.

2.2.2. **A vizsgált fajok**

— a felhasznált állatok faja és törzse,

— az állatok száma, életkora és neme,

— az állatok eredete, tartási körülmények, étrend stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálatok kezdetekor.

2.2.3. **Vizsgálati körülmények**

— a dózisszintek megválasztásának indokai,

— a vizsgált anyag formulálásának/étrendbe való beillesztésére vonatkozó részletek, a készítmény koncentrációja, stabilitása és homogenitása,

— a vizsgált anyag adagolásának részletei,

— átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/testtömeg kg/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó adatok.

2.2.4. **Eredmények**

— az egyedek testsúlya és annak változásai,

— táplálék-/vízfogyasztásra vonatkozó adatok,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok, nemek és adagolási szint szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

▼B

— a megfigyelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek vagy nem);

— a szemészeti vizsgálatok eredményei,

— érzékszervek működése, szorítás erőssége, motoros aktivitás értékelése (ahol ilyen adatok rendelkezésre állnak),

— hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a végső testtömeg, szervtömegek és a szervtömeg/testtömeg hányadosok,

— boncolási leletek,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— abszorpciós adatok, ha ilyenek rendelkezésre állnak,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, amennyiben lehetséges.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

3. **SZAKIRODALOM**

(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 Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial 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. SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT, 90 NAPOS, ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT NEM RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

E szubkrónikusorálistoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 409-nek (1998).

1.1. BEVEZETÉS

Egy vegyi anyag toxikus jellemzőinek értékelése és felmérése során az ismételt adagolású szubkrónikus orális toxicitást azután lehet meghatározni, hogy az akut vagy 28 napos ismételt adagolású toxicitásvizsgálatok kezdeti eredményei már rendelkezésre állnak. A 90 napos vizsgálat olyan hosszabb időtartamú ismételt expozícióból származó lehetséges egészségkárosodás veszélyeiről szolgáltat információkat, ami időben átfogja a fiatal felnőttkorig terjedő gyors növekedés szakaszát. A vizsgálat tájékoztat a fontosabb toxikus hatásokról, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét, és becslést ad az expozíció kimutatható káros hatással nem járó szintjére (NOAEL) nézve, amit fel lehet használni a krónikustoxicitás-vizsgálatok során az adagolási szintjeinek kiválasztásához és az emberi expozíció biztonsági kritériumainak megállapításához.

A vizsgálati módszer, amely lehetővé teszi a vegyi anyagoknak való kitettség kedvezőtlen hatásainak meghatározását nem rágcsálókon, csak az alábbi esetekben használandó:

— ha más vizsgálatok megállapításai jelzik annak szükségességét, hogy egy második, nem rágcsáló fajon végzett kísérlettel kell tisztázni/leírni az eredményeket,

— ha a toxikokinetikai vizsgálatok arra utalnak, hogy a laboratóriumi kísérletek céljaira egy specifikus nem rágcsáló típusú faj lenne a legmegfelelőbb kísérleti állat,

— ha más, különleges okok indokolják egy nem rágcsáló faj használatát.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Dózis: a vizsgált anyag beadott mennyisége. A dózis mennyiségét tömegben (gramm vagy milligramm) vagy a vizsgált anyag és a vizsgált állat tömegének hányadosában (pl. milligramm anyag/testtömeg kilogramm), vagy állandó táplálékbeli koncentráció formájában (ppm vagy milligramm/táplálék-kilogramm) fejezik ki.

Adagolás: általános meghatározás, ami a dózist, az adagolás gyakoriságát és időtartamát tartalmazza.

NOAEL: a „kimutatható káros hatással nem járó dózisszint” (no observed adverse effect level) rövidítése, azon legmagasabb dózisszintet jelöli, amelynél nem észlelhető a kezeléssel összefüggő kedvezőtlen hatás.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta szájon át adják be több kísérleti állatcsoportnak, csoportonként más-más adagolási szinten, 90 napon keresztül. A szer beadása időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében gondosan megfigyelik. Az elpusztult, illetve az elpusztított állatokat felboncolják, illetőleg a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat is elpusztítják és felboncolják.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **A faj kiválasztása**

A nem rágcsáló fajok közül a leggyakrabban használt a kutya, annak is egy meghatározott fajtája; ez rendszerint a beagle kutya. Más állatfajok is használhatók, pl. a sertés vagy a törpemalac. Főemlősök használata nem javasolt, külön indoklást igényel. Fiatal, egészséges állatokat használnak; a kutya esetében a vizsgált anyag adagolását 4–6 hónapos életkorban, de kilenc hónapos kornál nem később célszerű megkezdeni. Ha a vizsgálatot egy hosszú távú krónikustoxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik el, akkor mindkét kísérlethez ugyanazon törzsből való, azonos eredetű állatokat használnak.

1.4.2. **Az állatok előkészítése**

A laboratóriumi körülményekhez hozzászoktatott és korábbi kísérleti eljárásoknak még alá nem vetett, egészséges, fiatal állatokat használnak fel. Az akklimatizáció időtartama a kísérlethez kiválasztott fajtól és az állatok eredetétől függ. Kutyák és a helyben, e célra tenyésztett sertések esetében legalább öt nap, míg a külső forrásból beszerzett állatoknál legalább két hét szoktatási időtartam ajánlott. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, testtömeg és/vagy életkor szerint leírják. Az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportokba osztják be. A ketreceiket olyan módon helyezik el, hogy az elhelyezésükből adódó lehetséges hatásokat a minimumra lehessen csökkenteni. Minden állatot számmal jelölnek meg az egyedi azonosíthatóság céljából.

1.4.3. **A dózisok előkészítése**

A vizsgált anyagot gyomorszondán át, az állatok táplálékába vagy az ivóvízbe keverve vagy kapszulákban adják be. A szájon át történő beadás módszerét a vizsgálat céljától, valamint a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függően választják meg.

Szükség esetén a vizsgált anyagot feloldják vagy szuszpendálják alkalmas vivőanyagban, amennyiben lehetséges, elsősorban a vizes oldat/szuszpenzió használata javasolt, másodsorban az olajos oldat/-emulzió (pl. kukoricaolaj) alkalmazása jöhet számításba, és ezt követheti a másfajta vivőanyagokban való feloldás. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük. Meghatározzák a vizsgált anyag stabilitását a beadás körülményei között.

1.5 A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Az állatok száma és neme**

Minden dózisszinthez legalább 8 állatot (4 hímet és 4 nőstényt) alkalmaznak. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a csoport létszámát a kísérlet során elpusztítani szándékozott állatok számával megnövelik. A kísérlet végére életben maradó állatok száma elégséges kell, hogy legyen a toxikus hatások értékeléséhez. A vegyi anyagra vagy annak egy közeli analógiájára vonatkozó korábbi ismeretekre alapozva fontolóra lehet venni egy további, 8 állatból (4 hím és 4 nőstény) álló ún. kísérőcsoport használatát a kontrollcsoportban és a legnagyobb adaggal kezelt csoportban, hogy a kezelés időszakát követően meg lehessen figyelni a toxikus hatás reverzibilitását vagy tartósságát. Az ilyen, kezelés utáni időszak hosszát a megfigyelt hatások figyelembevételével határozzák meg.

▼B

1.5.2. **Adagolási szintek**

Legalább három dózisszintet és egy párhuzamos kontrollszintet alkalmaznak, kivéve, ha határérték-vizsgálatra kerül sor (ld. 1.5.3. pont). A dózisszintet ismételt dózis vagy dózisbehatároló vizsgálatok eredményeire lehet alapozni, figyelembe véve minden korábbi, a vizsgált vagy azzal rokon anyagok toxicitására és a toxiko-kinetikára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. Ha a vizsgált anyag fizikai-kémiai tulajdonságai vagy biológiai hatásai nem szabnak korlátokat, akkor a legmagasabb adagolási szintet úgy választják ki, hogy az az állat halála vagy komoly szenvedése nélkül idézze elő a toxicitást. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik azzal a céllal, hogy bemutassák a dózisszinttől függő hatásokat és a kimutatható káros hatással nem járó dózisszintet (NOAEL). A csökkenő dózisok beállításához gyakran kétszeres-négyszeres hosszúságú időszakok bizonyulnak optimálisnak, és sokszor tanácsos egy negyedik kezelt csoport alkalmazása, igen nagy dózisbeli különbség (pl. több mint 6–10-szeres) alkalmazásával.

A kontrollcsoport vagy kezeletlen állatokból áll, vagy a vivőanyag ellenőrzésére szolgál, ha a vizsgált anyag adagolásának elősegítésére vivőanyagot használnak. A vizsgált anyaggal való kezeléstől eltekintve a kontrollcsoportban lévő állatokat a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik. Ha vivőanyagot használnak a vizsgált anyag beadásához, akkor a kontrollcsoport a vivőanyagot a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kapja. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal viszik be, és emiatt az állatok kevesebb táplálékot vesznek magukhoz, akkor egy párhuzamosan táplált kontrollcsoport használata hasznos lehet annak megállapításához, hogy a csökkent étvágy a táplálék ízletességével vagy a vizsgálati modellben beállt toxikológiai változásokkal áll-e összefüggésben.

Figyelembe veszik a vivőanyag és – esettől függően – más adalékanyagok alábbi jellemzőit: a felszívódásra, eloszlásra vagy anyagcserére gyakorolt hatás, a vizsgált anyagnak a szervezetben való visszatartására, ill. a vizsgált anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatás, amely módosíthatja a toxikus jellemzőket; és az állatok táplálék- és vízfelvételére vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatás.

1.5.3. **Határérték-vizsgálat**

Ha a kísérlet során a legalább 1 000mg/testtömeg kg/nap dózisszint és az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó vizsgálat elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazható, kivéve, ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.5.4. **A dózisok beadása**

A kísérleti állatoknak a vizsgált anyagot 90 napon keresztül heti hét napon át, naponta adagolják. Bármely más adagolási rendszer – pl. heti öt nap – célszerűségét indokolni kell. Ha a vizsgált anyagot gyomorszondán át adják be, akkor ennek vagy egy megfelelő intubációs kanülnek a segítségével egyetlen adagban juttatják be a szert. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. Ennek a mennyiségnek lehetőség szerint alacsonynak kell lennie. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

▼B

A táplálékkal vagy ivóvízzel adagolt anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt és a vízháztartás egyensúlyát. Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal együtt adják be, akkor vagy állandó koncentrációban (ppm) keverik be, vagy az állat testsúlyától függő, állandó nagyságú dózisban adagolják. A kiválasztott módszert megjelölik. Gyomorszondán át vagy kapszulával történő adagolás esetén a dózist minden nap azonos időpontban adják be, mennyiségét a kísérleti állat testtömegéhez igazítják, és azonos mennyiséget adnak be minden alkalommal. Ha a 90 napos vizsgálatot egy hosszan tartó krónikus-toxicitás-vizsgálat előkísérleteként végzik, akkor a két kísérletben azonos étrendet alkalmaznak.

1.5.5. **Megfigyelések**

A megfigyelési időszak legalább 90 nap. A kísérőcsoportban lévő állatokat, amelyekkel további megfigyeléseket terveznek, megfelelő hosszúságú időszakra kezelés nélkül tartják, hogy a toxikus hatások késleltetett előfordulását vagy megmaradását, vagy visszafordíthatóságát megfigyeljék.

Általános klinikai megfigyelést végeznek naponta legalább egyszer, lehetőleg minden nap ugyazon időpont(ok)ban, figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Feljegyzik a kísérleti állatok klinikai kórállapotát. Naponta legalább kétszer, rendszerint a nap elején és végén megvizsgálják az összes állatot, hogy nem mutatják-e a morbiditás és mortalitás jeleit.

A vizsgált anyag hatásának való első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), azt követően hetente egyszer az összes állatot részletes klinikai vizsgálatoknak vetik alá. E megfigyeléseket azon ketreceken kívül, ahol egyébként tartják őket, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában végzik el. A megfigyeléseket gondosan feljegyzik, beleértve jelentkezésük időpontját, méretüket és tartalmukat. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük, de nem korlátozandók a következőkre: a bőr, a bunda, a szemek és a nyálkahártyák állapotának, a vizelet- és ürülékkiválasztás és az autonóm mozgások (pl. könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupilla mérete, szokatlan légzési ritmusok) változásaira. A testtartás, a járás bizonytalansága, a kézbevétel, valamint a tónusos vagy klónusos görcsök, sztereotip viselkedés (pl. túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (pl. öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is feljegyezik.

A vizsgált anyag beadását szemtükörrel vagy más, egyenértékű eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet a vizsgálatsorozat végén megismételnek, lehetőleg az összes állaton, de legalább a nagy dózist kapott egyedeken és a kontrollcsoport tagjain. Ha a szemben elváltozást tapasztalnak, az összes állatot megvizsgálják.

1.5.5.1. *Testtömeg és táplálék-/vízfogyasztás*

Minden állatot hetente legalább egyszer lemérnek. A felvett táplálék mennyiségét hetente legalább egyszer lemérik. Ha a vizsgált anyagot az ivóvízbe keverik, akkor a vízfogyasztást is legalább hetente lemérik. A vízfogyasztás a táplálékkal és a gyomorszondával történő bejuttatásra alapozott vizsgálatoknál is figyelembe vehető tényező, mivel ezek során az ivási szokások megváltozhatnak.

▼B

1.5.5.2. *Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok*

Vérmintákat vesznek egy megnevezett helyről és – amennyiben lehetséges – ezeket megfelelő feltételek mellett tárolják. A vizsgálati időszak végén az állatok elpusztítása előtt vagy annak részeként vérmintát vesznek.

A vizsgálatok elején, majd vagy havi rendszerességgel, vagy a vizsgálati időszak közepe táján és végül a vizsgálati időszak végén a következőkre kiterjedő hematológiai vizsgálatokat végezik el: hematokrit, hemoglobin-koncentráció, vörösvértestszám, leukocitaszám (teljes és differenciált vérkép), trombocitaszám, illetve a véralvadási idő/képesség mérése, protrombinidő vagy tromboplasztinidő mérése.

A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását minden állat vérmintáján elvégzik a vizsgálatok elején, majd vagy havi rendszerességgel, vagy a vizsgálati időszak közepe táján, és végül a vizsgálati időszak végén. A vizsgálatok az alábbi területekre terjednek ki: elektrolit-egyensúly, szénhidrát-anyagcsere, valamint máj- és vesefunkció. Az elvégzendő vizsgálatok kiválasztása függ a vizsgált anyag hatásmechanizmusa megfigyelésének módjaitól. Az állatokat a fajra meghatározott megfelelő ideig koplaltatják a vérvétel előtt. A vizsgálandó elemek: kalcium, foszfor, klorid, nátrium, kálium, éhgyomorra mért vércukor, alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, ornitin-dekarboxiláz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, karbamid nitrogén, albumin, vérkreatinin, összes bilirubin és összes szérumprotein.

Legalább a vizsgálatok elejére, közepére, majd a végére időzített vizeletgyűjtéssel az alábbi vizeletminta-vizsgálatokat végezik el: megjelenés, mennyiség, ozmolaritás vagy fajsúly, pH-érték, fehérjék, glukóz és vér/vérsejtek. Szükség szerint további paraméterek vizsgálatát is be lehet vezetni, a megfigyelt hatás(ok) vizsgálati körének bővítése érdekében.

Ezenfelül célszerű lehet elvégezni az általános jellegű szövetsérülések szérumjelzőinek a vizsgálatát. A megfelelő toxikológiai értékeléshez még esetlegesen szükséges további mérések és vizsgálatok közé tartozik a lipidek, hormonok elemzése, sav/bázis egyensúly, methemoglobin- és kolineszteráz-inhibitáció. A megfigyelt hatások vizsgálati körének bővítése érdekében további klinikai biokémiai vizsgálatokat lehet bevezetni. Ezeket az egyes besorolási osztályokhoz tartozó vegyi anyagokra nézve vagy eseti alapon célszerű meghatározni.

Rugalmas hozzáállásra van szükség, amely a vizsgált fajtól és az adott vizsgált anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

1.5.5.3. *Autopszia*

A vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának vetik alá, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg és a hasüreg és ezek szervei. Az összes állat máját az epehólyaggal együtt, veséit, mellékveséit, heréit és mellékheréit, méhét, petefészkeit, pajzsmirigyét (a mellékpajzsmirigyekkel együtt), csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét (eltekintve a haldokló és/vagy időközben leölt egyedektől) megtisztítják minden rátapadt szövettől, és a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül megmérik a kiszáradás megelőzése érdekében.

▼B

Az alábbi testszöveteket mind a szövetek típusának megállapítása, mind pedig a szándékolt későbbi kórszövettani vizsgálatok szempontjából célszerű konzerválni a legmegfelelőbb fixálószerben: minden szövetet, amin van makroszkópikus elváltozás, az agyat (a reprezentatív részek között a nagyagyat, kisagyat és a nyúltagyat/nyúltagyi hidat), a gerincvelőt (három szinten: nyaki, mellkasi középső szakasz és ágyéktájék), a hipofízist, a szemeket, a pajzsmirigyet és mellékpajzsmirigyet, a csecsemőmirigyet, a nyelőcsövet, a nyálmirigyeket, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Peyer-plakkot), a májat, az epehólyagot, a hasnyálmirigyet, a veséket, a mellékveséket, a lépet, a szívet, a légcsövet és a tüdőket, az aortákat, ivarmirigyeket, a méhet, a járulékos ivarszerveket, a nőstények emlőmirigyeit, a prosztatát, a húgyhólyagot, a nyirokcsomókat (egyet lehetőleg a vizsgált anyag beadási útvonalába eső, egyet pedig egy attól távoli helyről véve, a keringési rendszerre gyakorolt hatások megállapításához), a perifériás idegeket (csípő vagy sípcsont környéki), lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve, egy metszetet a csontvelőből (és/vagy egy, friss csontvelőből felszívott mintát) és a bőrt. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükségesnek tűnhet. A fentieken túl megőriznek minden olyan más szervet is, amelyek a vizsgált anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszerveknek tekinthetők.

1.5.5.4. *Kórszövettani vizsgálatok*

A tartósított szerveket és szöveteket mind a kontrollcsoport, mind a magas dózissal kezelt csoport összes egyede esetében teljes kórszövettani vizsgálatnak vetik alá. Ha a magas dózissal kezelt csoport egyedei esetében a kezelésnek tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, ezt a vizsgálatot az összes többi, különböző dózissal kezelt csoport egyedeire is kiterjesztik.

Minden makroszkópikus elváltozást megvizsgálnak.

Ún. kiegészítő csoport használata esetén az egyedek azon szerveit és szöveteit vizsgálják meg, amelyeknél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozásokat lehetett kimutatni.

2. ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS

2.1. ADATOK

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a kísérlet során, valamint az elpusztulás és az elpusztítás időpontját; hány egyed mutatta toxicitás jeleit, a megfigyelt toxicitás jeleinek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát.

Amennyiben lehetséges, a nyers adatokat megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel értékelik ki. A feldolgozandó adatokat és statisztikai módszereket már a vizsgálat tervezésének idején kiválasztják.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – tartalmazza a következő információkat:

▼B

2.2.1. **A vizsgált anyag**

— fizikai megjelenése, tisztasága és fizikai-kémiai tulajdonságai,

— azonosító adatok,

— vivőanyag (ha van): a vivőanyag – ha az nem víz – kiválasztásának indoklása.

2.2.2. **A vizsgált fajok**

— a felhasznált állatok faja és törzse,

— az állatok száma, életkora és neme,

— az állatok eredete, tartási körülmények, étrend stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálatok kezdetekor.

2.2.3. **Vizsgálati körülmények**

— a dózisszintek megválasztásának indokai,

— a vizsgált anyag formulálásának/étrendbe való beillesztésére vonatkozó részletek, a készítmény koncentrációja, stabilitása és homogenitása,

— a vizsgált anyag adagolásának részletei,

— a tényleges dózis (mg/testtömeg kg/nap) és az étrendbe illesztett, illetve vízzel beadott vizsgált anyag koncentrációjának (ppm) a tényleges dózisra való átváltási tényezője, ha ilyen értelmezhető a vizsgálatok során,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek.

2.2.4. **Eredmények**

— az egyedek testtömege és annak változásai,

— táplálék-/vízfogyasztásra vonatkozó adatok,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok, nemek és adagolási szint szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (a változások reverzibilisek-e vagy sem)

— a szemészeti vizsgálatok eredményei,

— a hematológiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a klinikai biokémiai vizsgálatok eredményei, a megfelelő viszonyítási értékekkel,

— a végső testtömeg, szervtömegek és a szervek/-testtömeghányadosok,

— boncolási leletek,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— abszorbciós adatok, ha ilyenek rendelkezésre állnak,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, amennyiben lehetséges.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

▼B

B.28. **SZUBKRÓNIKUS DERMÁLIS TOXICITÁSVIZSGÁLAT, 90 NAPOS, ISMÉTELT DERMÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓFAJOKON**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta a bőrre adagoljuk, fokozatosan növekvő dózisokban több kísérleti állatcsoportnak, 90 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a mérgezés jeleinek észlelése érdekében. A vizsgálat ideje alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni, a vizsgálat lezárásakor pedig a túlélő állatokat is el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és táplálási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. A vizsgálat megkezdése előtt nem sokkal a törzs háti felületén le kell nyírni az állatok szőrét. Borotválni is lehet, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A vizsgálat során általában ismételt nyírás és borotválás szükséges, rendszerint heti időközönként. A nyírás vagy borotválás során gondosan ügyelni kell arra, hogy a bőrt ne sértsük meg. A testfelület legalább 10 %-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Az állat testsúlyát is tekintetbe kell venni, amikor a megtisztítandó felületről, illetve a fedőkötés méretéről döntünk. Ha szilárd anyagot vizsgálunk, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy a bőrrel megfelelő módon érintkezzen. A folyékony vizsgálati anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni. Az adagolás heti öt-hét alkalommal történik.

1.6.2. **Vizsgálati körülmények**

1.6.2.1. A kísérlethez felhasznált állatok

Kifejlett patkány, nyúl vagy tengerimalac használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus dermális vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

▼B

1.6.2.2. Az állatok száma és neme

Minden adagolási szinthez legalább 20 egészséges bőrű állatot (10 hímet és 10 nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást tervezünk, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el akarunk pusztítani. Ezenkívül még egy 20 fős (nemenként 10 állat) kíséről állatcsoportot is kezelhetünk a legnagyobb adaggal 90 napon át, amelyeknek állatain a kezelés után 28 nappal megfigyelhetjük a toxikus hatás visszafordíthatóságát, elhúzódó vagy késve fellépő voltát.

1.6.2.3. Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni, illetve egy vivőanyagkontrollt, ha van vivőanyag. Az expozíciós idő legalább napi hat óra legyen. A vizsgált anyagot minden nap hasonló időpontban kell alkalmazni, az alkalmazott mennyiséget pedig meghatározott időközönként (hetente vagy kéthetente) hozzá kell igazítani az állatok növekedéséhez, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal kezelni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy abban jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, de elhullások lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben legyenek. A legkisebb adaggal kezelt csoportban nem lehetnek a toxicitásra utaló jelek. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmazunk, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózisú, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyag alkalmazása súlyos bőrirritációt okoz, a koncentrációt csökkenteni kell, ami az egyéb toxikus hatások mértékének csökkenésével vagy eltűnésével járhat a legnagyobb adaggal kezelt csoportban. Ha a bőr súlyosan károsodott, szükségessé válhat a vizsgálat leállítása és egy új vizsgálat megkezdése kisebb koncentrációk mellett.

1.6.3. **Határérték-vizsgálat**

Ha az előzetes vizsgálat során napi 1 000 mg/testsúlykilogrammal adagolt vizsgált anyag vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózis semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők.

1.6.4. **Megfigyelési időszak**

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni a toxikus hatások megjelenésének észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját, valamint azt az időpontot, amikor a toxikus hatás jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

▼B

1.6.5. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 90 napon keresztül.

A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 28 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. Az anyaggal való érintkezés ideje napi hat óra.

A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10 %-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

Az expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel egy lyukacsos gézlap segítségével és nem irritáló ragasztószalaggal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni azért, hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt.

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, valamint a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni. Hetente mérni kell a takarmányfogyasztást, valamint az állatok súlyát. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat eltávolításuk után el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat rendszeresen el kell végezni az összes állaton, beleértve a kontrollcsoport egyedeit is:

a) Lehetőleg minden állatot, de legalább a legnagyobb adaggal kezelt és a kontrollcsoportban lévő állatokat szemvizsgálatnak kell alávetni szemtükör vagy ezzel egyenértékű, megfelelő készülék segítségével az expozíciót megelőzően és a vizsgálat végeztével. Ha a szemen elváltozás észlelhető, akkor minden állatot meg kell vizsgálni.

b) A hematológiai vizsgálat részeként a vizsgálati időszak végeztével mérni kell a hematokrit-értéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a minőségi és a teljes fehérvérsejtszámot, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt, a protrombin időt, a tromboplasztin időt, illetve a trombocitaszámot.

▼B

c) A vizsgálati időszak végeztével a vérmintákat klinikai-kémiai vizsgálatoknak is alá kell vetni. Fontos megvizsgálni az elektrolit-egyensúlyt, a szénhidrát-anyagcserét, a máj-, illetve a vesefunkciót. Az egyes vizsgálatok kiválasztását a vizsgált anyag hatásmechanizmusával kapcsolatos megfigyelések befolyásolják. Javasolt meghatározni: a kalcium, a foszfor, a klorid, a nátrium, a kálium szintjét, éhgyomorra kell mérni a glükózszintet (az adott fajra jellemző és megfelelő éheztetési idő után), a szérum glutaminsav szőlősav transzamináz (GPT) ([1]), a szérum glutaminsav oxálsav transzamináz (GOT) ([2]), az ornitin dekarboxiláz, a gamma glutamil-transzpeptidáz, a karbamid nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összes bilirubin és az összes szérumfehérje szintjét szintén meg kell határozni. További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: lipidelemzés, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin- és kolineszteráz-aktivitás mérése. Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

d) Vizeletelemzésre általában nincs szükség, csak akkor, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás ezt indokolja.

Ha a korábbi kísérletekből származó adatok nem megfelelőek, mérlegelendő a hematológiai és klinikai-kémiai paraméterek meghatározása az adagolás megkezdése előtt.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, amely a test külső felületének, a testnyílásoknak, valamint a koponya-, mell- és hasüregnek, illetve a bennük található szerveknek a feltárásából és vizsgálatából áll. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb még nedvesen le kell mérni, a kiszáradás elkerülése miatt. Az alábbi szerveket kell megfelelő közegben tartósan tárolni egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira: valamennyi olyan szerv, amelyen makroszkopikus elváltozás található, az agy – beleértve a nyúltagy, a híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg és az agyalapi mirigy metszeteit, a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy, bármilyen jelen levő csecsemőmirigy, a légcső és a tüdő, a szív, az aorta, (a nyálmirigyek), a máj, a lép, a vesék, a mellékvesék, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek, a méh, (a járulékos nemi szervek), az epehólyag, ha megtalálható, a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a húgyhólyag, a reprezentatív nyirokcsomók, (a női emlőmirigy), (a combizomzat), a perifériás idegek, (a szemek), (a szegycsont a csontvelővel), (a combcsont az ízületi felülettel együtt), (a gerincoszlop három szinten – nyaki, mellkasközéptáji és ágyéki csigolyáknál), valamint (a szemüregen kívüli könnymirigyek). A zárójelben említett szöveteket csak akkor kell megvizsgálni, ha célszervként szerepelnek, illetve, ha a toxicitás tünetei ezt indokolják.

Kórszövettani vizsgálatok

a) Teljes körű kórszövettani vizsgálatot kell végezni a kontrollcsoport és a legnagyobb adaggal kezelt csoport állatainak bőrén, szervein és szövetein.

b) Az összes olyan szervet, amelyen makroszkopikus elváltozás található, meg kell vizsgálni.

([1]) Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
([2]) Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.

▼B

c) A többi dóziscsoport állatainak célszerveit is meg kell vizsgálni.

d) Ha patkányokat használunk, a kis, illetve közepes dózissal kezelt csoportok állatainak tüdejét kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni a fertőzés jeleit keresve, ez ugyanis az állat egészségi állapotának alkalmas értékelésére szolgál. E csoportok állatainál további kórszövettani vizsgálatokra rutinszerűen nincs szükség, de minden esetben vizsgálatokat kell végezni az olyan szerveken, amelyek az elváltozás jeleit mutatták a legnagyobb dózissal kezelt csoportban.

e) Ha kísérő csoportot is használunk, azokon a szöveteken és szerveken, amelyek a kezelt csoportokban elváltozásokat mutattak, itt is el kell végezni a kórszövettani vizsgálatokat.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait, illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

— vizsgálati körülmények,

— adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,

— a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

— lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,

— az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

— a toxikus és más hatások leírása,

— az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

— a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,

— szemészeti leletek,

— az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,

— az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),

— boncolási leletek,

▼B

— a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼M4

B.29. **SZUBKRÓNIKUS INHALÁCIÓS TOXICITÁS: 90 NAPOS VIZSGÁLAT**

ÖSSZEFOGLALÁS

A jelen felülvizsgált B.29. vizsgálati módszert úgy alakították ki, hogy azzal teljes körűen jellemezhető legyen a szubkrónikus időtartamon (90 napon) át, belégzés útján bejuttatott vizsgált vegyi anyag toxicitása, valamint megbízható adatokat lehessen gyűjteni a mennyiségi inhalációs kockázatértékelésekhez. 10 hím és 10 nőstény rágcsálóból álló csoportokat teszünk ki 90 napon (13 héten) át napi 6 órára a) a vizsgált vegyi anyagnak legalább három koncentrációszinten, b) szűrt levegőnek (negatív kontroll) és/vagy c) a vivőanyagnak (vivőanyaggal kezelt kontroll). Az állatok expozíciója általában heti 5 napon történik, azonban a hét 7 napján történő expozíció is megengedett. Mindig kell hímeket és nőstényeket is vizsgálni, azonban az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők, amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra. Ez a módszer lehetőséget biztosít a vizsgálatvezetőnek, hogy a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében kísérő (a visszafordíthatóság vizsgálatára alkalmazott) csoportokat, időközi elpusztításokat, bronchoalveoláris átmosást (BAL), neurológiai vizsgálatokat, valamint további klinikai kórtani és kórszövettani értékeléseket is belefoglaljon a vizsgálatba.

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 413. vizsgálati iránymutatásával (2009). A szubkrónikus inhalációs toxicitásra vonatkozó eredeti 413. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el (1). A jelen B.29. (a felülvizsgált 413. vizsgálati iránymutatással [2009] egyenértékű) vizsgálati módszert a tudomány jelenlegi állásának megfelelően, valamint a jelenlegi és jövőbeli szabályozási igények kielégítése érdekében frissítették.

2. A szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálatok elsődleges célja a munkahelyi környezetben a munkavállalókra nézve fennálló kockázat értékeléséhez használt hatósági koncentrációk meghatározása. Emellett a lakossági, közlekedési és környezeti humán kockázatok értékelésére is alkalmazzák azokat. Ez a módszer lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagnak 90 napon (a patkányok élettartamának körülbelül 10 %-án) át belégzés útján történő, naponta ismételt expozíció nyomán kialakuló káros hatások jellemzését. A szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálatok során kapott adatok felhasználhatók mennyiségi kockázatértékelési célokra, valamint a krónikus vizsgálatok során alkalmazott koncentrációk kiválasztásához is. E vizsgálati módszer nem kifejezetten nanoanyagok vizsgálatára szolgál. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén, valamint a 39. iránymutatásban (2) található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

3. A vizsgálat minőségének fokozása és az állatkísérletek minimalizálása érdekében a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt figyelembe kell vennie a vizsgálandó vegyi anyagról rendelkezésre álló minden információt. A megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztását segítő információk közé tartozhat a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok, valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok. Ha a vizsgálat során neurotoxicitás várható vagy figyelhető meg, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy a vizsgálat részeként megfelelő értékeléseket is kell végezni, például funkcionális megfigyelési vizsgálatot (FOB) és a motoros aktivitás mérését. Az expozícióknak az egyes vizsgálatokhoz viszonyított időzítése ugyan kritikus lehet, e kiegészítő tevékenységek azonban nem szabad, hogy akadályozzák az vizsgálat alapvető tervezését.

▼M4

4. A maró vagy irritáló hatású vegyi anyagok vizsgálhatók hígítva, olyan koncentrációban, amellyel elérhető a kívánt mértékű toxicitás. További információ a 39. iránymutatásban (2) található. Az állatok ezen anyagoknak való expozíciója során a célkoncentrációknak kellően alacsonynak kell lenniük ahhoz, hogy ne okozzanak jelentős fájdalmat és szorongást, ugyanakkor elegendőnek kell lenniük ahhoz, hogy a koncentráció-hatás görbe kiterjeszthető legyen a vizsgálat szabályozási és tudományos céljának megfelelő szintekre. E koncentrációkat eseti alapon kell kiválasztani, lehetőleg egy megfelelően megtervezett tartománybehatároló vizsgálat alapján, amely információkkal szolgál a kritikus végpontról, az esetleges irritációs küszöbértékről, valamint a hatás kezdetének idejéről (lásd a 11–13. bekezdést). A választott koncentrációt indokolni kell.

5. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani. Az elhullásközeli állapotban lévő állatokat a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatásban (3) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

6. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett rágcsálókat kell alkalmazni. A javasolt faj a patkány. Más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

7. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. A véletlen kiválasztás napján az állatoknak 7–9 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük. A testsúlyuk a nemenkénti átlagos testsúlytól legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen választjuk ki, egyedi azonosítóval látjuk el, és a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartjuk.

Az állatok tartása

8. Az állatokat a megfigyelések megkönnyítése és összetévesztésük elkerülése érdekében egyedi azonosítóval, lehetőleg bőr alatti jeladóval kell ellátni. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használunk. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet (hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

▼M4

Inhalációs kamrák

9. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok össztérfogata nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveivel, valamint azok különös előnyeivel és hátrányaival a 39. iránymutatás (2) foglalkozik.

TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK

Határkoncentrációk

10. Az akut vizsgálatoktól eltérően a szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálatok esetén nincsenek meghatározott határkoncentrációk. A maximális vizsgált koncentráció kiválasztásakor a következőket kell figyelembe venni: 1) az elérhető maximális koncentráció, 2) a legrosszabb esetben fennálló humán expozíció szintje, 3) a megfelelő oxigénellátás biztosításának szükségessége és/vagy 4) állatjóléti szempontok. Amennyiben nincsenek adatokon alapuló határértékek, az 1272/2008/EK rendeletben (13) szereplő akut határértékek alkalmazhatók (azaz aeroszolok esetén legfeljebb 5 mg/l, gőzök esetén 20 mg/l, gázok esetén pedig 20 000 ppm); lásd a 39. iránymutatást (2). Amennyiben gázok vagy erősen illékony anyagok (például hűtőfolyadékok) vizsgálata esetén e határértékeket túl kell lépni, a döntést indokolni kell. A határkoncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

Tartománybehatároló vizsgálat

11. A fő vizsgálat megkezdése előtt általában tartománybehatároló vizsgálat elvégzése szükséges. A tartománybehatároló vizsgálat átfogóbb a dózisbehatároló vizsgálatnál, mivel nem korlátozódik a koncentráció kiválasztására. A tartománybehatároló vizsgálat révén szerzett információk hozzájárulhatnak a fő vizsgálat sikeréhez. A tartománybehatároló vizsgálat például technikai jellegű információkkal szolgálhat az analitikai módszerek, a részecskeméretezés, a toxikus hatásmechanizmusok felismerése, a klinikai kórtani és kórszövettani adatok, valamint a fő vizsgálat lehetséges NOAEL- és MTC-koncentrációinak becslése vonatkozásában. A vizsgálatvezető a tartománybehatároló vizsgálatot alkalmazhatja a légzőrendszer irritációs küszöbértékének (például a légzőrendszer kórszövettani elemzése, a tüdő működésének vizsgálata vagy bronchoalveoláris átmosás útján történő) meghatározása, az állatoknak indokolatlan stresszt nem okozó, elfogadható maximális koncentráció, valamint a vizsgált vegyi anyag toxicitását legjobban jellemző paraméterek meghatározása céljából.

12. A tartománybehatároló vizsgálat egy vagy több koncentrációszintre is kiterjedhet. A választott végponttól függően mindegyik koncentrációszintnek 3–6 hímet és 3–6 nőstényt kell kitenni. A tartománybehatároló vizsgálatnak legalább 5 napig kell tartania, és általában nem tarthat tovább 28 napnál. A vizsgálati jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell a fő vizsgálathoz kiválasztott koncentrációk indokolását. A fő vizsgálat célja a koncentráció-válasz összefüggésnek a feltételezett legérzékenyebb végpont alapján történő kimutatása. Alsó koncentrációként lehetőleg olyan koncentráció választandó, amelynél nem észlelhető káros hatás, míg a felső koncentrációnak egyértelmű toxicitást kell előidéznie anélkül, hogy az állatoknak indokolatlan stresszt okozna vagy befolyásolná az élettartamukat (3).

▼M4

13. A tartománybehatároló vizsgálat során alkalmazandó koncentrációszintek kiválasztásakor figyelembe kell venni minden rendelkezésre álló információt, beleértve a szerkezet-aktivitás összefüggéseket és a hasonló vegyi anyagok adatait (lásd a 3. bekezdést). A tartománybehatároló vizsgálat megerősítheti, illetve megcáfolhatja a legérzékenyebbnek vélt mechanisztikai alapú végpontokat, például az organofoszfátok kolineszterázgátló hatását, a vörösvérsejtekre toxikus anyagok okozta methemoglobinképződést, a pajzsmirigyre toxikus anyagok esetén a pajzsmirigyhormonokat (T_3, T_4), a fehérjét, az LDH-t, vagy az ártalmatlan, nehezen oldható részecskék vagy a tüdőt irritáló aeroszolok esetén a bronchoalveoláris átmosási folyadékban lévő neutrofileket.

Fő vizsgálat

14. A fő szubkrónikus toxicitási vizsgálat általában három koncentrációszintre, valamint szükség szerint azokkal párhuzamosan vizsgált negatív (levegővel kezelt) és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollokra terjed ki (lásd a 18. bekezdést). A megfelelő expozíciós szintek kiválasztásának elősegítéséhez fel kell használni minden rendelkezésre álló adatot, beleértve a szisztémás toxicitási vizsgálatok eredményeit, az anyagcserére vonatkozó és kinetikai adatokat (különös hangsúlyt kell fektetni a kinetikai folyamatokat telítő magas koncentrációszintek elkerülésére). Mindegyik vizsgált csoport 10 hím és 10 nőstény rágcsálóból áll, amelyeket hetente 5 napon napi 6 órára teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak 13 héten keresztül (a vizsgálat teljes időtartama 90 nap). Az állatok heti 7 napon is kitehetők a vizsgált anyagnak (például belélegezhető gyógyszerek vizsgálata esetén). Amennyiben ismert, hogy valamelyik nem érzékenyebb a vizsgált vegyi anyagra, az egyes nemek különböző koncentrációszinteknek is kitehetők a 15. bekezdésben ismertetett koncentráció-válasz összefüggés optimális feltárása érdekében. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. Napi 6 óránál rövidebb expozíciós idő alkalmazása vagy hosszabb időtartamú (például napi 22 órás), egész testfelületen keresztüli expozíciós vizsgálat szükségessége esetén indokolást kell adni (lásd a 39. iránymutatást) (2). Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt, kivéve, ha az időtartam meghaladja a 6 órát. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

15. A célkoncentrációkat úgy kell megválasztani, hogy azonosítható(k) legyen(ek) a célszerv(ek) és egyértelmű koncentráció-válasz összefüggés legyen kimutatható:

— A felső koncentrációszintnek toxikus hatásokat kell előidéznie anélkül, hogy késleltetett tüneteket vagy elhullást okozna, ami kizárná az érdemi értékelést.

— A köztes koncentrációszint(ek)et úgy kell felosztani, hogy a toxikus hatások fokozatosan növekedjenek az alsó és a felső koncentrációszint között.

— Az alsó koncentrációszint nem, vagy csak kis mértékben idézheti elő toxicitás jeleit.

Időközi elpusztítás

16. Ha időközi elpusztítást tervezünk, az egyes expozíciós szintekhez tartozó állatok számát annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékozunk pusztítani. Az időközi elpusztítást indokolni kell, és a statisztikai elemzések során megfelelően figyelembe kell venni.

▼M4

Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat

17. Kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálat végezhető a toxicitás visszafordíthatóságának, elhúzódó vagy késve fellépő voltának a kezelést követő megfelelő hosszúságú, de legalább 14 napos időszak során történő megfigyelése érdekében. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportok 10 hímből és 10 nőstényből állnak, amelyeket a fő vizsgálatban megfigyelt kísérleti állatokkal egyidejűleg teszünk ki a vizsgált vegyi anyagnak. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálathoz használt csoportokat a legnagyobb koncentrációban kell kitenni a vizsgált vegyi anyagnak, és ezzel párhuzamosan szükség szerint levegővel és/vagy vivőanyaggal kezelt kontrollok vizsgálatát is el kell végezni (lásd a 18. bekezdést).

Kontrollállatok

18. A párhuzamosan vizsgált negatív (levegővel kezelt) kontrollállatokat a vizsgált csoportokban lévő állatokkal azonos módon kell kezelni, azzal a különbséggel, hogy a vizsgált vegyi anyag helyett szűrt levegőnek tesszük ki azokat. Amennyiben vizet vagy más anyagot használunk a vizsgálati légkör létrehozásának elősegítésére, a vizsgálathoz negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport helyett vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Vivőanyagként lehetőség szerint vizet kell használni. Ha a vivőanyag víz, a kontrollállatokat ugyanolyan relatív páratartalmú levegőnek kell kitenni, mint a vizsgált anyagnak kitett csoportokat. Az alkalmas vivőanyag kiválasztásának megfelelően elvégzett előzetes vizsgálaton vagy múltbeli adatokon kell alapulnia. Ha a vivőanyag toxicitásáról nincsenek részletes információk, a vizsgálatvezető dönthet úgy, hogy negatív (levegővel kezelt) és vivőanyaggal kezelt kontrollt egyaránt kell alkalmazni, ez azonban erősen ellenjavallt. Ha a múltbeli adatok alapján a vivőanyag nem toxikus, nincs szükség negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoportra, és ez esetben csak vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportot kell alkalmazni. Amennyiben a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag az előzetes vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, és ezt a vivőanyagkontrollt kell használni.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

19. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációktól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a részecskeméret csökkentése érdekében. További útmutatás a 39. iránymutatásban (2) olvasható.

Részecskeméret-eloszlás

20. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 3 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (4). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék és a rostok meghaladhatják azt.

▼M4

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

21. A vizsgált vegyi anyag ideális esetben vivőanyag nélkül vizsgálandó. Ha a vizsgált vegyi anyag megfelelő koncentrációjának és részecskeméretének előállításához vivőanyag alkalmazása szükséges, a víz részesítendő előnyben. Ha a vizsgált vegyi anyagot vivőanyagban oldjuk fel, minden esetben igazolni kell annak stabilitását.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

22. Az expozíciós kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy időbeli stabilitás) valós idejű nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt valamennyi lényeges dinamikus inhalációs paraméter szabályozására. A koncentráció valós idejű nyomon követése esetén a légáramlásokat elegendő expozíciónként és naponként egy alkalommal mérni. Különös figyelmet kell fordítani a csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére. Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben feltételezhető, hogy ez a szabvány nem teljesíthető, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell. Ha az expozíció első napján végzett mérések azt mutatják, hogy e gázok szintje megfelelő, rendszerint nincs szükség további mérésekre.

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

23. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt folyamatosan nyomon kell követni, és lehetőség szerint minden expozíció során óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat lehetőleg 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

24. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk az inhalációs kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

25. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában végzett mintavétellel megállapított koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció vagy specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű, por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt

▼M4

végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű, por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát.

26. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni a vizsgálat teljes időtartama alatt, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel, illetve más becslésekkel meghatározott molekulatömeg. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) megerősíteni a megbízó által adott jellemzést.

27. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani. Az expozíciós körülmények stabilitásának bizonyítására valós idejű nyomonkövetési eszköz – például aeroszolok esetén aeroszolfotométer, vagy gőzök esetén az összes szénhidrogéntartalmat elemző műszer – alkalmazható. A kamrabeli tényleges koncentrációt minden expozíciós napon minden expozíciós szint tekintetében legalább háromszor meg kell mérni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, expozíciós időszakonként egy mintavétel is elfogadható. Ideális esetben ezt a mintavételt a teljes expozíciós időszak folyamán kell elvégezni. Az egyes kamrakoncentráció-minták gázok és gőzök esetén legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy szilárd aeroszolok esetén pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el a kamrabeli átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és jegyzőkönyvezni kell. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét. Ehhez figyelembe kell venni a kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez és a bomláshoz szükséges időt (t_{95}). A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

28. A nagyon összetett, gázokból/gőzökből és aeroszolokból álló keverékek (például égési légkörök, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában. Éppen ezért mindegyik fázishoz (gáz/gőz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a teljes keverék, nem pedig csak az aktív összetevő vagy az indikátoranyag (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (2).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

29. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik koncentrációszint tekintetében legalább hetente meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó (APS) segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható.

▼M4

30. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázbuborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának megerősítése érdekében. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (2)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában vizsgált összes koncentrációnál bizonyítható az egyezés, a további megerősítő mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni a vizsgálat eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében.

31. Gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában.

MEGFIGYELÉSEK

32. Az állatokat az expozíciós időtartam előtt, alatt és után klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az állatok expozíció során megfigyelt reakciójától függően gyakoribb megfigyelések is kilátásba helyezhetők. Ha az állatok megfigyelését az azok lefogására szolgáló csövek használata, az egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra rossz megvilágítása vagy az átlátszatlan légkör akadályozza, az állatokat az expozíció után alapos megfigyelésnek kell alávetni. A következő napi expozíció előtt végzett megfigyelésekkel felmérhető a toxikus hatások visszafordíthatósága vagy súlyosbodása.

33. Minden megfigyelést rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

34. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, a légző-, keringési és idegrendszer, valamint a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára. A vizsgálati protokollba további értékelések is felvehetők, ilyenek például a kinetikai vizsgálatok, a biomonitoring, a tüdőműködés vizsgálata, a tüdőszövetben felgyülemlő, rosszul oldható anyagok visszamaradásának vizsgálata, valamint a viselkedésbeli változások megfigyelése.

TESTSÚLY

35. Az egyes állatok súlyát röviddel az első expozíció (0. nap) előtt, azt követően pedig hetente kétszer (például az expozíció nélküli hétvégén végbement felépülés bizonyítása céljából pénteken és hétfőn, vagy a szisztémás toxicitás felmérését lehetővé tevő időközönként), valamint az elhullás vagy elpusztítás időpontjában kell feljegyezni. Amennyiben az első 4 héten semmilyen hatás nem figyelhető meg, a vizsgálat hátralevő részében a testsúly heti rendszerességgel is mérhető. A kísérő (visszafordíthatósági) vizsgálatban alkalmazott állatok (ha vannak) súlyának heti rendszerességgel végzett mérését a felépülési időszak során is folytatni kell. A vizsgálat lezárásakor minden állat súlyát meg kell mérni röviddel az elpusztítás előtt, hogy torzításmentesen kiszámítható legyen a szervek súlyának testsúlyhoz viszonyított aránya.

TÁPLÁLÉK- ÉS VÍZFOGYASZTÁS

36. A felvett táplálék mennyiségét heti rendszerességgel le kell mérni. A felvett víz mennyisége szintén mérhető.

▼M4

KLINIKAI PATOLÓGIA

37. Minden állaton – beleértve a kontrollokat és a kísérő (visszafordíthatósági) csoportokba tartozókat – klinikai patológiai értékelést kell végezni az elpusztításkor. Az expozíció vége és a vérvétel között eltelt időt fel kell jegyezni, különösen ha az adott végpontra gyors regeneráció jellemző. A rövid plazmabeli felezési idejű paramétereknél (például COHb, CHE és MetHb) az expozíció végét követően végzendő mintavétel.

38. A minden toxikológiai vizsgálathoz általánosan előírt klinikai patológiai paraméterek felsorolása az 1. táblázatban található. Rendszeres vizeletelemzés nem kötelező, de elvégezhető, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás alapján célszerűnek ítéljük. A vizsgálatvezető a vizsgált vegyi anyag toxicitásának alaposabb jellemzése érdekében további paraméterek értékelése mellett dönthet (például kolineszteráz, lipidek, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin vagy Heinz-testek, kreatin-kináz, csontvelő/eritroid arány, troponinok, artériás vérgáz, laktát-dehidrogenáz, szorbit-dehidrogenáz, glutamát-dehidrogenáz és gamma-glutamil-transzpeptidáz).

1. táblázat

Szabványos klinikai patológiai paraméterek

Hematológiai paraméterek	
vörösvértestszám	teljes vérkép
hematokrit	differenciált vérkép
hemoglobinkoncentráció	trombocitaszám
átlagos korpuszkuláris hemoglobin	véralvadási képesség (a következők egyikét kell választani):
átlagos korpuszkuláris térfogat	— prothrombin idő
átlagos korpuszkuláris hemoglobin-koncentráció	— véralvadási idő
retikulociták	— részleges prothrombin idő

Klinikai kémiai paraméterek	
glükóz (*)	alanin-aminotranszferáz
összes koleszterin	aszpartát-aminotranszferáz
trigliceridek	alkáli foszfatáz
a vérben lévő karbamid-nitrogén	kálium
összes bilirubin	nátrium
kreatinin	kalcium
összes fehérje	foszfor
albumin	klorid
globulin	

Vizeletelemzés (nem kötelező)	
megjelenés (szín és zavarosság)	összes fehérje
térfogat	glükóz
fajsúly vagy ozmolaitás	vér/vérsejtek
pH	

(*) Mivel a hosszas koplaltatás torzíthatja a kezelt állatok glükózszintjének a kontrollállatokéhoz viszonyítva mért értékét, a vizsgálatvezetőnek döntenie kell, hogy célszerű-e az állatokat koplaltatni. Koplaltatási idő alkalmazása esetén annak a vizsgált fajhoz kell igazodnia, patkány esetén például 16 óra lehet (éjszakai koplaltatás). A koplaltatás mellett mérhető glükózszint meghatározása az utolsó expozíciós héten történő éjszakai koplaltatás után, vagy a boncolás előtti éjszakai koplaltatás után végezhető el (utóbbi esetben az összes többi klinikai patológiai paraméterrel együtt kell meghatározni).

▼M4

39. Amennyiben arra utaló bizonyítékot találunk, hogy az alsó légutak (azaz az alveolusok) jelentik a lerakódás és a visszamaradás elsődleges helyét, a bronchoalveoláris átmosás (BAL) lehet a legalkalmasabb technika a hipotézisen alapuló dózis-hatás paraméterek alveolitiszre, tüdőgyulladásra és foszfolipidózisra összpontosító mennyiségi elemzéséhez. Ez lehetővé teszi az alveolusok károsodása dózis-válasz és idő-lefolyás típusú változásainak megfelelő vizsgálatát. A BAL eljárás útján nyert folyadék elemezhető teljes és differenciált vérkép, összes fehérje, valamint laktát-dehidrogenáz tekintetében. Figyelembe vehetők továbbá egyéb, lizoszómakárosodásra, foszfolipidózisra, fibrózisra, valamint irritáció okozta vagy allergiás gyulladásra utaló paraméterek is, ami magában foglalhatja a gyulladást serkentő citokinek/kemokinek meghatározását. A BAL-mérések általában kiegészítik a kórszövettani vizsgálatok eredményeit, azonban nem helyettesíthetik azokat. A tüdőátmosás elvégzéséhez a 39. iránymutatásban (2) található útmutatás.

SZEMÉSZETI VIZSGÁLAT

40. A vizsgált vegyi anyag beadása előtt az összes állaton, továbbá az összes, magas koncentrációnak kitett és kontrollcsoport esetén a vizsgálat lezárásakor oftalmoszkóppal vagy azzal egyenértékű eszközzel el kell végezni a szemfenék, a fénytörő közegek, a szivárványhártya és a kötőhártya szemészeti vizsgálatát. Amennyiben a szem elváltozásait észleljük, a többi csoportba tartozó összes állatot is meg kell vizsgálni, beleértve a kísérő (visszafordíthatósági) csoportba tartozókat.

MAKROSZKOPIKUS PATOLÓGIA ÉS A SZERVEK SÚLYA

41. Minden kísérleti állaton teljes kivéreztetést és (ha lehetséges) makroszkopikus boncolást kell végezni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett távolítani a vizsgálatból. Minden egyes állatnál fel kell jegyezni az utolsó expozíció és az elpusztítás között eltelt időt. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevettük, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

42. A makroszkopikus boncolás során kórszövettani vizsgálat céljából megfelelő közegben megőrizendő szervek és szövetek felsorolása a 2. táblázatban található. A **[**szögletes zárójelben**]** feltüntetett szervek és szövetek, valamint bármely egyéb szerv és szövet megőrzéséről a vizsgálatvezető saját mérlegelése alapján dönthet. A **félkövérrel** szedett szerveket a kiszáradás elkerülése érdekében a boncolás után a lehető legrövidebb időn belül meg kell tisztítani, és azok nedves súlyát meg kell mérni. A pajzsmirigy és a mellékherék súlyát csak akkor javasolt megmérni, ha szükséges, mivel az azok megtisztítása során keletkező mesterséges elváltozások akadályozhatják a kórszövettani értékelést. A szöveteket és a szerveket közvetlenül a boncolás után, és az alkalmazandó fixálószertől függően legalább 24–48 órával a megtisztítás előtt 10 %-os pufferelt formalinban vagy egyéb, megfelelő fixálószerben fixálni kell.

▼M4

2. táblázat

A makroszkopikus boncolás során megőrizendő szervek és szövetek

Mellékvesék	Nyelőcső
Aorta	[Szaglógumó]
Csontvelő (és/vagy friss felszívott minta)	**Petefészkek**
Agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	Hasnyálmirigy
Vakbél	Mellékpajzsmirigyek
Vastagbél	Perifériás ideg (csípő vagy sípcsont környéki, lehetőleg az izomzathoz közeli helyről véve)
Patkóbél	Agyalapi mirigy
[**Mellékherék**]	Prosztata
[Szemek (retina, látóideg) és szemhéjak]	Végbél
Combcsont és térdízület	Nyálmirigyek
Epehólyag (ha van)	Ondóhólyagok
[Harder-mirigyek]	Bőr
Szív	Gerincoszlop (nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)
Csípőbél	**Lép**
Éhbél	Szegycsont
Vesék	Gyomor
[Könnymirigyek (szemüregen kívüli)]	Fogazat
Gégefő (3 szinten, beleértve a gégefedő alapját)	**Herék**
Máj	**Csecsemőmirigy**
Tüdő (egy szinten készített metszet mindegyik lebenyről, beleértve a fő hörgőket)	**Pajzsmirigyek**
Nyirokcsomók a tüdő hilusok körüli részéről, különösen nehezen oldható, szemcsés vizsgált vegyi anyagok esetén. Alaposabb vizsgálatok és/vagy immunológiára összpontosító tanulmányok esetében további nyirokcsomók megőrzése is megfontolható, például a gátori, nyaki/állkapocs alatti és/vagy fülcse körüli részekről.	[Nyelv]
	Légcső (legalább 2 szinten, beleértve egy hosszirányú metszetet a carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet)
	[Húgyvezeték]
Nyirokcsomók (a bejutás helyétől távoli helyről)	[Húgycső]
Emlőmirigy (nőstény)	Húgyhólyag
Izomszövet (comb)	**Méh**
Orr-garati szövetek (legalább 4 szinten, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát és az orrhoz társuló nyirokszövetet [NALT])	Célszervek
	Minden makroszkopikus elváltozás és szövetszaporulat

▼M4

43. A tüdőt sértetlenül kell eltávolítani, le kell mérni, és a tüdő szerkezetének megőrzése érdekében megfelelő fixálószert kell belecsepegtetni 20–30 cm víznek megfelelő nyomáson (5). Mindegyik lebenyről metszetet kell készíteni egy szinten, beleértve a fő hörgőket, ugyanakkor tüdőátmosás alkalmazása esetén az át nem mosott lebenyről három szinten kell metszetet készíteni (nem sorozatos metszeteket).

44. Az orr-garati szöveteket legalább 4 szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell az orr-garati csatornát (5) (6) (7) (8) (9), lehetővé téve a laphámsejtes, átmeneti (csillószőrrel nem borított légúti), légúti (csillószőrrel borított) és szaglóhámszövet, valamint az elvezető nyirokszövet (NALT) (10) (11) megfelelő vizsgálatát. A gégefőt három szinten kell vizsgálni, amelyek egyikének tartalmaznia kell a gégefedő alapját (12). A légcsövet legalább két szinten kell vizsgálni, beleértve egy hosszirányú metszetet az extrapulmonális hörgők elágazásánál lévő carinán keresztül, valamint egy keresztmetszetet.

KÓRSZÖVETTANI VIZSGÁLATOK

45. A 2. táblázatban felsorolt összes szerv és szövet kórszövettani vizsgálatát el kell végezni a kontrollcsoportoknál és a magas koncentrációnak kitett csoportoknál, valamint a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított összes állatnál. Különös figyelmet kell fordítani a légzőrendszerre, a célszervekre, valamint a makroszkopikus elváltozásokra. Azon szerveket és szöveteket, amelyeken a magas koncentrációnak kitett csoportnál elváltozások figyelhetők meg, mindegyik csoportnál meg kell vizsgálni. A vizsgálatvezető a koncentráció-válasz összefüggés egyértelmű kimutatása érdekében dönthet úgy, hogy további csoportoknál is végezni kell kórszövettani értékelést. Kísérő (visszafordíthatóság vizsgálatára szolgáló) csoport alkalmazása esetén minden olyan szerv és szövet kórszövettani értékelését el kell végezni, amelynél a kezelt csoportok egyedei esetében elváltozások figyelhetők meg. Ha a magas koncentrációnak kitett csoportnál túlzott mértékű idő előtti elhullás vagy egyéb problémák veszélyeztetik az adatok szignifikanciáját, az eggyel alacsonyabb koncentrációra vonatkozóan kell kórszövettani vizsgálatot végezni. Meg kell kísérelni a makroszkopikus és mikroszkopikus megfigyelések közötti összefüggések feltárását.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

46. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyára, táplálékfelvételére, klinikai patológiai eredményeire, makroszkopikus boncolási eredményeire, szerveinek súlyára, valamint kórszövettani eredményeire vonatkozó adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit. Mind a számszerű, mind a járulékos eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni. Bármilyen általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazható, és a statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell kiválasztani.

Vizsgálati jegyzőkönyv

47. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— A ketrecben való tartás körülményei, beleértve a következőket: az állatok ketrecenkénti száma (vagy számának változása), az alom anyaga, környezeti hőmérséklet és relatív páratartalom, a megvilágítás időtartama, valamint a takarmány meghatározása.

▼M4

— A vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása. Forrás- és múltbéli adatok is megadhatók, amennyiben azok hasonló expozíciós, tartási és koplaltatási körülmények között kitett állatokra vonatkoznak.

— Az állatok száma, kora és neme.

— A véletlen kiválasztás módszere.

— A vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányt, a karantént és a betegség kezelését.

Vizsgált vegyi anyag

— Fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt).

— Azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

Vivőanyag

— A vivőanyag használatának, valamint kiválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz).

— Múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét.

Inhalációs kamra

— Az inhalációs kamra részletes leírása, beleértve annak térfogatát és vázlatrajzát.

— Az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása.

— A hőmérséklet, páratartalom, részecskeméret és tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések.

— A levegő forrása és a kondicionáló rendszer.

— Az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek.

— Nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív).

— Expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a kamrában (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— A vizsgálati légkör stabilitása.

— A hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában.

— A bevitt/elszívott levegő kezelése.

— Légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció).

— Az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t95).

— A térfogatváltozások óránkénti száma.

— Mérőberendezések (ha vannak).

Expozíciós adatok

— A fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása.

▼M4

— Névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával).

— A vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő keverékek esetén mindegyik külön elemezhető.

— Minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (mg/l, mg/m^3 stb.), nem pedig térfogategységekben (ppm, ppb stb.) kell megadni.

— Részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σ_g), beleértve azok kiszámításának módját. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket.

Vizsgálati körülmények

— A vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak elkészítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit.

— A vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való kitételére alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal).

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás (azaz a kalibrációs görbe kialakulásának) megfigyelésére használt berendezések részletei.

— A kamrabeli koncentráció és részecskeméret-eloszlás meghatározásához alkalmazott minták gyűjtésére használt berendezések részletei.

— Az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát).

— Az állatok vizsgálati és kontrollcsoportokba való besorolásához alkalmazott véletlen kiválasztási módszer.

— A táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete).

— A vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása.

Eredmények

— A kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás táblázatos összefoglalása.

— A kamrabeli névleges és tényleges koncentráció adatainak táblázatos összefoglalása.

— Részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait.

— A válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és köztük az elhullt állatok, a hatások jellege, súlyossága, megjelenésének időpontja és időtartama).

▼M4

— Az egyes állatok súlyának táblázatos összefoglalása.

— A táplálékfelvétel táblázatos összefoglalása.

— A klinikai patológiai adatok táblázatos összefoglalása.

— A boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— Különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszer feltételeinek – például a határkoncentrációnak vagy a részecskeméretnek – való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására.

— Ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltétel nem teljesült.

— A vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek konzisztenciáját, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést.

— Ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi).

— Magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (3) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat.

— Meg kell jelölni a célszerve(ke)t.

— Meg kell határozni a NOAEL és a LOAEL értékét.

SZAKIRODALOM

(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.E 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, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appéldául 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. In: Waalkes MP and 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) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

B.30. KRÓNIKUS TOXICITÁSI VIZSGÁLATOK

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 452. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Az eredeti 452. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen felülvizsgált B.30. vizsgálati módszer kidolgozását az állatjóllét és a szabályozási követelmények terén az elmúlt időszakban bekövetkezett változások figyelembevétele érdekében tartották szükségesnek (1) (2) (3) (4). E B.30. vizsgálati módszer frissítése e melléklet B.32., A rákkeltő hatás vizsgálata című és B.33., A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata című fejezetének felülvizsgálatával párhuzamosan történt meg a vizsgálatban alkalmazott állatokra vonatkozó további információk megszerzése, valamint a dózis kiválasztásával kapcsolatos további részletek biztosítása céljából. A jelen vizsgálati módszer vegyi anyagok széles skálájának vizsgálatára szolgál, beleértve a növényvédő szereket és az ipari vegyszereket.

2. A krónikus toxicitási vizsgálatok többségét rágcsálófajokon végzik, ezért a jelen vizsgálati módszer elsősorban az e fajokon végzett vizsgálatokra alkalmazandó. Amennyiben az ilyen vizsgálatokat rágcsálóktól eltérő fajokon kell elvégezni, a megfelelő módosításokkal a jelen vizsgálati módszerben vázolt elvek és eljárások is alkalmazhatók, az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (5) vázoltakkal együtt, a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban leírtak szerint (6).

3. A krónikus toxicitási vizsgálatok során alkalmazott három fő beadási mód az orális, a dermális és az inhalációs. A beadási mód kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció jellemző módjától. Az expozíciós mód kiválasztására vonatkozó további információk a 116. OECD-iránymutatásban találhatók (6).

4. A jelen vizsgálati módszer az orális expozíciós módra összpontosít, amely a krónikus toxicitási vizsgálatok során a leggyakrabban alkalmazott mód. Az emberi egészségre jelentett kockázat értékeléséhez és/vagy bizonyos szabályozási rendszerek előírásai alapján dermális vagy inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszú távú krónikus toxicitási vizsgálatok elvégzésére is szükség lehet ugyan, azonban technikai szempontból e két expozíciós mód mindegyike igen összetett. Az ilyen vizsgálatokat eseti alapon kell megtervezni, bár az itt ismertetett, a krónikus toxicitás orális beadás útján történő meghatározására és értékelésére szolgáló vizsgálati módszer a kezelési időszakokra, klinikai és patológiai paraméterekre stb. vonatkozó ajánlások tekintetében alapul szolgálhat az inhalációs és/vagy dermális vizsgálatokra vonatkozó protokollhoz. A vizsgált vegyi anyagok inhalációs (6) (7) és dermális (6) módon történő beadásával kapcsolatban OECD-iránymutatások állnak rendelkezésre. E melléklet B.8. (8) és B.29. fejezetét (9), valamint az akut inhalációs vizsgálatra vonatkozó OECD-iránymutatást (7) kifejezetten alkalmazni kell az inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszabb távú vizsgálatok tervezése során. A dermális beadással végzett vizsgálatok esetében e melléklet B.9. fejezetét (10) kell alkalmazni.

▼M4

5. A krónikus toxicitási vizsgálat információt szolgáltat az ismételt, a vizsgált faj élettartamának jelentős részére kiterjedő expozícióból valószínűsíthetően fakadó egészségügyi kockázatokról. A vizsgálat információkkal szolgál a vizsgált vegyi anyag toxikus hatásairól, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét. Becslést adhat továbbá az észlelhető káros hatással nem járó szintre is, amely felhasználható az emberi expozícióra vonatkozó biztonsági kritériumok meghatározásához. Hangsúlyos szerepet kap az állatok lehető legtöbb információ megszerzése érdekében történő körültekintő klinikai vizsgálatának szükségessége is.

6. A jelen vizsgálati módszerben ismertetett vizsgálatok célkitűzései többek között a következők:

— a vizsgált vegyi anyag krónikus toxicitásának meghatározása,

— a célszervek meghatározása,

— a dózis-válasz összefüggés jellemzőinek meghatározása,

— a nem észlelhető káros hatás szintjének (NOAEL) vagy a benchmark-dózis (BMD) meghatározásához szükséges kiindulópontnak a meghatározása,

— a krónikus toxicitás hatásainak előrejelzése az emberi expozíciós szintek vonatkozásában,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó hipotézisek vizsgálatához szükséges adatok biztosítása (6).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. A vizsgált vegyi anyag toxikológiai jellemzőinek vizsgálata és értékelése során a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat megkezdését megelőzően annak érdekében, hogy a vizsgálati terv a vizsgált vegyi anyag lehetséges krónikus toxicitásának hatékonyabb vizsgálatára összpontosítson, valamint hogy az állatkísérleteket minimálisra csökkentsük. A vizsgálat megtervezését segítő információk többek között a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ, bármely *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és az emberi expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagok rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatai, a rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok (egyszeri dózisra és adott esetben ismételt dózisra vonatkozó kinetikai adatok), valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok. A krónikus toxicitás meghatározása csak a toxicitásra vonatkozó, 28 napos vagy 90 napos ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból származó kezdeti információk megszerzését követően végzendő el. Az adott vizsgált vegyi anyag lehetséges egészségkárosító hatásai átfogó vizsgálatának részeként a krónikus toxicitás vizsgálatának fokozatos megközelítését kell megfontolni (11) (12) (13) (14).

8. Az eredmények elemzése szempontjából legmegfelelőbb statisztikai módszereket az adott kísérleti tervre és célkitűzésekre tekintettel a vizsgálat kezdetét megelőzően kell meghatározni. A megfontolandó kérdések közé tartozik, hogy tartalmazzanak-e a statisztikák a túléléssel kapcsolatos kiigazítást, valamint egy vagy több csoport idő előtti megszüntetése esetén végzett elemzést. A megfelelő statisztikai elemzésekre vonatkozó útmutatást, továbbá a nemzetközileg elfogadott statisztikai módszerekre vonatkozó főbb hivatkozásokat a 116. iránymutatás (6), valamint a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elemzésével és értékelésével kapcsolatos 35. iránymutatás (15) tartalmazza.

▼M4

9. A krónikus toxicitási vizsgálatok elvégzése során a klinikai tünetek mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjai felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (16), különösen annak 62. bekezdésében ismertetett vezérelveket és szempontokat minden esetben követni kell. E bekezdés szerint: „*Ha az ismételt adagolást alkalmazó vizsgálatok során egy állat progresszív, az állapot további romlásához vezető klinikai tüneteket mutat, tájékozott döntést kell hozni az állat humánus elpusztítására vonatkozóan. A döntéshozatal során mérlegelni kell az állat vizsgálatának folytatása révén szerezhető információk értékét az állat általános állapotához viszonyítva. Ha úgy döntünk, hogy az állatot továbbra is vizsgálni kell, a megfigyelések gyakoriságát szükség szerint növelni kell. Ha ez nem befolyásolja hátrányosan a vizsgálat céljának elérését, lehetséges az adagolás átmeneti szüneteltetése – ha ez csökkenti a fájdalmat vagy a szorongást – vagy a vizsgálati dózis csökkentése.*”

10. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott dózisok kiválasztásnak elveire vonatkozó részletes útmutatás és ezen elvek leírása a 116. iránymutatásban (6), valamint a Nemzetközi Élettudományi Intézet két kiadványában található (17) (18). A fő dózis-kiválasztási stratégia a vizsgálat elsődleges célkitűzésétől vagy célkitűzéseitől függ (6. bekezdés). A megfelelő dózisszintek kiválasztásakor egyensúlyt kell találni egyfelől a veszélyesség vizsgálata, másfelől az alacsony dózisra adott válaszok jellemzése és azok relevanciája között. Ez különösen lényeges a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata (e melléklet B.33. fejezete) esetében (11. bekezdés).

11. Meg kell fontolni a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának elvégzését (e melléklet B.33. fejezete) a krónikus toxicitási vizsgálat (a jelen B.30. vizsgálati módszer) és a rákkeltő hatás vizsgálatának (e melléklet B.32. fejezete) külön-külön történő elvégzése helyett. A két külön vizsgálat elvégzéséhez viszonyítva az együttes vizsgálat idő- és költséghatékonyabb anélkül, hogy befolyásolná az adatok minőségét a krónikus fázisban vagy a karcinogenitási fázisban. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata során (e melléklet B.33. fejezete) azonban körültekintően figyelembe kell venni a dóziskiválasztás elveit (9. és 20–25. bekezdés), továbbá azt is meg kell jegyezni, hogy bizonyos szabályozási keretrendszerek a vizsgálatok külön-külön történő elvégzését írhatják elő.

12. A jelen vizsgálati módszer összefüggésében használt fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén és a 116. iránymutatásban található (6).

A VIZSGÁLAT ELVE

13. A vizsgált vegyi anyagot naponta adjuk be fokozatos dózisokban a kísérleti állatok több csoportjának, általában 12 hónapig, bár hosszabb és rövidebb időtartam is választható a szabályozási követelményektől függően (lásd a 33. bekezdést). A kiválasztott időtartamnak elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kumulatív toxicitás esetleges hatásainak megjelenését a geriátriai változások zavaró hatásai nélkül. A 12 hónapos expozíciós időtartamtól való eltérést indokolni kell, különösen a rövidebb időtartamok esetében. A vizsgált vegyi anyagot általában orális úton juttatjuk be, azonban az inhalációs vagy dermális bejuttatással történő vizsgálat is megfelelő lehet. A vizsgálati terv egy vagy több időközi elpusztítást is tartalmazhat, például a 3. és a 6. hónapot követően, és állatok további csoportjai vonhatók be ennek kiegyenlítése érdekében (lásd a 19. bekezdést). Az anyag beadásának időszakában az állatokat a toxicitás jeleinek észlelése érdekében gondosan megfigyeljük. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk

▼M4

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

14. A jelen vizsgálati módszer elsősorban a krónikus toxicitás rágcsálókban történő vizsgálatával és értékelésével foglalkozik (lásd a 2. bekezdést), ugyanakkor tudatában kell lenni annak, hogy bizonyos szabályozási rendszerek hasonló vizsgálatok nem rágcsálókon történő elvégzését írhatják elő. A faj kiválasztását indokolni kell. A rágcsálóktól eltérő fajokon végzett krónikus toxicitási vizsgálatok tervezésének és elvégzésének adott esetben a jelen vizsgálati módszerben ismertetett elveken, valamint az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (5) leírtakon kell alapulnia. A faj és törzs kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (6).

15. A jelen vizsgálati módszer szerint előnyben részesítendő rágcsálófaj a patkány, de más rágcsálófaj, például az egér is használható. A patkányok és az egerek a viszonylag rövid élettartamuk, gyógyszerészeti és toxikológiai vizsgálatokban elterjedt használatuk, a tumorindukcióra való fogékonyságuk, valamint a megfelelően jellemzett törzsek rendelkezésre állása miatt preferált kísérleti modellek. E tulajdonságok eredményeképpen nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre fiziológiájukról és patológiájukról. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A krónikus toxicitás vizsgálatát olyan állatokon kell elvégezni, amelyek törzse és eredete megegyezik a rövidebb időtartamú előzetes toxicitási vizsgálat(ok)ban felhasznált állatokéval. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek.

Tartási és etetési körülmények

16. Az állatokat külön, vagy azonos nemű egyedekből álló kis csoportokban kell tartani; a külön történő tartást csak akkor kell fontolóra venni, ha az tudományos szempontból indokolt (19) (20) (21). A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmánynak meg kell felelnie a vizsgált faj összes tápanyagigényének, és a vizsgálat eredményét esetlegesen befolyásoló takarmány-szennyeződések mennyiségének – beleértve többek között a növényvédőszer-maradványokat, a perzisztens szerves szennyező anyagokat, a fitoösztrogéneket, a nehézfémeket és a mikotoxinokat – a lehető legalacsonyabbnak kell lennie. A tápanyagokban és takarmányokban lévő szennyező anyagok szintjére vonatkozó analitikai információkat időszakos jelleggel kell meghatározni, legalább a vizsgálat kezdetekor, valamint amikor változás következik be a felhasznált adagban, és ezeket az információkat a zárójelentésben közölni kell. A vizsgálat során felhasznált ivóvízre vonatkozó analitikai információkat hasonló módon kell megadni. A vizsgált vegyi anyag táplálékkal történő beadása esetén a takarmány megválasztását befolyásolhatja annak szükségessége, hogy az megfelelően keveredjen el a takarmánnyal és kielégítse az állatok táplálkozási igényeit.

Az állatok előkészítése

17. A laboratóriumi körülményekhez legalább 7 napig szoktatott, egészséges állatokat kell használni, amelyek korábban nem voltak kitéve kísérleti eljárásoknak. Rágcsálók esetében az állatoknak történő adagolást az elválasztást és szoktatást követően a lehető leghamarabb, és lehetőleg az állatok 8 hetes kora előtt meg kell kezdeni. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és életkor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya az egyes nemeken belül csak minimálisan térhet el egymástól, a vizsgálatban

▼M4

használt összes állat súlyának átlagos értékétől pedig legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet mindkét nem esetében. Az állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és kezelt csoportokba. A véletlenszerű kiválasztást követően nem lehet lényeges különbség az egyes nemeken belül a csoportok átlagos testsúlya között. Ha statisztikailag szignifikáns különbségek fordulnak elő, a véletlenszerű kiválasztás lépését lehetőség szerint meg kell ismételni. Minden egyes állatnak egyedi azonosító számot kell kapnia, és minden egyes állatot maradandóan meg kell jelölni ezzel a számmal tetoválás, mikrochip-beültetés vagy más megfelelő módszer segítségével.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

18. A vizsgálathoz mindkét nemet fel kell használni. Megfelelő számú állatot kell használni, hogy a vizsgálat végén mindegyik csoportban elegendő állat álljon rendelkezésre az alapos biológiai és statisztikai értékeléshez. Rágcsálók esetén az egyes dózisszintekhez általában nemenként és csoportonként legalább 20 állat, nem rágcsálók esetén pedig nemenként és csoportonként legalább 4 állat javasolt. Az egerekkel végzett vizsgálatok esetében további állatok bevonása lehet szükséges minden egyes dóziscsoportban az összes előírt hematológiai meghatározás elvégzése céljából.

Időközi elpusztításra, kísérő csoportokra és jelzőállatokra vonatkozó rendelkezések

19. Amennyiben ez tudományos szempontból indokolt, a vizsgálat a toxikológiai változások alakulására vonatkozó és mechanisztikai információk megszerzése céljából előírhatja az időközi elpusztítást (legalább 10 állat/nem/csoport esetén), például a 6. hónapban. Abban az esetben, ha ilyen információk a vizsgált vegyi anyaggal végzett korábbi, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatokból már rendelkezésre állnak, az időközi elpusztítás tudományos szempontból nem feltétlenül indokolt. Kísérő csoportok is bevonhatók a vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából; ezek vizsgálata általában a vizsgálat legnagyobb dózisával való kezelésre és kontrollvizsgálatra korlátozódik. Szükség szerint egy jelzőállatokból álló további (jellemzően nemenként 5 állatból álló) csoport is bevonható a betegség állapotának a vizsgálat közben történő megfigyelése céljából (22). Ha időközi elpusztítás vagy kísérő, illetve jelzőcsoportok alkalmazását tervezzük, az állatok vizsgálati tervben szereplő létszámát annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékozunk pusztítani. Ezeket az állatokat általában ugyanazoknak a megfigyeléseknek kell alávetni, mint a fő vizsgálat krónikus toxicitási fázisában vizsgált állatokat, beleértve a testsúlyra, táplálék-/vízfogyasztásra, hematológiára és klinikai kémiára vonatkozó méréseket, valamint patológiai vizsgálatokat, de előírható (az időközi elpusztítás céljából bevont csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy az immuntoxicitásra korlátozódjanak.

Dóziscsoportok és adagolás

20. A dózis kiválasztásának és a dózisszintek felosztásának összes szempontjára vonatkozó útmutatás a 116. iránymutatásban (6) található. Legalább három dózisszintet és egy ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni, kivéve, ha határérték-vizsgálatot végzünk (lásd a 27. bekezdést). A dózisszintek megválasztása általában a rövidebb távú ismételt adagolású vagy tartománybehatároló vizsgálatok eredményein alapul, figyelembe véve a vizsgált vegyi anyagra vagy rokon vegyi anyagokra vonatkozóan rendelkezésre álló bármilyen toxikológiai és toxikokinetikai adatot.

▼M4

21. Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek korlátot, a legmagasabb dózisszintet általában olyan módon kell kiválasztani, hogy az alkalmas legyen az elsődleges célszervek és toxikus hatások meghatározására, ugyanakkor elkerülhető legyen a szenvedés, a súlyos toxicitás, a morbiditás vagy az elhullás. A 22. bekezdésben bemutatott tényezők figyelembevétele mellett a legmagasabb dózisszintet úgy kell megválasztani, hogy toxicitást váltson ki, amely például a testsúly növekedésének (körülbelül 10 %-os) visszaesésével bizonyítható.

22. A vizsgálat célkitűzéseitől függően azonban (lásd a 6. bekezdést) a toxicitást bizonyíthatóan kiváltó dózisnál alacsonyabb maximális dózis is választható, például ha egy dózis káros hatást idéz elő, amely azonban csak kismértékben befolyásolja az élettartamot vagy a testsúlyt. A maximális dózis nem haladhatja meg az 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap értéket (határdózis, lásd a 27. bekezdést).

23. A dózisszintek és azok felosztása megválasztható úgy, hogy meghatározható legyen a dózis-válasz összefüggés és a NOAEL, vagy a vizsgálat egyéb tervezett kimenetele, például a legalacsonyabb dózisszinten megfigyelhető BMD (lásd a 25. bekezdést). Az alacsonyabb dózis kiválasztása során figyelembe veendő tényezők többek között a dózis-válasz görbe várható meredeksége, azok a dózisok, amelyeknél fontos változások következhetnek be a metabolizmusban vagy a toxikus hatás mechanizmusában, amelyeknél küszöbérték várható, vagy amelyeknél az alacsony dózis extrapolálásához használható kiindulási pont várható.

24. A dózisszintek felosztásának kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől, és nem írható elő a jelen vizsgálati módszerben, ugyanakkor csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, az adagolások közötti nagyon nagy intervallumok (például körülbelül 6–10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása. A 10-nél magasabb szorzófaktorokat általában kerülni kell, és használatukat meg kell indokolni.

25. A 116. iránymutatásban (6) részletesebben leírtak szerint a dózis kiválasztásakor figyelembe veendő szempontok többek között a következők:

— ismert vagy feltételezett nemlinearitások vagy elhajlási pontok a dózis-válasz görbén,

— toxikokinetika, valamint azok a dózistartományok, amelyek esetében a metabolikus indukció, a telítettség vagy a külső és belső dózisok közötti nemlinearitás előfordul, vagy nem fordul elő,

— prekurzor elváltozások, hatásmarkerek vagy a főbb mögöttes biológiai folyamatok működésének mutatói,

— A hatásmechanizmus főbb (vagy feltételezett) aspektusai, például azok a dózisok, amelyeknél megjelenik a citotoxicitás, felborulnak a hormonszintek és a homeoszatikus mechanizmusok stb.,

— A dózis-válasz görbe azon területei, ahol különösen pontos becslés szükséges, például a várt BMD vagy egy feltételezett küszöbérték tartományában,

— a várható humán expozíciós szintek figyelembevétele.

▼M4

26. Kontrollcsoportként egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használunk, egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport alkalmazandó. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a vivőanyagot a dóziscsoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiségben kell beadni. Ha a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal adjuk be, és emiatt a táplálékfogyasztás a táplálék lecsökkent ízletessége miatt jelentősen csökken, hasznos lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazása a megfelelőbb kontroll biztosítása érdekében.

27. Ha előzetes vizsgálatokból származó információk alapján előre jelezhető, hogy az egyetlen, legalább 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap dózisnak megfelelő dózisszinttel, az e vizsgálathoz leírt eljárásokat követve végzett vizsgálat valószínűleg nem okoz kedvezőtlen hatásokat, valamint a szerkezetileg rokon vegyi anyagokra vonatkozó adatok alapján nem várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó vizsgálat elvégzése nem feltétlenül szükséges. 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap határadag alkalmazható, kivéve, ha a humán expozíció magasabb dózisszint használatát indokolja.

A dózisok előkészítése és a vizsgált vegyi anyag beadása

28. A vizsgált vegyi anyagot általában orálisan, a takarmánnyal vagy az ivóvízzel, vagy gyomorszonda segítségével adjuk be. A bejuttatás útvonalára és módjára vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (6). A bejuttatás útvonala és módja függ a vizsgálat céljától, a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságaitól, biológiai hozzáférhetőségétől, valamint az emberi expozíció meghatározó útvonalától és módjától. A bejuttatás útvonalának és módjának kiválasztását indokolni kell. Állatjóléti okokból gyomorszonda rendszerint csak olyan hatóanyagoknál alkalmazandó, amelyek esetében a bejuttatásnak ez az útvonala és módja ésszerűen tükrözi a lehetséges humán expozíciót (például gyógyszerek esetében). A táplálékban vagy környezetben előforduló vegyi anyagok, többek között a növényvédő szerek esetében a beadás jellemzően a táplálékon vagy az ivóvízen keresztül történik. Néhány forgatókönyv, például a munkahelyi expozíció esetében ugyanakkor a beadás egyéb útvonalai megfelelőbbnek bizonyulhatnak.

29. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Adott esetben figyelembe kell venni a vivőanyag és más adalékanyagok következő tulajdonságait: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszamaradására gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A vizsgált vegyi anyag beadási körülmények közötti (például takarmánnyal történő beadás során fennálló) stabilitására és (adott esetben) a beadáshoz használt oldatok vagy takarmányok homogenitására vonatkozó információknak rendelkezésre kell állniuk.

30. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. A takarmánnyal történő beadást alkalmazó hosszú távú toxicitási vizsgálatok esetében a takarmányban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kiegyensúlyozatlan táplálkozás elkerülése érdekében általában nem haladhatja meg a teljes takarmány 5 %-át. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmányba keverve adjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (mg/takarmánykilogramm vagy ppm), vagy az állatok testsúlyára heti rendszerességgel kiszámított állandó dózisszint (mg/testsúlykilogramm) alkalmazható. A kiválasztott alternatívát meg kell nevezni.

▼M4

31. Orális úton történő beadás esetén a vizsgált vegyi anyagot naponta kell az állatoknak beadni (heti hét napon keresztül) általában 12 hónapon át (lásd még a 33. bekezdést), bár a szabályozási követelményektől függően hosszabb időtartam is szükséges lehet. Bármely más adagolási rendszer – például heti öt napon történő beadás – használatát indokolni kell. Dermális úton történő beadás esetén az állatokat az e melléklet B.9. fejezetében (10) meghatározottak szerint általában legalább napi 6 órán keresztül, heti 7 napon kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni 12 hónapon át. Az inhaláció útján történő expozíciót napi 6 órán keresztül, heti 7 nap kell elvégezni, de indokolt esetben heti 5 napos expozíció is alkalmazható. Az expozíció időtartama általában 12 hónap. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A napi 6 óránál rövidebb expozíciós időtartam alkalmazását indokolni kell. Lásd még e melléklet B.8. fejezetét (8).

32. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, a dózist mindig a nap hasonló időszakában, gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át kell beadni az állatoknak. Általában egyetlen dózist kell beadni naponta egyszer; abban az esetben, ha a vegyi anyag például helyi irritációt okoz, a napi dózisarány fenntartható lehet elosztott (napi kétszeri) beadással. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A mennyiséget a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, és rágcsálók esetében általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm térfogatot (22). A koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni. A fentiek alól kivételt jelentenek az esetlegesen maró vagy irritatív hatást kiváltó anyagok, amelyeket hígítani kell a súlyos helyi hatások elkerülése érdekében. Kerülni kell az emésztőrendszerben valószínűsíthetően maró vagy irritatív hatást kiváltó koncentrációkkal történő vizsgálatokat.

A vizsgálat időtartama

33. A jelen vizsgálati módszert ugyan elsődlegesen 12 hónapos krónikus toxicitási vizsgálatként dolgozták ki, a vizsgálati terv azonban az adott szabályozási rendszer követelményeitől vagy bizonyos mechanisztikai céloktól függően lehetővé teszi a rövidebb (például 6 vagy 9 hónapos) vagy hosszabb (például 18 vagy 24 hónapos) időtartamú vizsgálatokat, illetve alkalmazható ilyen időtartamú vizsgálatok során is. A 12 hónapos expozíciós időtartamtól való eltérést indokolni kell, különösen a rövidebb időtartamok esetében. A vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából bevont kísérő csoportokat az expozíció megszüntetését követően legalább 4 hétig, de legfeljebb a vizsgálat teljes időtartamának egyharmadáig fenn kell tartani adagolás nélkül. További, többek között a vizsgálat során életben maradt állatok figyelembevételével kapcsolatos útmutatás a 116. iránymutatásban (6) található.

MEGFIGYELÉSEK

34. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Általános klinikai megfigyelést naponta legalább egyszer kell végezni, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban, szondával történő adagolás esetén figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát.

▼M4

35. Az első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), a vizsgálat első hetének végén, azt követően pedig havonta egyszer az összes állatot részletes klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. A megfigyelési protokollt úgy kell kialakítani, hogy az egyes megfigyelők közötti különbségek minimálisak legyenek, és függetlenek legyenek a vizsgált csoportoktól. E megfigyeléseket az állatok tartására egyébként használt ketreceken kívül, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában kell elvégezni. A megfigyeléseket gondosan fel kell jegyezni, lehetőleg a vizsgálatokat végző laboratórium által kifejezetten meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy a megfigyelési körülmények közötti különbségek minimálisak legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, valamint szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (24).

36. A vizsgált vegyi anyag első beadását szemtükörrel vagy más, megfelelő eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet az összes állaton el kell végezni. E vizsgálatot a vizsgálatsorozat végén meg kell ismételni, lehetőleg az összes állaton, de legalább a magas dózissal kezelt és kontrollcsoportok tagjain. Ha a szemben a kezeléssel összefüggő elváltozást tapasztalunk, az összes állatot meg kell vizsgálni. Ha szerkezeti elemzés vagy egyéb információ szemtoxicitásra utal, a szemvizsgálatot gyakrabban kell elvégezni.

37. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges neurotoxikus hatásokat jeleztek, a vizsgálat megkezdését megelőzően, valamint a vizsgálat kezdetét követő 12. hónap végéig 3 hónapos időközönként, továbbá a vizsgálat végén (ha az tovább tart 12 hónapnál) elvégezhető a különböző típusú ingerekre (24) (például hallószervi, vizuális, önérzékelési ingerek) mutatott érzékszervi reakciók vizsgálata (25), (26), (27), a szorítás erejének értékelése (28) és a motoros aktivitás felmérése (29). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók.

38. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges immuntoxikus hatásokat jeleztek, e végpont további vizsgálatát lehet végezni a vizsgálat végén.

Testsúly, táplálék-/vízfogyasztás és táplálékhasznosítási képesség

39. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

▼M4

Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok

40. A rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében csoportonként legalább 10 hím és 10 nőstény állaton hematológiai vizsgálatokat kell végezni a 3., 6. és 12. hónapban, valamint a vizsgálat végén (ha az hosszabb, mint 12 hónap), mindegyikhez ugyanazokat az állatokat használva. Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt hematológiai vizsgálat elvégzése céljából (lásd a 18. bekezdést). A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a hematológiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt.

41. Az alábbi paramétereket kell vizsgálni (30): teljes és differenciált leukocitaszám, eritrocitaszám, trombocitaszám, hemoglobinkoncentráció, hematokrit (vérsejtsüllyedés), átlagos sejttérfogat (MCV), eritrociták átlagos hemoglobintartalma (MCH), eritrociták átlagos hemoglobinkoncentrációja (MCHC), prothrombin idő, valamint aktivált parciális tromboplasztin idő. A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint egyéb hematológiai paramétereket, például Heinz-testeket vagy egyéb atipikus eritrocitamorfológiát vagy methemoglobint is lehet mérni. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ. Ha a vizsgált vegyi anyag a vérképző rendszerre hat, a retikulocitaszám és a csontvelőcitológia is feltüntethető, habár ezek vizsgálatát nem szükséges rutinszerűen elvégezni.

42. A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását legalább 10 hím és 10 nőstény állattól vett vérmintákból kell elvégezni a hematológiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként, minden esetben ugyanazokat az állatokat használva. Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt klinikai biokémiai vizsgálat elvégzése céljából. A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a klinikai biokémiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. A vérvétel előtti éjszaka javasolt az állatokat koplaltatni (kivéve egerek esetében). A következő paramétereket kell vizsgálni (30): glükóz, karbamid (karbamid-nitrogén), kreatinin, teljes fehérje, albumin, kalcium, nátrium, kálium, teljes koleszterin, legalább két értékelhető minta a májsejtek értékeléséhez (alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, glutamát-dehidrogenáz, teljes epesav) (31), valamint legalább két értékelhető minta a máj és az eperendszer értékeléséhez (alkáli foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, 5'-nukleotidáz, teljes bilirubin, teljes epesav) (31). A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint más klinikai kémiai paraméterek, például az éhgyomorra mért trigliceridek, bizonyos hormonok és a kolinészterázszint mérése is elvégezhető. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

▼M4

43. Vizeletelemzést legalább 10 hím és 10 nőstény állaton kell végezni a hematológiai és klinikai kémiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként levett mintákon. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a vizeletelemzés vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni. A klinikai patológiai vizsgálatra vonatkozó szakértői ajánlás a következő vizsgálandó paramétereket tartalmazza (30): küllem, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, összes fehérje, valamint glükóz. Az egyéb mérések közé tartozik a keton, az urobilinogén, a bilirubin és a vizeletben jelen lévő vér vizsgálata. Szükség szerint további paraméterek vizsgálatát is be lehet vezetni a megfigyelt hatás(ok) vizsgálati körének bővítése érdekében.

44. Általánosan elfogadott, hogy kutyákon végzett vizsgálatok esetében a kezelés előtt kiinduló hematológiai és klinikai biokémiai változókra van szükség, rágcsálok vizsgálatánál azonban ez nem szükséges (30). Ha azonban a rendelkezésre álló kiinduló adatok (lásd az 50. bekezdést) nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó ezen adatok meghatározása.

Patológia

Autopszia

45. Általában a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Előírható ugyanakkor (az időközi elpusztítás céljából bevont vagy kísérő csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy immuntoxicitásra korlátozódjanak (lásd a 19. bekezdést). Ezeket az állatokat nem kell alávetni boncolásnak és az azt követő, a következő bekezdésekben ismertetett eljárásoknak. A jelzőállatok esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség.

46. A 45. bekezdés utóbbi részében kivételként megjelölt állatokéin kívül az összes állat szerveinek súlyát meg kell mérni. Az összes állat (eltekintve az elhullásközeli állapotban lévő és/vagy a vizsgálat befejeztét megelőzően elpusztított egyedektől) mellékveséit, agyát, mellékheréit, szívét, veséit, máját, petefészkeit, lépét, heréit, pajzsmirigyét (amelyet fixálás után mérünk meg a mellékpajzsmirigyekkel együtt) és méhét megfelelően meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és azok nedves súlyát a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni, mielőtt azok kiszáradnának. Egereken végzett vizsgálat esetén a mellékvese megmérése nem kötelező.

47. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (32) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigygyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]

▼M4

koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag
patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell tartósítani, továbbá elengedhetetlen a bőrből történő mintavétel a beadás helyéről és e minta tartósítása. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. (8) és B.29. fejezetében (9) tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

Kórszövettani vizsgálatok

48. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (32). Legalább a következő szöveteket kell kórszövettani vizsgálatnak alávetni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket mutató összes szövet,

— a célszöveteket, vagy azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

49. Az összes értékelt paraméterre vonatkozó adatokat minden egyes állat esetében rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy humánus okokból való elpusztítás időpontját, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát. Az összegző adattáblázatoknak tartalmazniuk kell a toxikus hatásokat vagy elváltozásokat mutató állatokra vonatkozó átlagértékeket és szórásokat (folyamatos vizsgálati adatok esetében), valamint az elváltozások osztályozását.

50. A vizsgálat eredményeinek értékelése szempontjából hasznosak lehetnek a korábbi kontrolladatok, például abban az esetben, ha a párhuzamos kontrollokból származó adatok vélhetően lényegesen eltolódottak az ugyanabban a vizsgálati létesítményben/kolóniában lévő kontrollállatoktól származó újabb adatokhoz képest. Korábbi kontrolladatok elemzése esetén ugyanazon laboratórium által benyújtott, ugyanolyan korú és ugyanabba a törzsbe tartozó állatokra vonatkozó, az adott vizsgálatot megelőző öt évből származó adatokat kell felhasználni.

51. A számszerű eredményeket adott esetben megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket és az elemezendő adatokat a vizsgálat tervezése során kell kiválasztani (8. bekezdés). A kiválasztás során szükség szerint elő kell írni a túlélésre vonatkozó kiigazításokat.

Vizsgálati jegyzőkönyv

52. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

— a vegyi anyag származási helye,

— gyártási szám,

— kémiai elemzésről szóló tanúsítvány.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs, és a választás indokolása,

— az állatok száma, életkora és neme a vizsgálat kezdetekor,

▼M4

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor,

Vizsgálati körülmények:

— a beadási mód és a dózis kiválasztásának indokolása,

— az adatok elemzéséhez adott esetben használt statisztikai módszerek,

— a vizsgált vegyi anyag formulázására/a takarmány előkészítésére vonatkozó részletes adatok,

— a készítmény elért koncentrációjára, stabilitására és homogenitására vonatkozó analitikai adatok,

— a beadási mód és a vizsgált vegyi anyag bejuttatására vonatkozó részletes adatok,

— inhalációs vizsgálatok esetében információ arra vonatkozóan, hogy a bejuttatás csak orron vagy a teljes testfelületen keresztül történt-e,

— tényleges dózisok (mg/testsúlykilogramm/nap), valamint a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (mg/kg vagy ppm) a tényleges dózisra való átszámításhoz használt átszámítási tényező, ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok.

Eredmények (az adatok táblázatos összefoglalását és az egyes állatokra vonatkozó adatokat is meg kell adni):

— túlélési adatok,

— testsúly és annak változásai,

— takarmányfogyasztás, a táplálékhasznosítási képességgel kapcsolatos számítások, ha vannak, valamint adott esetben vízfogyasztás,

— toxikus reakcióra vonatkozó adatok nemek és adagolási szintek szerinti csoportosításban, beleértve a toxicitás jeleit,

— a megfigyelt klinikai tünetek jellege, előfordulása (valamint ha pontozzuk, súlyossága) és időtartama (átmeneti vagy állandó),

— szemészeti vizsgálat,

— hematológiai vizsgálatok,

— klinikai biokémiai vizsgálatok,

— vizeletelemzés,

— az esetleges neurotoxicitási vagy immuntoxicitási vizsgálatok eredménye,

— testsúly elpusztuláskor,

— szervek súlya (és ezek aránya, ha alkalmazható),

— boncolási eredmények,

— a kórszövettani vizsgálatok összes, kezeléssel összefüggő eredményének részletes ismertetése,

— abszorpciós adatok, ha rendelkezésre állnak.

▼**M4**

Az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható

Az eredmények tárgyalása, beleértve a következőket:

— dózis-válasz összefüggések,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ figyelembevétele,

— az esetlegesen alkalmazott modellezési megközelítések tárgyalása,

— BMD, NOAEL vagy LOAEL meghatározása,

— korábbi kontrolladatok,

— humán relevancia.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, 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) E melléklet B.27., Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat, 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezete.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) E melléklet B.8., Szubakut inhalációs toxicitás: 28 napos vizsgálat című fejezete.

(9) E melléklet B.29., Szubkrónikus inhalációs toxicitás: 90 napos vizsgálat című fejezete.

(10) E melléklet B.9., Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (dermális) című fejezete.

(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, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(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) Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve (2010. szeptember 22.) a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

(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. Appéldául 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. & Appéldául Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. 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**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼B

B.31. **PRENATÁLIS FEJLŐDÉSI TOXICITÁSVIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD TG 414 (2001) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

E fejlődési toxicitási vizsgálati módszer segítségével általános információk nyerhetők a vemhes kísérleti állatot és a méhben fejlődő élő szervezetet érő prenatális expozíció hatásaival kapcsolatosan, és magában foglalhatja az anyai hatások, továbbá a magzatelhalás, a magzatban fellépő strukturális rendellenességek vagy rendellenes növekedés vizsgálatát. A funkcionális defektusok, bár a fejlődés szempontjából igen fontosak, nem képezik szerves részét ennek a módszernek. Az ilyen hatások külön vizsgálat vagy e módszerhez kapcsolódóan kiegészítő vizsgálat keretében tanulmányozhatók a fejlődési neurotoxicitási vizsgálati módszer alkalmazásával. A funkcionális defektusok és más posztnatális hatások vizsgálatára vonatkozó információkkal kapcsolatban a kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálati módszert, valamint a fejlődési neurotoxicitási vizsgálati módszert kell segítségül hívni adott esetben.

E vizsgálati módszert esetenként a vizsgálandó anyaggal, így például annak fizikai-kémiai vagy toxikológiai tulajdonságaival kapcsolatos konkrét ismeretek alapján egyedi esetekhez kell adaptálni. Az ilyen adaptáció akkor elfogadható, ha meggyőző tudományos bizonyítékok szerint informatívabb vizsgálatot eredményez. Ilyen esetben a tudományos bizonyítékokat részletesen ismertetni kell a vizsgálati jelentésben.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Fejlődési toxikológia: a fogantatás előtt vagy a prenatális fejlődés során, vagy a születés és szexuális érés közötti időszakban (posztnatálisan) történő expozícióból származó, a fejlődő élő szervezetet érő káros hatások vizsgálata. A fejlődési toxicitás fő megnyilvánulásai: 1. az élő szervezet elhalása/elhullása; 2. strukturális rendellenesség; 3. rendellenes növekedés; és 4. funkcionális defektus. A fejlődési toxikológia korábban teratológia néven volt ismert.

Káros hatás: a normálhoz képest bármilyen, a kezeléssel összefüggő elváltozás, amely csökkenti az élő szervezet túlélésre, szaporodásra vagy környezethez való alkalmazkodásra való képességét. A fejlődési toxikológia területén a legszélesebb értelemben véve ide tartozik bármely olyan hatás, amely megzavarja a konceptus normális fejlődését a születés előtt és után.

Rendellenes növekedés: az utód szerveinek vagy testének tömegében vagy méretében bekövetkező elváltozás.

Elváltozások (rendellenességek): strukturális elváltozások a fejlődés során, amelyek magukban foglalják mind a deformitásokat, mind az eltéréseket (28).

Deformitás/súlyos fejlődési rendellenesség: az állatra ártalmasnak (vagy akár letálisnak) tartott strukturális változás, amely általában ritka.

▼B

Eltérés/kisebb fejlődési rendellenesség: az állatra kisfokban ártalmasnak vagy ártalmatlannak tartott strukturális változás; lehet átmeneti jellegű, és viszonylag gyakran előfordulhat a kontrollpopulációban.

Konceptus: a megtermékenyített petesejt származékainak összessége a fejlődés bármely szakaszában a megtermékenyítéstől a születésig, amely magában foglalja az extraembrionális burkokat és az embriót vagy magzatot is.

Beágyazódás: a blasztocisztának a méh hámrétegéhez való kapcsolódása, amely magában foglalja a méh hámszövetén történő áthatolást és méhnyálkahártyába történő beágyazódását.

Embrió: az élő szervezet korai vagy fejlődő stádiuma, mégpedig a megtermékenyített petesejtből kialakuló fejlődési produktum a hosszanti tengely megjelenése után, és amíg és az összes főbb struktúra ki nem alakul.

Embriotoxicitás: ártalmas hatás az embrió normál struktúrájára, fejlődésére, növekedésére és/vagy életképességére.

Magzat: a posztembrionális szakaszban lévő, meg nem született utód.

Magzati toxicitás: ártalmas hatás a magzat normál struktúrájára, fejlődésére, növekedésére és/vagy életképességére.

Abortusz: a fogantatás produktumának, azaz az embriónak vagy egy életképtelen magzatnak a méhből történő idő előtti kilökődése/-eltávolítása.

Felszívódás: a méhbe beágyazódott, majd elhalt konceptus felszívódik vagy felszívódott.

Korai felszívódás: a beágyazódás nyoma felismerhető embrió/-magzat nélkül.

Késői felszívódás: elhalt embrió vagy magzat külső degeneratív változásokkal.

NOAEL: a nem észlelhető káros hatás szintjének (no-observed-adverse-effect-level) rövidítése, amely azt a legmagasabb dózisszintet vagy expozíciós szintet jelöli, amelynél nem figyelhetők meg a kezeléssel összefüggő káros hatások.

1.3. REFERENCIAANYAG

Nincs.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó anyagot általában vemhes állatoknak adagolják legalább a beágyazódástól az exterminálás tervezett időpontját megelőző napig, amelynek a lehető legközelebb kell esnie az ellés normál napjához anélkül, hogy az idő előtti ellés miatt felmerülne az adatok elvesztésének kockázata. A vizsgálati módszerrel nemcsak az organogenezis időszakát (pl. rágcsálókban az 5. és 15. nap közötti időszak, nyúlban pedig a 6. és 18. nap közötti időszak) lehet vizsgálni, hanem már a beágyazódás előtti időszaktól kezdve adott esetben az egész vemhességen át a császármetszés előtti napig jelentkező hatásokat is. Röviddel a császármetszés előtt a nőstényeket exterminálni kell, és meg kell vizsgálni a méhtartalmat, a magzatok esetében pedig meg kell vizsgálni a külsőleg látható rendellenességeket, valamint a lágyszövetben és vázrendszerben észlelhető elváltozásokat.

▼B

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.5.1. **Az állatfaj kiválasztása**

Ajánlatos a vizsgálatot az erre legalkalmasabb fajban végezni, és olyan laboratóriumi fajt és törzset alkalmazni, amelyet széles körben használnak prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatokhoz. A preferált rágcsálófaj a patkány, a preferált nem rágcsálófaj pedig a nyúl. Az ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

1.5.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

Rágcsálók esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (± 3 °C)-nak, nyulak esetében pedig 18 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

A pároztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Bár előnyösebb a pároztatott állatokat egyedileg tartani, kis számban csoportos tartás is elfogadható.

1.5.3. **Az állatok előkészítése**

Legalább 5 napon át a laboratórium körülményeihez szoktatott, egészséges állatokat kell alkalmazni, amelyek korábban nem voltak más kísérlet alanyai. A kísérleti állatok jellemzésekor meg kell adni az állat faját, törzsét, származását, ivarát, testtömegét és/vagy életkorát. Amennyire csak megoldható, az állatok az összes vizsgálati csoportban legyenek azonos testtömegűek és korúak. Minden dózishoz még egyszer sem ellett, fiatal felnőtt nőstényeket kell használni. A nőstényeket azonos fajú és azonos törzsből származó hímekkel kell pároztatni, és kerülni kell a testvérek pároztatását. Rágcsálók esetében a vemhesség 0. napja az, amikor hüvelydugó és/vagy sperma észlelhető; nyulak esetében a 0. nap általában a párzás vagy a mesterséges megtermékenyítés napja, ha ezt a technikát alkalmazzák. A pároztatott nőstényeket torzítatlan módon kell a kontroll- és a kezelési csoportokba beosztani. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezése jelentette lehetséges hatásokat. Minden állatot egyedi azonosítószámmal kell ellátni. A pároztatott nőstényeket torzítatlan módon kell beosztani a kontroll- és a kezelési csoportokba, és ha a nőstényeket csoportosan pároztatják, az egyes pároztatási csoportokból származó állatokat egyenletesen kell elosztani a kezelési és kontrollcsoportokban. Az azonos hímmel pároztatott nőstényeket is egyenletesen kell szétosztani a különböző csoportokba.

1.6. ELJÁRÁS

1.6.1. **Az állatok száma és ivara**

Minden vizsgálati és kontrollcsoportba elegendő számú nőstényt kell beosztani ahhoz, hogy legalább körülbelül 20 olyan nőstény álljon rendelkezésre, amelyekben a boncoláskor beágyazódási helyek találhatók. A 16-nál kevesebb nőstényt – amelyekben beágyazódási helyek találhatók – tartalmazó csoportok esetleg nem megfelelőek a vizsgálatra. Az anyaállatok elhullása nem feltétlenül teszi érvénytelenné a vizsgálatot, feltéve hogy az arány nem haladja meg a körülbelül 10 %-ot.

▼B

1.6.2. **A dózisok előkészítése**

Ha a beadás megkönnyítése érdekében vivőanyagot vagy más adalékot alkalmaznak, a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára és visszatartására vagy kiürülésére gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek megváltoztathatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. A vivőanyag nem lehet fejlődésre toxikus, és nem lehet hatással a szaporodásra sem.

1.6.3. **Adagolás**

A vizsgálandó anyagot általában naponta kell beadni, a beágyazódástól (pl. a pároztatás utáni 5. naptól) a császármetszés tervezett időpontja előtti napig. Ha az esetlegesen végzett előzetes vizsgálatok szerint nincs nagy valószínűsége a beágyazódás előtti veszteségnek, a kezelést az egész vemhességi időszakra ki lehet terjeszteni, azaz a pároztatástól egészen az exterminálás tervezett időpontja előtti napig. Jól ismert, hogy a vemhesség során a nem megfelelő bánásmód vagy stressz prenatális veszteséghez vezethet. A kezeléssel nem összefüggő tényezők miatti prenatális veszteség kivédése érdekében kerülni kell a vemhes állatok szükségtelen kezelését, valamint a külső tényezők, így például zaj miatti stresszt.

Legalább három dózisszintet és ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. A kezelési és kontrollcsoportokba egészséges állatokat kell torzítatlan módon beosztani. A dózisszinteket úgy kell megválasztani, hogy biztosítsák a kiváltott toxikus hatások fokozatosságát. Hacsak a vizsgálandó anyag fizikai/kémiai jellege vagy biológiai tulajdonságai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy valamilyen mértékű fejlődési és/vagy anyai toxicitást (klinikai tünetek vagy testtömegcsökkenés) idézzen elő, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést. A legalább egy köztes dózist úgy kell megválasztani, hogy minimális mértékű észlelhető toxikus hatást váltson ki. Végül a legalacsonyabb dózist úgy kell megválasztani, hogy semmilyen anyai vagy fejlődési toxicitásra utaló tünetet ne okozzon. A dózisok csökkenő sorrendjét úgy kell megválasztani, hogy demonstrálhassák az esetleges dózisfüggő válaszokat és a nem észlelhető káros hatás szintjét (NOAEL). A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása, esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. Bár a cél az anyai NOAEL meghatározása, olyan vizsgálatok is elfogadhatók, amelyben nem határozzák meg ezt (1).

A dózisszintek megválasztásakor figyelembe kell venni mind az esetleg rendelkezésre álló toxicitási adatokat, mind a vizsgálandó anyag vagy rokon anyagok metabolizmusával vagy toxikokinetikájával kapcsolatos további információkat. Ezek az információk segítik majd az adagolási rend megfelelő voltának igazolását is.

Szükség van egy párhuzamos kontrollcsoportra is. Ez a csoport egy placebóval kezelt kontrollcsoport, vagy ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. Minden csoportban ugyanolyan térfogatú vizsgálandó anyagot vagy vivőanyagot kell beadni. A kontrollcsoport(ok)ba tartozó állatokat ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot (ahogyan a legalacsonyabb dózisú kezelési csoportban).

▼B

1.6.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint elvégzett vizsgálat sem a vemhes állatokban, sem utódaikban nem idéz elő észlelhető toxicitást, és ha egy hatás a rendelkezésre álló adatok (pl. szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok) alapján nem várható, a három dózisszint alkalmazásával történő teljes vizsgálatot esetenként szükségtelen elvégezni. A várható humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi esetleg szükségessé a határérték-vizsgálat során. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik, illetve behatárolhatják a lehetséges expozíciós szint maximumát (például a dermális alkalmazás nem okozhat súlyos lokális toxicitást).

1.6.5. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyagot vagy vivőanyagot általában orálisan, intubálással adagolják. Ha más beadási módot alkalmaznak, a vizsgálatot végzőnek ezt részletesen indokolnia kell, és szükség lehet ennek megfelelő módosításokra is (2) (3) (4). A vizsgálandó anyagot minden nap körülbelül ugyanabban az időpontban kell beadni.

Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömegmérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó trimeszterében azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor. A túlzott anyai toxicitás megelőzése érdekében a dózisok megválasztásához fel kell használni a meglévő adatokat. Ha azonban túlzott toxicitást észlelnek a kezelt anyaállatokban, humánus módon exterminálni kell őket. Ha több vemhes állatban is a túlzott toxicitás jelei észlelhetők, meg kell fontolni az adott dóziscsoport kezelésének leállítását. Ha az anyagot mesterséges táplálással adagoljuk, a dózist lehetőleg egyszerre kell egy gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni az állatnak. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, az állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. Ha vivőanyagként kukoricacsíra-olajat alkalmaznak, az egyszerre beadott térfogat nem lehet több mint 0,4 ml/100 g testtömeg. A koncentrációk megfelelő beállításával minimalizálni kell a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisszintnél azonos legyen a térfogat.

1.6.6. **Az anyaállatok megfigyelése**

Legalább naponta egyszer el kell végezni, és le kell jegyezni a klinikai megfigyeléseket, mégpedig lehetőleg a mindig ugyanabban az időpontban vagy időpontokban, amihez figyelembe kell venni azt is, hogy a beadás után várt hatások mikor érik el a maximumukat. Rögzíteni kell az állatok állapotát, ezen belül elhullását, elhullás közelében lévő állapotát, lényeges viselkedésbeli változásait, illetve a szemmel látható toxicitás minden jelét.

1.6.7. **Testtömeg és táplálékfogyasztás**

A vemhesség 0. napján, vagy ha külső forrásból beszerzett, adott időben pároztatott állatokat alkalmaznak, akkor legkésőbb a vemhesség 3. napján, majd a kezelés első napján és azt követően a kezelési időszakban legalább 3 naponta, továbbá az exterminálás tervezett napján meg kell mérni az állatok testtömegét.

▼B

A táplálékfogyasztást háromnaponta kell feljegyezni, ezen belül is ugyanazon a napon, amikor a testtömegméréseket végzik.

1.6.8. **Post mortem vizsgálat**

A nőstényeket az ellés várható időpontját megelőző napon kell exterminálni. Az exterminálás tervezett időpontja előtt abortusz vagy koraellés jeleit mutató nőstényeket exterminálni kell, majd a tetemeket alapos makroszkópos vizsgálatnak kell alávetni.

A vizsgálat befejezésekor vagy a vizsgálat során bekövetkező elhullás során makroszkóposan meg kell vizsgálni az anyaállatban az esetleges strukturális rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. A torzítások minimalizálása érdekében a császármetszés során az anyaállatok, majd ezt követően a magzatok vizsgálatát lehetőleg anélkül kell végezni, hogy tudható lenne, melyik kezelési vagy kontrollcsoportból származnak.

1.6.9. **A méhtartalom vizsgálata**

A vizsgálat befejezésekor vagy az elhullás után amilyen gyorsan csak lehet, ki kell venni az állatok méhét, és ellenőrizni kell, hogy vemhesek voltak-e. Azokat a méheket, amelyek nem tűnnek vemhesnek, további vizsgálatoknak (pl. rágcsálók esetében ammónium-szulfid-festésnek, nyulak esetében pedig Salewski-festésnek vagy más megfelelő eljárásnak) kell alávetni annak igazolása érdekében, hogy az állat valóban nem volt vemhes (5).

A vemhes méheket a méhnyakkal együtt meg kell mérni. Nem kell megmérni azoknak a vemhes méheknek a tömegét, amelyeket a vizsgálat során elhullott állatokból vettek ki.

A vemhes állatokban meg kell határozni a sárgatestek számát is.

A méhtartalom vizsgálatakor meg kell határozni, hogy hány embrió vagy magzat halt el, illetve hogy hány életképes magzatot tartalmaz. Le kell írni a felszívódás mértékét, hogy megbecsülhető legyen a konceptus elhalásának relatív időpontja (lásd 1.2. szakasz).

1.6.10. **A magzatok vizsgálata**

Minden magzat esetében meg kell határozni a magzat ivarát és testtömegét.

Minden magzat esetében meg kell továbbá vizsgálni, hogy vannak-e külső elváltozások (6).

A magzatokban meg kell vizsgálni, hogy vannak-e vázrendszeri és lágyszöveti elváltozások (pl. eltérések és deformitások vagy rendellenességek) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Előnyös, de nem feltétlenül szükséges a magzati elváltozások kategorizálása. Ha elvégezzük a kategorizálást, világosan meg kell jelölni az egyes kategóriák meghatározásának kritériumait. Különös figyelmet kell szentelni a szaporítószervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek.

Rágcsálók esetében körülbelül az alom felét kell előkészíteni a vázrendszeri, a maradékot pedig a lágyszöveti elváltozások vizsgálatára, ahol az utóbbihoz elfogadott és megfelelő sorozatmetszési módszereket vagy óvatos makroszkópos boncolási technikákat kell alkalmazni.

▼B

Nem rágcsálók, pl. nyulak esetében, minden magzatban meg kell vizsgálni mind a lágyszöveti, mind pedig a vázrendszeri elváltozásokat. A lágyszöveti elváltozások vizsgálatához a magzatok testét óvatos boncolás segítségével kell értékelni, amely magában foglalhatja a belső szívstruktúra további tanulmányozását is (25). Az így megvizsgált magzatok felénél el kell távolítani a fejet, és elő kell készíteni az abban lévő lágy szövetek (szem, agy, orrjáratok és nyelv) vizsgálatára, amelyhez standard sorozatmetszési módszereket (26) vagy más, ugyanilyen érzékeny módszert kell alkalmazni. A testeket, illetve a fennmaradó ép magzatok testét elő kell készíteni a vázrendszeri elváltozások vizsgálatára, amelyhez ugyanazokat a módszereket kell használni, mint rágcsálók esetében.

2. ADATOK

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az adatokat mind az anyaállatok, mind utódaik esetében egyedileg kell a jelentésben rögzíteni, majd táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport és generáció esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, valamint az elhullások és a humánus exterminációk időpontját, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, az embriókkal/magzatokkal kapcsolatos megfigyeléseket és az almokra vonatkozó minden vonatkozó adatot.

A számszerű eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni, amelynél az adatanalízishez használt egység az alom. Általánosan elfogadott statisztikai módszert kell használni; a vizsgálat megtervezése során kell azt kiválasztani, és a választást meg kell indokolni. A jelentésben fel kell tüntetni azoknak az állatoknak az adatait is, amelyek nem maradtak életben a tervezett exterminálásuk időpontjáig. Adott esetben a csoportátlagok számításához is fel lehet használni ezeket az adatokat. Az ilyen állatokból nyert adatok alkalmazhatóságát, és így a csoportátlag(ok)ba való beszámításukat vagy abból való kizárásukat minden esetben egyedileg kell meghatározni, és megfelelően indokolni is kell.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A prenatális fejlődési toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások szempontjából kell értékelni. Az értékelés az alábbi információkat foglalja magában:

— az anyaállatok és az embriók/magzatok vizsgálatainak eredményei, ezen belül az állat expozíciója és az egyes hatások gyakorisága vagy súlyossága közötti összefüggések vagy azok hiányának értékelése,

— a magzatok külső, lágyszöveti és vázrendszeri elváltozásainak esetleges kategorizálásánál alkalmazott kritériumok,

▼B

— a vizsgálat eredményeinek értelmezését javítandó, adott esetben korábbi kontrolladatok,

— az összes százalék és mérőszám számításához felhasznált számadatok,

— adott esetben a vizsgálat eredményeinek megfelelő statisztikai elemzése, amelynek elegendő információt kell tartalmaznia az elemzési módszerrel kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést.

Bármely olyan vizsgálatban, amely a toxikus hatások hiányát igazolja, további vizsgálatokat kell végezni a vizsgálandó anyag felszívódásának és biológiai hozzáférhetőségének meghatározására.

2.3. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatokkal a vemhesség során egy anyaggal történő ismételt expozíciónak az anyaállatra és utódai méhen belüli fejlődésére gyakorolt hatásai tanulmányozhatóak. A vizsgálat eredményeit a szubkrónikus, reprodukciós, toxikokinetikai és egyéb vizsgálatok eredményeivel összefüggésben kell értelmezni. Mivel mind az általános toxicitásra (az anyai toxicitás révén), mind pedig a fejlődési toxicitási végpontokra hangsúly kerül, a vizsgálat eredményei bizonyos mértékig lehetővé teszik az általános toxicitás hiányában is fellépő, a fejlődésre gyakorolt hatások megkülönböztetését azoktól, amelyeket az anyaállatra is toxikus szintek idéznek elő (27).

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A jelentésnek az alábbi konkrét információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és ahol fontos, fizikai-kémiai tulajdonságok,

— megjelölés, és ezen belül – ha ismert, vagy meghatározták – a CAS-szám,

— tisztaság.

Vivőanyag (ha szükséges):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj és törzs,

— az állatok száma és életkora,

— származás, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

— a dózisszintek megválasztásának indoklása,

— a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos információk,

▼B

— a vizsgálandó anyag adagolásának adatai,

— adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap),

— környezeti feltételek,

— a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos adatok.

Eredmények:

Anyai toxikus válaszadatok a dózis függvényében, ezen belül többek között:

— az állatok száma a vizsgálat kezdetén, az életben maradt állatok száma, továbbá a vemhes, az abortáló és a koraellő állatok száma,

— az esetleges vizsgálat közbeni elhullás időpontja, vagy hogy az állat életben maradt-e az exterminálás időpontjáig,

— a tervezett exterminálás előtt elpusztult állatok adatait is bele kell foglalni a jelentésbe, de a csoportok közötti statisztikai összehasonlításokba nem,

— az egyes rendellenes klinikai tünetek megfigyelésének időpontja, valamint ezek későbbi lefolyása,

— testtömeg, testtömegváltozás és a vemhes méhek tömege, ezen belül adott esetben a vemhes méh tömegével korrigált testtömegváltozás,

— táplálékfogyasztás és, ha mérve volt, vízfogyasztás,

— boncolási eredmények, ezen belül a méh tömege,

— a jelentésben fel kell tüntetni az anyai és fejlődési hatásokra vonatkozó NOAEL-értékeket is.

Fejlődési végpontok a dózis függvényében azokra az almokra vonatkozóan, ahol beágyazódás történt, ezen belül:

— a sárgatestek száma,

— a beágyazódások száma, az élő és elhalt magzatok és a felszívódások száma, valamint százalékos aránya,

— a beágyazódás előtti és után veszteségek száma és százalékos aránya.

Fejlődési végpontok a dózis függvényében azokra az almokra vonatkozóan, ahol élő magzatok vannak, ezen belül:

— az élő utódok száma és százalékos aránya,

— ivararány,

— a magzatok testtömege, lehetőleg ivaronként külön, és együtt is,

— külső, lágyszöveti és vázrendszeri deformitások, valamint más lényeges elváltozások,

— adott esetben a kategorizálás kritériumai,

▼B

— a külső, lágyszöveti és vázrendszeri elváltozásokat mutató magzatok és almok összesített száma és százalékos aránya, valamint az egyedi rendellenességek és más lényeges elváltozások típusa és gyakorisága.

Az eredmények diszkussziója.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996). A Simulation Study of the Influence 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 Toxicology* 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-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964). Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimentelle 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). Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992). Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor 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, RE. and Schnell, V.L. (1964). Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain 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, IL.

(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, E.B. and C.G. Bennett (1977). A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, TE. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, 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. A RÁKKELTŐ HATÁS VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 451. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. A rákkeltő hatás vizsgálatára vonatkozó eredeti 451. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen felülvizsgált B.32. vizsgálati módszer kidolgozását az állatjóllét és a szabályozási követelmények terén az elmúlt időszakban bekövetkezett változások figyelembevétele érdekében tartották szükségesnek (2) (3) (4) (5) (6). E B.32. vizsgálati módszer frissítése e melléklet B.30., Krónikus toxicitási vizsgálatok című és B.33., A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata című fejezetének felülvizsgálatával párhuzamosan történt meg a vizsgálatban alkalmazott állatokra vonatkozó további információk megszerzése, valamint a dózis kiválasztásával kapcsolatos további részletek biztosítása céljából. A jelen B.32. vizsgálati módszer vegyi anyagok széles skálájának vizsgálatára szolgál, beleértve a növényvédő szereket és az ipari vegyszereket. Meg kell jegyezni azonban, hogy gyógyszeranyagok esetében néhány részlet és követelmény eltérő lehet (lásd: International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. A rákkeltő hatással foglalkozó vizsgálatok többségét rágcsálófajokon végzik, ezért a jelen vizsgálati módszer elsősorban az e fajokon végzett vizsgálatokra alkalmazandó. Amennyiben az ilyen vizsgálatokat rágcsálóktól eltérő fajokon kell elvégezni, a megfelelő módosításokkal a jelen vizsgálati módszerben vázolt elvek és eljárások alkalmazandók, az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (6) vázoltakkal együtt. További útmutatás a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban (7) található.

3. A rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott három fő beadási mód az orális, a dermális és az inhalációs. A beadási mód kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció jellemző módjától. Az expozíciós mód kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

4. A jelen vizsgálati módszer az orális expozíciós módra összpontosít, amely a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során a leggyakrabban alkalmazott mód. Az emberi egészségre jelentett kockázat értékeléséhez és/vagy bizonyos szabályozási rendszerek előírásai alapján dermális vagy inhalációs expozíciót alkalmazó, rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elvégzésére is szükség lehet ugyan, azonban technikai szempontból e két expozíciós mód mindegyike igen összetett. Az ilyen vizsgálatokat eseti alapon kell megtervezni, bár az itt ismertetett, a rákkeltő hatás orális beadás útján történő meghatározására és értékelésére szolgáló vizsgálati módszer a kezelési időszakokra, klinikai és patológiai paraméterekre stb. vonatkozó ajánlások tekintetében alapul szolgálhat az inhalációs és/vagy dermális vizsgálatokra vonatkozó protokollhoz. A vizsgált vegyi anyagok dermális (7) és inhalációs (7) (8) módon történő beadásával kapcsolatban OECD-iránymutatások állnak rendelkezésre. E melléklet B.8. (9) és B.29. fejezetét (10), valamint az akut inhalációs vizsgálatra vonatkozó OECD-iránymutatást (8) kifejezetten alkalmazni kell az inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszabb távú vizsgálatok tervezése során. A dermális beadással végzett vizsgálatok esetében e melléklet B.9. fejezetét (11) kell alkalmazni.

▼M4

5. A rákkeltő hatás vizsgálata információt szolgáltat az ismételt, a vizsgált fajok élettartamának akár egészére is kiterjedő expozícióból valószínűsíthetően fakadó egészségügyi kockázatokról. A vizsgálat információkkal szolgál a vizsgált vegyi anyag toxikus hatásairól, beleértve a lehetséges rákkeltő hatást, továbbá jelezheti a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét. Becslést adhat a toxikus hatások észlelhető káros hatással nem járó szintjére, valamint a nem genotoxikus karcinogének esetében a tumorválaszra nézve, amely felhasználható az emberi expozícióra vonatkozó biztonsági kritériumok meghatározásához. Hangsúlyos szerepet kap az állatok lehető legtöbb információ megszerzése érdekében történő körültekintő klinikai vizsgálatának szükségessége is.

6. A jelen vizsgálati módszerben ismertetett, rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok célkitűzései többek között a következők:

— a vizsgált vegyi anyag rákkeltő tulajdonságainak meghatározása, amelyek a párhuzamos kontrollcsoportokhoz viszonyítva megnövelik a neoplazmák gyakoriságát, megnövelik a rosszindulatú neoplazmák arányát vagy lerövidítik a neoplazmák megjelenéséhez szükséges időt,

— a rákkeltő hatás célszervének (célszerveinek) meghatározása,

— a neoplazmák megjelenési idejének meghatározása,

— a tumorok kialakulásával kapcsolatos dózis-válasz összefüggés jellemzőinek meghatározása,

— a nem észlelhető káros hatás szintjének (NOAEL) vagy a benchmark-dózis (BMD) meghatározásához szükséges kiindulópontnak a meghatározása,

— a rákkeltő hatások extrapolálása az alacsony dózisú emberi expozíciós szintekre,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó hipotézisek vizsgálatához szükséges adatok biztosítása (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. A vizsgált vegyi anyag potenciális rákkeltő hatásának vizsgálata és értékelése során a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat megkezdését megelőzően annak érdekében, hogy a vizsgálati terv a lehetséges rákkeltő hatás hatékonyabb vizsgálatára összpontosítson, valamint hogy az állatkísérleteket minimálisra csökkentsük. A feltételezett karcinogén hatásmechanizmusára vonatkozó információk és a hatásmechanizmus figyelembevétele (2) (7) (12) (13) (14) (15) különösen fontos, mivel az optimális terv eltérő lehet attól függően, hogy a vizsgált vegyi anyag ismert vagy feltételezett genotoxikus karcinogén-e. A hatásmechanizmus figyelembevételére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban (7) szerepel.

8. A vizsgálat megtervezését segítő információk többek között a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, bármely *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei, beleértve a genotoxicitási vizsgálatokéit, a várható felhasználási terület(ek) és az emberi expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagok rendelkezésre álló (Q)SAR-adatai, mutagenitásra/genotoxicitásra, rákkeltő hatásra vonatkozó és egyéb toxikológiai adatai, a rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok (egyszeri dózisra és lehetőség szerint ismételt dózisra vonatkozó

▼M4

kinetikai adatok), valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok. A rákkeltő hatás értékelése a toxicitásra vonatkozó, 28 napos vagy 90 napos ismételt dózisú toxicitásvizsgálatokból származó kezdeti információk megszerzését követően végezendő el. A rák előidézésére, illetve elősegítésére vonatkozó rövid távú vizsgálatok szintén hasznos információkat szolgáltathatnak. Az adott vizsgált vegyi anyag lehetséges egészségkárosító hatásai átfogó vizsgálatának részeként a rákkeltő hatás vizsgálatának fokozatos megközelítését kell megfontolni (16) (17) (18) (19).

9. Az eredmények elemzése szempontjából legmegfelelőbb statisztikai módszereket az adott kísérleti tervre és célkitűzésekre tekintettel a vizsgálat kezdetét megelőzően kell meghatározni. A megfontolandó kérdések közé tartozik, hogy tartalmazzanak-e a statisztikák a túléléssel kapcsolatos kiigazítást, a kumulatív tumorkockázat túlélési időtartamhoz viszonyított elemzését, a tumor kialakulási idejének elemzését, valamint egy vagy több csoport idő előtti megszüntetése esetén végzett elemzést. A megfelelő statisztikai elemzésekre vonatkozó útmutatást, továbbá a nemzetközileg elfogadott statisztikai módszerekre vonatkozó főbb hivatkozásokat a 116. iránymutatás (7), valamint a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elemzésével és értékelésével kapcsolatos 35. iránymutatás (20) tartalmazza.

10. A rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elvégzése során a klinikai tünetek mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjai felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló 19. OECD-iránymutatásban (21), különösen annak 62. bekezdésében ismertetett vezérelveket és szempontokat minden esetben követni kell. E bekezdés szerint: „*Ha az ismételt adagolást alkalmazó vizsgálatok során egy állat progresszív, az állapot további romlásához vezető klinikai tüneteket mutat, tájékozott döntést kell hozni az állat humánus elpusztítására vonatkozóan. A döntéshozatal során mérlegelni kell az állat vizsgálatának folytatása révén szerezhető információk értékét az állat általános állapotához viszonyítva. Ha úgy döntünk, hogy az állatot továbbra is vizsgálni kell, a megfigyelések gyakoriságát szükség szerint növelni kell. Ha ez nem befolyásolja hátrányosan a vizsgálat céljának elérését, lehetséges az adagolás átmeneti szüneteltetése – ha ez csökkenti a fájdalmat vagy a szorongást – vagy a vizsgálati dózis csökkentése.*”

11. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott dózisok kiválasztásnak elveire vonatkozó részletes útmutatás és ezen elvek leírása a 116. iránymutatásban (7), valamint a Nemzetközi Élettudományi Intézet két kiadványában található (22) (23). A fő dózis-kiválasztási stratégia a vizsgálat elsődleges célkitűzésétől vagy célkitűzéseitől függ (6. bekezdés). A megfelelő dózisszintek kiválasztásakor egyensúlyt kell találni egyfelől a veszélyesség vizsgálata, másfelől az alacsony dózisra adott válaszok jellemzése és azok relevanciája között. Ez különösen lényeges a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata (e melléklet B.33. fejezete) esetében (12. bekezdés).

12. Meg kell fontolni a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának elvégzését (e melléklet B.33. fejezete) a krónikus toxicitási vizsgálat (e melléklet B.30. fejezete) és a rákkeltő hatás vizsgálatának (a jelen B.32. vizsgálati módszer) külön-külön történő elvégzése helyett. A két külön vizsgálat elvégzéséhez viszonyítva az együttes vizsgálat idő- és költséghatékonyabb anélkül, hogy befolyásolná az adatok minőségét a krónikus fázisban vagy a karcinogenitási fázisban. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata során (e melléklet B.33. fejezete) azonban körültekintően figyelembe kell venni a dóziskiválasztás elveit (11. és 22–25. bekezdés), továbbá azt is meg kell jegyezni, hogy bizonyos szabályozási keretrendszerek a vizsgálatok külön-külön történő elvégzését írhatják elő.

▼M4

13. A jelen vizsgálati módszerrel összefüggésében használt fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén és a 116. iránymutatásban található (7).

A VIZSGÁLAT ELVE

14. A vizsgált vegyi anyagot naponta, fokozatosan emelkedő dózisokban, általában orális úton adjuk be a vizsgált állatok több csoportjának az élettartamuk jelentős részén keresztül. Inhalációs vagy dermális bejuttatással történő vizsgálat is megfelelő lehet. Az állatokat gondosan megfigyeljük a toxicitás jeleinek és a neoplasztikus elváltozások kialakulásának észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

15. A jelen vizsgálati módszer elsősorban a rákkeltő hatás rágcsálókban történő vizsgálatával és értékelésével foglalkozik (2. bekezdés). A rágcsálóktól eltérő fajok használata fontolóra vehető, ha a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy az ilyen fajok relevánsabbak az emberekre gyakorolt egészségi hatások előrejelzése tekintetében. A faj kiválasztását indokolni kell. Az előnyben részesítendő rágcsálófaj a patkány, de más rágcsálófaj, például az egér is használható. Habár az egér használatának hasznossága a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során korlátozott lehet (24) (25) (26), néhány jelenlegi szabályozási program megköveteli a rákkeltő hatás egereken történő vizsgálatát, hacsak nem nyert megállapítást, hogy az ilyen vizsgálat tudományos szempontból nem szükséges. A patkányok és az egerek a viszonylag rövid élettartamuk, gyógyszerészeti és toxikológiai vizsgálatokban elterjedt használatuk, a tumorindukcióra való fogékonyságuk, valamint a megfelelően jellemzett törzsek rendelkezésre állása miatt preferált kísérleti modellek. E tulajdonságok eredményeképpen nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre fiziológiájukról és patológiájukról. A faj és törzs kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

16. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A rákkeltő hatás vizsgálatát lehetőleg olyan állatokon kell elvégezni, amelyek törzse és eredete megegyezik a rövidebb időtartamú előzetes toxicitási vizsgálat(ok)ban felhasznált állatokéval, habár ha ismert, hogy az ehhez a törzshöz tartozó és ilyen eredetű állatoknál problémák jelentkeznek a hosszú távú vizsgálatok esetében általánosan elfogadott túlélési szempontok teljesítése tekintetében (lásd a 116. iránymutatást (7)), fontolóra kell venni egy, a hosszú távú vizsgálatok esetében elfogadható túlélési aránnyal rendelkező állattörzs használatát. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek.

Az állatok tartása és etetése

17. Az állatokat külön, vagy azonos nemű egyedekből álló kis csoportokban kell tartani; a külön történő tartást csak akkor kell fontolóra venni, ha az tudományos szempontból indokolt (27) (28) (29). A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmánynak meg kell felelnie a vizsgált faj összes tápanyagigényének, és a vizsgálat eredményét esetlegesen befolyásoló takarmány-szennyeződések mennyiségének – beleértve többek között a növényvédőszer-maradványokat, a perzisztens szerves szennyező anyagokat,

▼M4

a fitoösztrogéneket, a nehézfémeket és a mikotoxinokat – a lehető legalacsonyabbnak kell lennie. A tápanyagokban és takarmányokban lévő szennyező anyagok szintjére vonatkozó analitikai információkat időszakos jelleggel kell meghatározni, legalább a vizsgálat kezdetekor, valamint amikor változás következik be a felhasznált adagban, és ezeket az információkat a zárójelentésben közölni kell. A vizsgálat során felhasznált ivóvízre vonatkozó analitikai információkat hasonló módon kell megadni. A vizsgált vegyi anyag táplálékkal történő beadása esetén a takarmány megválasztását befolyásolhatja annak szükségessége, hogy az megfelelően keveredjen el a takarmánnyal és kielégítse az állatok táplálkozási igényeit.

Az állatok előkészítése

18. A laboratóriumi körülményekhez legalább 7 napig szoktatott, egészséges állatokat kell használni, amelyek korábban nem voltak kitéve kísérleti eljárásoknak. Rágcsálók esetében az állatoknak történő adagolást az elválasztást és szoktatást követően a lehető leghamarabb, és lehetőleg az állatok 8 hetes kora előtt meg kell kezdeni. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és életkor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya az egyes nemeken belül csak minimálisan térhet el egymástól, a vizsgálatban használt összes állat súlyának átlagos értékétől pedig legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet mindkét nem esetében. Az állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és kezelt csoportokba. A véletlenszerű kiválasztást követően nem lehet lényeges különbség az egyes nemeken belül a csoportok átlagos testsúlya között. Ha statisztikailag szignifikáns különbségek fordulnak elő, a véletlenszerű kiválasztás lépését lehetőség szerint meg kell ismételni. Minden egyes állatnak egyedi azonosító számot kell kapnia, és minden egyes állatot maradandóan meg kell jelölni ezzel a számmal tetoválás, mikrochip-beültetés vagy más megfelelő módszer segítségével.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

19. A vizsgálathoz mindkét nemet fel kell használni. Megfelelő számú állatot kell használni az alapos biológiai és statisztikai értékelés lehetővé tétele érdekében. Éppen ezért minden egyes dóziscsoport és kísérő kontrollcsoport nemenként legalább 50 állatból kell álljon. A vizsgálat céljától függően a főbb becslések statisztikai ereje növelhető lehet az állatok különböző dóziscsoportokba történő egyenlőtlen elosztásával oly módon, hogy több mint 50 állatnak kell lennie az alacsony dózisú csoportokban, például az alacsony dózisok karcinogenitásának becslése céljából. Meg kell azonban jegyezni, hogy a csoport méretének mérsékelt növelése viszonylag kis mértékben növeli a vizsgálat statisztikai erejét. A vizsgálat statisztikai tervezéséről és a dózisszinteknek a statisztikai erő maximális szintre való növelése érdekében történő kiválasztásáról további információk a 116. iránymutatásban (7) találhatók.

Időközi elpusztítás és kísérő (jelző-) csoportok alkalmazásának előírása

20. Amennyiben ez tudományos szempontból indokolt, a vizsgálat a neoplasztikus elváltozások alakulására vonatkozó és mechanisztikai információk megszerzése céljából előírhatja az időközi elpusztítást, például a 12. hónapban. Abban az esetben, ha ilyen információk a vizsgált vegyi anyaggal végzett korábbi, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatokból már rendelkezésre állnak, az időközi elpusztítás tudományos szempontból nem feltétlenül indokolt. Ha a vizsgálati terv időközi elpusztítást tartalmaz, az időközben elpusztítandó állatok száma minden egyes dóziscsoportban rendszerint nemenként 10, a vizsgálati tervben szereplő állatok teljes számát pedig annyival kell megnövelni, ahány állat elpusztítását tervezzük a vizsgálat befejezése előtt. Szükség szerint egy jelzőállatokból álló további (jellemzően nemenként 5 állatból álló) csoport is bevonható a betegség állapotának a vizsgálat közben történő megfigyelése céljából (30). További útmutatás a 116. iránymutatásban (7) található.

▼M4

Dóziscsoportok és adagolás

21. A dózis kiválasztásának és a dózisszintek felosztásának összes szempontjára vonatkozó útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Legalább három dózisszintet és egy ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. A dózisszintek megválasztása általában a rövidebb távú ismételt adagolású vagy tartománybehatároló vizsgálatok eredményein alapul, figyelembe véve a vizsgált vegyi anyagra vagy rokon vegyi anyagokra vonatkozóan rendelkezésre álló bármilyen toxikológiai és toxikokinetikai adatot.

22. Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek korlátot, a legmagasabb dózisszintet olyan módon kell kiválasztani, hogy az alkalmas legyen az elsődleges célszervek és toxikus hatások meghatározására, ugyanakkor elkerülhető legyen a szenvedés, a súlyos toxicitás, a morbiditás vagy az elhullás. A 23. bekezdésben bemutatott tényezők figyelembevétele mellett a legmagasabb dózisszintet általában úgy kell megválasztani, hogy toxicitást váltson ki, amely például a testsúly növekedésének (körülbelül 10 %-os) visszaesésével bizonyítható. A vizsgálat célkitűzéseitől függően azonban (lásd a 6. bekezdést) a toxicitást bizonyíthatóan kiváltó dózisnál alacsonyabb maximális dózis is választható, például ha egy dózis káros hatást idéz elő, amely azonban csak kismértékben befolyásolja az élettartamot vagy a testsúlyt.

23. A dózisszintek és azok felosztása megválasztható úgy, hogy meghatározható legyen a dózis-válasz összefüggés, valamint a vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusától függően a NOAEL vagy a vizsgálat egyéb tervezett kimenetele, például a legalacsonyabb dózisszinten megfigyelhető BMD (lásd a 25. bekezdést). Az alacsonyabb dózis kiválasztása során figyelembe veendő tényezők többek között a dózis-válasz görbe várható meredeksége, azok a dózisok, amelyeknél fontos változások következhetnek be a metabolizmusban vagy a toxikus hatás mechanizmusában, amelyeknél küszöbérték várható, vagy amelyeknél az alacsony dózis extrapolálásához használható kiindulási pont várható.

24. A dózisszintek felosztásának kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől, és nem írható elő a jelen vizsgálati módszerben, ugyanakkor csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, az adagolások közötti nagyon nagy intervallumok (például körülbelül 6–10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása. A 10-nél magasabb szorzófaktorokat általában kerülni kell, és használatukat meg kell indokolni.

25. A 116. iránymutatásban (7) részletesebben kifejtettek szerint a dózis kiválasztásakor figyelembe veendő szempontok többek között a következők:

— ismert vagy feltételezett nemlinearitások vagy elhajlási pontok a dózis-válasz görbén,

— toxikokinetika, valamint azok a dózistartományok, amelyek esetében a metabolikus indukció, a telítettség vagy a külső és belső dózisok közötti nemlinearitás előfordul, vagy nem fordul elő,

— prekurzor elváltozások, hatásmarkerek vagy a főbb mögöttes biológiai folyamatok működésének mutatói,

— a hatásmechanizmus főbb (vagy feltételezett) aspektusai, például azok a dózisok, amelyeknél megjelenik a citotoxicitás, felborulnak a hormonszintek és a homeoszatikus mechanizmusok stb.,

▼M4

— a dózis-válasz görbe azon területei, ahol különösen pontos becslés szükséges, például a várt BMD vagy egy feltételezett küszöbérték tartományában,

— a várható humán expozíciós szintek figyelembevétele.

26. Kontrollcsoportként egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használunk, egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport alkalmazandó. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a vivőanyagot a dóziscsoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiségben kell beadni. Ha a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal adjuk be, és emiatt a táplálékfogyasztás a táplálék lecsökkent ízletessége miatt jelentősen csökken, hasznos lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazása a megfelelőbb kontroll biztosítása érdekében.

A dózisok előkészítése és a vizsgált vegyi anyag beadása

27. A vizsgált vegyi anyagot általában orálisan, a takarmánnyal vagy az ivóvízzel, vagy gyomorszonda segítségével adjuk be. A bejuttatás útvonalára és módjára vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7). A bejuttatás útvonala és módja függ a vizsgálat céljától, a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, biológiai hozzáférhetőségétől, valamint az emberi expozíció meghatározó útvonalától és módjától. A bejuttatás útvonalának és módjának kiválasztását indokolni kell. Állatjóléti okokból gyomorszonda rendszerint csak olyan hatóanyagoknál alkalmazandó, amelyek esetében a bejuttatásnak ez az útvonala és módja ésszerűen tükrözi a lehetséges humán expozíciót (például gyógyszerek esetében). A táplálékban vagy környezetben előforduló vegyi anyagok, többek között a növényvédő szerek esetében a beadás jellemzően a táplálékon vagy az ivóvízen keresztül történik. Néhány forgatókönyv, például a munkahelyi expozíció esetében ugyanakkor a beadás egyéb útvonalai megfelelőbbnek bizonyulhatnak.

28. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Adott esetben figyelembe kell venni a vivőanyag és más adalékanyagok következő tulajdonságait: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszamaradására gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A vizsgált vegyi anyag beadási körülmények közötti (például takarmánnyal történő beadás során fennálló) stabilitására és (adott esetben) a beadáshoz használt oldatok vagy takarmányok homogenitására vonatkozó információknak rendelkezésre kell állniuk.

29. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. A takarmánnyal történő beadást alkalmazó hosszú távú toxicitási vizsgálatok esetében a takarmányban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kiegyensúlyozatlan táplálkozás elkerülése érdekében általában nem haladhatja meg a teljes takarmány 5 %-át. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmányba keverve adjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (mg/takarmánykilogramm vagy ppm), vagy az állatok testsúlyára heti rendszerességgel kiszámított állandó dózisszint (mg/testsúlykilogramm) alkalmazható. A kiválasztott alternatívát meg kell nevezni.

▼M4

30. Orális úton történő beadás esetén a vizsgált vegyi anyagot naponta kell az állatoknak beadni (heti hét napon keresztül), rágcsálóknál általában 24 hónapon át (lásd még a 32. bekezdést). Bármely más adagolási rendszer – például heti öt napon történő beadás – használatát indokolni kell. Dermális úton történő beadás esetén az állatokat az e melléklet B.9. fejezetében (11) meghatározottak szerint általában legalább napi 6 órán keresztül, heti 7 napon kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni 24 hónapon át. Az inhaláció útján történő expozíciót napi 6 órán keresztül, heti 7 nap kell elvégezni, de indokolt esetben heti 5 napos expozíció is alkalmazható. Az expozíció időtartama általában 24 hónap. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A napi 6 óránál rövidebb expozíciós időtartam alkalmazását indokolni kell. Lásd még e melléklet B.8. fejezetét (9).

31. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, a dózist mindig a nap hasonló időszakában, gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át kell beadni az állatoknak. Általában egyetlen dózist kell beadni naponta egyszer; abban az esetben, ha a vegyi anyag például helyi irritációt okoz, a napi dózisarány fenntartható lehet elosztott (napi kétszeri) beadással. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A mennyiséget a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, és rágcsálók esetében általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm térfogatot (31). A koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni. A fentiek alól kivételt jelentenek az esetlegesen maró vagy irritatív hatást kiváltó anyagok, amelyeket hígítani kell a súlyos helyi hatások elkerülése érdekében. Kerülni kell az emésztőrendszerben valószínűsíthetően maró vagy irritatív hatást kiváltó koncentrációkkal történő vizsgálatokat.

A vizsgálat időtartama

32. A vizsgálat időtartama rágcsálók esetében általában 24 hónap, amely a felhasznált állatok normális élettartamának legnagyobb részére kiterjed. A vizsgált állattörzs élettartamától függően rövidebb vagy hosszabb vizsgálati időtartamok is alkalmazhatók, de ezt meg kell indokolni. Bizonyos egértörzsek, például az AKR/J, a C3H/J vagy a C57BL/6J törzs esetében a 18 hónapos időtartam megfelelőbb lehet. A következőkben iránymutatás olvasható a vizsgálat idejével és befejezésével, valamint a túléléssel kapcsolatban; további, többek között a negatív karcinogenitás túlélési arányhoz viszonyított elfogadhatóságának megfontolásával kapcsolatos útmutatás a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban (7) található.

— Meg kell fontolni a vizsgálat befejezését, ha az életben maradt állatok száma az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokban vagy a kontrollcsoportban 25 százalék alá csökken.

— Abban az esetben, ha csak a magas dózissal kezelt csoportban figyelhető meg idő előtti elhullás a toxicitás következtében, a vizsgálatot nem kell befejezni.

— Az életben maradt egyedek számát nemenként külön-külön kell figyelembe venni.

— A vizsgálat nem tarthat tovább annál a pontnál, amikor a vizsgálat révén nyert adatok már nem elegendőek a statisztikailag érvényes értékelés lefolytatásához.

▼M4

MEGFIGYELÉSEK

33. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Ezen túlmenően az állatokat naponta egyszer meg kell vizsgálni, hogy mutatnak-e meghatározott, toxikológiai szempontból lényeges tüneteket, szondával történő adagolás esetén figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát. Külön figyelmet kell fordítani a daganatképződésre; minden, szemmel látható vagy kitapintható daganat megjelenésének idejét, helyét, méreteit, megjelenési formáját és növekedését fel kell jegyezni.

Testsúly, táplálék-/vízfogyasztás és táplálékhasznosítási képesség

34. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

Hematológiai, klinikai biokémiai és egyéb mérések

35. A vizsgálatból nyerhető lehető legtöbb információ megszerzése érdekében – különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos szempontok meghatározása céljából – a vizsgálatvezető mérlegelése szerint vérminták vehetők a hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatokhoz. Vizeletelemzés elvégzése is célszerű lehet. Az ilyen minták karcinogenitási vizsgálat részeként történő levételének értékére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Amennyiben megfelelőnek ítéljük, a hematológiai és klinikai kémiai meghatározások céljából végzett vérvétel, valamint a vizeletelemzés valamelyik időközi elpusztítás (20. bekezdés) részeként, továbbá a vizsgálat befejezésekor végezhető el, nemenként és csoportonként legalább 10 állaton. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt, és adott esetben a megfelelő körülmények között kell tárolni. Vérkenet is készíthető vizsgálat céljára, különösen akkor, ha a csontvelő tűnik a célszervnek, bár az ilyen jellegű vizsgálatnak a karcinogén/onkogén hatás meghatározása szempontjából képviselt értéke megkérdőjelezhető (32).

PATOLÓGIA

Autopszia

36. A jelzőállatok (lásd a 20. bekezdést) és a kísérő csoportba tartozó többi állat kivételével a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. A jelzőállatok és a kísérő csoportba tartozó többi állat esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség. A szervek súlyának mérése általában nem képezi a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok részét, mivel a geriátriai változások és – a későbbi szakaszokban – a tumorok kifejlődése zavaró tényezők lehetnek a szervek súlyával kapcsolatos adatok hasznosságát illetően. Ezek a mérések azonban kritikusak lehetnek az adatok bizonyító erejének mérlegelése során és különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos megfontolások tekintetében. Ha a szervek súlyának mérése kísérő vizsgálat részét képezi, a mérést legkésőbb a vizsgálat megkezdése után egy évvel el kell végezni.

▼M4

37. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (33) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigy-gyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]
koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag
patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell tartósítani, továbbá elengedhetetlen a bőrből történő mintavétel a beadás helyéről és e minta tartósítása. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. és B.29. fejezetében tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

▼M4

Kórszövettani vizsgálatok

38. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (33). Legalább az alábbi szöveteket kell vizsgálni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket, többek között tumorokat mutató összes szövet,

— azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható kórszövettani elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

39. Az összes értékelt paraméterre vonatkozó adatokat minden egyes állat esetében rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy humánus okokból való elpusztítás időpontját, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát. Az összegző adattáblázatoknak tartalmazniuk kell a toxikus hatásokat vagy elváltozásokat mutató állatokra vonatkozó átlagértékeket és szórásokat (folyamatos vizsgálati adatok esetében), valamint az elváltozások osztályozását.

40. A vizsgálat eredményeinek értékelése szempontjából hasznosak lehetnek a korábbi kontrolladatok, például abban az esetben, ha a párhuzamos kontrollokból származó adatok vélhetően lényegesen eltolódottak az ugyanabban a vizsgálati létesítményben/kolóniában lévő kontrollállatoktól származó újabb adatokhoz képest. Korábbi kontrolladatok elemzése esetén ugyanazon laboratórium által benyújtott, ugyanolyan korú és ugyanabba a törzsbe tartozó állatokra vonatkozó, az adott vizsgálatot megelőző öt évből származó adatokat kell felhasználni.

41. A számszerű eredményeket adott esetben megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket és az elemezendő adatokat a vizsgálat tervezése során kell kiválasztani (9. bekezdés). A kiválasztás során szükség szerint elő kell írni a túlélésre vonatkozó kiigazításokat.

Vizsgálati jegyzőkönyv

42. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

▼M4

— a vegyi anyag származási helye,

— gyártási szám,

— kémiai elemzésről szóló tanúsítvány,

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása (ha az nem víz),

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs, és a választás indokolása,

— az állatok száma, életkora és neme a vizsgálat kezdetekor,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor,

Vizsgálati körülmények:

— a beadási mód és a dózis kiválasztásának indokolása,

— az adatok elemzéséhez adott esetben használt statisztikai módszerek,

— a vizsgált vegyi anyag formulázására/a takarmány előkészítésére vonatkozó részletes adatok,

— a készítmény elért koncentrációjára, stabilitására és homogenitására vonatkozó analitikai adatok,

— a beadási mód és a vizsgált vegyi anyag bejuttatására vonatkozó részletes adatok,

— inhalációs vizsgálatok esetében információ arra vonatkozóan, hogy a bejuttatás csak orron vagy a teljes testfelületen keresztül történt-e,

— tényleges dózisok (mg/testsúlykilogramm/nap), valamint a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (mg/kg vagy ppm) a tényleges dózisra való átszámításhoz használt átszámítási tényező, ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,

Eredmények (az adatok táblázatos összefoglalását és az egyes állatokra vonatkozó adatokat is meg kell adni)

Általános

— túlélési adatok,

— testsúly és annak változásai,

— takarmányfogyasztás, a táplálékhasznosítási képességgel kapcsolatos számítások, ha vannak, valamint vízfogyasztás, ha alkalmazható,

— toxikokinetikai adatok (ha rendelkezésre állnak),

— oftalmoszkópia (ha rendelkezésre áll),

— hematológia (ha rendelkezésre áll),

— klinikai kémia (ha rendelkezésre áll),

▼M4

Klinikai leletek

— toxicitási tünetek,

— az esetleges rendellenességek előfordulása (és – ha pontozzuk – azok súlyossága),

— a megfigyelt klinikai tünetek jellege, súlyossága és időtartama (átmeneti vagy állandó),

Boncolási adatok

— testsúly elpusztuláskor,

— szervek súlya és ezek aránya, ha alkalmazható,

— boncolási eredmények, rendellenességek előfordulása és súlyossága,

Kórszövettani vizsgálatok

— nem neoplasztikus kórszövettani leletek,

— neoplasztikus kórszövettani leletek,

— a makroszkopikus és mikroszkopikus vizsgálatok leletei közötti összefüggés,

— a kezeléssel összefüggő összes kórszövettani lelet részletes leírása, beleértve a súlyossági fokokat,

— a tárgylemezek szakértői felülvizsgálatáról szóló jelentés,

Az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható

Az eredmények tárgyalása, beleértve a következőket:

— az esetlegesen alkalmazott modellezési megközelítések tárgyalása,

— dózis-válasz összefüggések,

— korábbi kontrolladatok,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ figyelembevétele,

— BMD, NOAEL vagy LOAEL meghatározása,

— humán relevancia.

Következtetések

IRODALOM

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, 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) E melléklet B.27., Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat, 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezete.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at 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) E melléklet B.8., Szubakut inhalációs toxicitás: 28 napos vizsgálat című fejezete.

(10) E melléklet B.29., Szubkrónikus inhalációs toxicitás: 90 napos vizsgálat című fejezete.

(11) E melléklet B.9., Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (dermális) című fejezete.

(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, and 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 (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.

(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 and 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 and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 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) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről, HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

(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. 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. Appéldául 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**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

B.33. A KRÓNIKUS TOXICITÁS ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS EGYÜTTES VIZSGÁLATA

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 453. vizsgálati iránymutatásában (2009) leírt módszerrel. Az eredeti 453. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el. A jelen frissített B.33. vizsgálati módszer kidolgozását az állatjóllét és a szabályozási követelmények terén az elmúlt időszakban bekövetkezett változások figyelembevétele érdekében tartották szükségesnek (1) (2) (3) (4) (5). E B.33. vizsgálati módszer frissítése e melléklet B.32., A rákkeltő hatás vizsgálata című és B.30., Krónikus toxicitási vizsgálatok című fejezetének felülvizsgálatával párhuzamosan történt meg a vizsgálatban alkalmazott állatokra vonatkozó további információk megszerzése, valamint a dózis kiválasztásával kapcsolatos további részletek biztosítása céljából. A jelen vizsgálati módszer vegyi anyagok széles skálájának vizsgálatára szolgál, beleértve a növényvédő szereket és az ipari vegyszereket. Meg kell azonban jegyezni, hogy gyógyszeranyagok esetében néhány részlet és követelmény eltérő lehet (lásd: International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals).

2. A krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok többségét rágcsálófajokon végzik, ezért a jelen vizsgálati módszer elsősorban az e fajokon végzett vizsgálatokra alkalmazandó. Amennyiben az ilyen vizsgálatokat rágcsálóktól eltérő fajokon kell elvégezni, a megfelelő módosításokkal az itt vázolt elvek és eljárások is alkalmazhatók, az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (6) vázoltakkal együtt, a krónikus toxicitási vizsgálatok és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésére és elvégzésére vonatkozó 116. OECD-iránymutatásban leírtak szerint (7).

3. A krónikus toxicitási vizsgálatok, illetve a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott három fő beadási mód az orális, a dermális és az inhalációs. A beadási mód kiválasztása függ a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció jellemző módjától. Az expozíciós mód kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

4. A jelen vizsgálati módszer az orális expozíciós módra összpontosít, amely a krónikus toxicitási és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során a leggyakrabban alkalmazott mód. Az emberi egészségre jelentett kockázat értékeléséhez és/vagy bizonyos szabályozási rendszerek előírásai alapján dermális vagy inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszú távú vizsgálatok elvégzésére is szükség lehet ugyan, azonban technikai szempontból e két expozíciós mód mindegyike igen összetett. Az ilyen vizsgálatokat eseti alapon kell megtervezni, bár az itt ismertetett, a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás orális beadás útján történő meghatározására és értékelésére szolgáló vizsgálati módszer a kezelési időszakokra, klinikai és patológiai paraméterekre stb. vonatkozó ajánlások tekintetében alapul szolgálhat az inhalációs és/vagy dermális vizsgálatokra vonatkozó protokollhoz. A vizsgált vegyi anyagok inhalációs (7) (8) és dermális (7) módon történő beadásával kapcsolatban OECD-iránymutatások állnak rendelkezésre. E melléklet B.8. (9) és B.29. fejezetét (10), valamint az akut inhalációs vizsgálatra vonatkozó OECD-iránymutatást (8) kifejezetten alkalmazni kell az inhalációs expozíciót alkalmazó, hosszabb távú vizsgálatok tervezése során. A dermális beadással végzett vizsgálatok esetében e melléklet B.9. fejezetét (11) kell alkalmazni.

▼M4

5. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata információt szolgáltat az ismételt, a vizsgált fajok élettartamának akár egészére is kiterjedő expozícióból valószínűsíthetően fakadó egészségügyi kockázatokról. A vizsgálat információkkal szolgál a vizsgált vegyi anyag toxikus hatásairól, beleértve a lehetséges rákkeltő hatást, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét. Becslést adhat a toxikus hatások észlelhető káros hatással nem járó szintjére, valamint a nem genotoxikus karcinogének esetében a tumorválaszra nézve, amely felhasználható az emberi expozícióra vonatkozó biztonsági kritériumok meghatározásához. Hangsúlyos szerepet kap az állatok lehető legtöbb információ megszerzése érdekében történő körültekintő klinikai vizsgálatának szükségessége is.

6. A jelen vizsgálati módszerben ismertetett, krónikus toxicitás, illetve rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok célkitűzései többek között a következők:

— a vizsgált vegyi anyag rákkeltő tulajdonságainak meghatározása, amelyek a párhuzamos kontrollcsoportokhoz viszonyítva megnövelik a neoplazmák gyakoriságát, megnövelik a rosszindulatú neoplazmák arányát vagy lerövidítik a neoplazmák megjelenéséhez szükséges időt,

— a neoplazmák megjelenési idejének meghatározása,

— a vizsgált vegyi anyag krónikus toxicitásának meghatározása,

— a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás célszervének (célszerveinek) meghatározása,

— a dózis-válasz összefüggés jellemzőinek meghatározása,

— a nem észlelhető káros hatás szintjének (NOAEL) vagy a benchmark-dózis (BMD) meghatározásához szükséges kiindulópontnak a meghatározása,

— a rákkeltő hatások extrapolálása az alacsony dózisú emberi expozíciós szintekre,

— a krónikus toxicitás hatásainak előrejelzése az emberi expozíciós szintek vonatkozásában,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó hipotézisek vizsgálatához szükséges adatok biztosítása (2) (7) (12) (13) (14) (15).

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. A vizsgált vegyi anyag potenciális rákkeltő hatásának és krónikus toxicitásának vizsgálata és értékelése során a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat megkezdését megelőzően annak érdekében, hogy a vizsgálati terv a vizsgált vegyi anyag toxikológiai tulajdonságainak hatékonyabb vizsgálatára összpontosítson, valamint hogy az állatkísérleteket minimálisra csökkentsük. A feltételezett karcinogén hatásmechanizmusára vonatkozó információk és a hatásmechanizmus figyelembevétele (2) (7) (12) (13) (14) (15) különösen fontos, mivel az optimális terv eltérő lehet attól függően, hogy a vizsgált vegyi anyag ismert vagy feltételezett genotoxikus karcinogén-e. A hatásmechanizmus figyelembevételére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban szerepel (7).

8. A vizsgálat megtervezését segítő információk többek között a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ, bármely *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei, beleértve a genotoxicitási vizsgálatokéit, a várható felhasználási terület(ek) és az emberi expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagok rendelkezésre álló (Q)SAR-adatai, mutagenitásra/genotoxicitásra, rákkeltő hatásra vonatkozó és egyéb toxikológiai adatai, a rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok (egyszeri dózisra és lehetőség szerint ismételt dózisra vonatkozó kinetikai adatok), valamint egyéb ismételt expozíciós vizsgálatokból származó adatok. A

▼M4

krónikus toxicitást/rákkeltő hatás meghatározása csak a toxicitásra vonatkozó, 28 napos vagy 90 napos ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból származó kezdeti információk megszerzését követően végzendő el. A rák előidézésére, illetve elősegítésére vonatkozó rövid távú vizsgálatok szintén hasznos információkat szolgáltathatnak. Az adott vizsgált vegyi anyag lehetséges egészségkárosító hatásai átfogó vizsgálatának részeként a rákkeltő hatás vizsgálatának fokozatos megközelítését kell megfontolni (16) (17) (18) (19).

9. Az eredmények elemzése szempontjából legmegfelelőbb statisztikai módszereket az adott kísérleti tervre és célkitűzésekre tekintettel a vizsgálat kezdetét megelőzően kell meghatározni. A megfontolandó kérdések közé tartozik, hogy tartalmazzanak-e a statisztikák a túléléssel kapcsolatos kiigazítást, a kumulatív tumorkockázat túlélési időtartamhoz viszonyított elemzését, a tumor kialakulási idejének elemzését, valamint egy vagy több csoport idő előtti megszüntetése esetén végzett elemzést. A megfelelő statisztikai elemzésekre vonatkozó útmutatást, továbbá a nemzetközileg elfogadott statisztikai módszerekre vonatkozó főbb hivatkozásokat a 116. iránymutatás (7), valamint a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elemzésével és értékelésével kapcsolatos 35. iránymutatás (20) tartalmazza.

10. A rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok elvégzése során a klinikai tünetek mint a biztonsági értékeléshez használt kísérleti állatok humánus végpontjai felismeréséről, értékeléséről és használatáról szóló OECD-iránymutatásban (21), különösen annak 62. bekezdésében ismertetett vezérelveket és szempontokat minden esetben követni kell. E bekezdés szerint: „*Ha az ismételt adagolást alkalmazó vizsgálatok során egy állat progresszív, az állapot további romlásához vezető klinikai tüneteket mutat, tájékozott döntést kell hozni az állat humánus elpusztítására vonatkozóan. A döntéshozatal során mérlegelni kell az állat vizsgálatának folytatása révén szerezhető információk értékét az állat általános állapotához viszonyítva. Ha úgy döntünk, hogy az állatot továbbra is vizsgálni kell, a megfigyelések gyakoriságát szükség szerint növelni kell. Ha ez nem befolyásolja hátrányosan a vizsgálat céljának elérését, lehetséges az adagolás átmeneti szüneteltetése – ha ez csökkenti a fájdalmat vagy a szorongást – vagy a vizsgálati dózis csökkentése.*”

11. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során alkalmazott dózisok kiválasztásnak elveire vonatkozó részletes útmutatás és ezen elvek leírása a 116. iránymutatásban (7), valamint a Nemzetközi Élettudományi Intézet két kiadványában található (22) (23). A fő dózis-kiválasztási stratégia a vizsgálat elsődleges célkitűzésétől vagy célkitűzéseitől függ (6. bekezdés). A megfelelő dózisszintek kiválasztásakor egyensúlyt kell találni egyfelől a veszélyesség vizsgálata, másfelől az alacsony dózisra adott válaszok jellemzése és azok relevanciája között. Ez különösen lényeges a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata esetében.

12. Meg kell fontolni a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának elvégzését a krónikus toxicitási vizsgálat (e melléklet B.30. fejezete) és a rákkeltő hatás vizsgálatának (e melléklet B.32. fejezete) különkülön történő elvégzése helyett. A két külön vizsgálat elvégzéséhez viszonyítva az együttes vizsgálat idő- és költséghatékonyabb, valamint a használt állatok számának némi csökkenésével jár, anélkül hogy befolyásolná az adatok minőségét a krónikus fázisban vagy a karcinogenitási fázisban. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata során azonban körültekintően figyelembe kell venni a dóziskiválasztás elveit (11. és 22–26. bekezdés), továbbá azt is meg kell jegyezni, hogy bizonyos szabályozási keretrendszerek a vizsgálatok külön-külön történő elvégzését írhatják elő. A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának oly módon történő megtervezésére vonatkozóan, hogy az állatok száma csökkentésének lehetősége szempontjából és a különböző kísérleti eljárások egyszerűsítése révén elérhető legyen a vizsgálat maximális hatékonysága, a 116. iránymutatás (7) tartalmaz további útmutatást.

▼M4

13. A jelen vizsgálati módszerrel összefüggésében használt fogalmak meghatározása a jelen fejezet végén és a 116. iránymutatásban található (7).

A VIZSGÁLAT ELVE

14. A vizsgálati terv két párhuzamos fázist tartalmaz: egy krónikus fázist és egy rákkeltő fázist (az időtartamot lásd a 34. és a 35. bekezdésben). A vizsgált vegyi anyagot általában orális úton juttatjuk be, azonban az inhalációs vagy dermális bejuttatással történő vizsgálat is megfelelő lehet. A krónikus fázis esetében a vizsgált vegyi anyagot naponta adjuk be fokozatos dózisokban a kísérleti állatok több csoportjának, csoportonként egy dózisszintet alkalmazva, általában 12 hónapig, bár hosszabb és rövidebb időtartam is választható a szabályozási követelményektől függően (lásd a 34. bekezdést). A kiválasztott időtartamnak elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kumulatív toxicitás esetleges hatásainak megjelenését a geriátriai változások zavaró hatásai nélkül. A vizsgálati terv egy vagy több időközi elpusztítást is tartalmazhat, például a 3. és a 6. hónapot követően, és állatok további csoportjai vonhatók be ennek kiegyenlítése érdekében (lásd a 20. bekezdést). A rákkeltő fázis esetében a vizsgált vegyi anyagot naponta adjuk be a vizsgált állatok több csoportjának az élettartamuk jelentős részén keresztül. Az állatokat mindkét fázisban gondosan megfigyeljük a toxicitás jeleinek és a neoplasztikus elváltozások kialakulásának észlelése érdekében. A vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokat felboncoljuk, továbbá a vizsgálat befejezése után az életben maradt állatokat is elpusztítjuk és felboncoljuk.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

15. A jelen vizsgálati módszer elsősorban a krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás rágcsálókban történő vizsgálatával és értékelésével foglalkozik (2. bekezdés). A rágcsálóktól eltérő fajok használata fontolóra vehető, ha a rendelkezésre álló adatok arra utalnak, hogy az ilyen fajok relevánsabbak az emberekre gyakorolt egészségi hatások előrejelzése tekintetében. A faj kiválasztását indokolni kell. Az előnyben részesítendő rágcsálófaj a patkány, de más rágcsálófaj, például az egér is használható. Habár az egér használatának hasznossága a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok során korlátozott lehet (24) (25) (26), néhány jelenlegi szabályozási program megköveteli a rákkeltő hatás egereken történő vizsgálatát, hacsak nem nyert megállapítást, hogy az ilyen vizsgálat tudományos szempontból nem szükséges. A patkányok és az egerek a viszonylag rövid élettartamuk, gyógyszerészeti és toxikológiai vizsgálatokban elterjedt használatuk, a tumorindukcióra való fogékonyságuk, valamint a megfelelően jellemzett törzsek rendelkezésre állása miatt preferált kísérleti modellek. E tulajdonságok eredményeképpen nagy mennyiségű információ áll rendelkezésre fiziológiájukról és patológiájukról. A rágcsálótól eltérő fajokon történő, krónikus toxicitás/rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok tervezésének és elvégzésének adott esetben a jelen vizsgálati módszerben ismertetett elveken, valamint az e melléklet B.27., 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezetében (6) leírtakon kell alapulnia. A faj és törzs kiválasztására vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7).

16. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A krónikus toxicitás/rákkeltő hatás együttes vizsgálatát olyan állatokon kell elvégezni, amelyek törzse és eredete megegyezik a rövidebb időtartamú előzetes toxicitási vizsgálat(ok)ban felhasznált állatokéval, habár ha ismert, hogy az ehhez a törzshöz tartozó és ilyen eredetű állatoknál problémák jelentkeznek a hosszú távú vizsgálatok esetében általánosan elfogadott túlélési szempontok teljesítése tekintetében (lásd a 116. iránymutatást (7)), fontolóra kell venni egy, a hosszú távú vizsgálatok esetében elfogadható túlélési aránnyal rendelkező állattörzs használatát. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek.

▼M4

Tartási és etetési körülmények

17. Az állatokat külön, vagy azonos nemű egyedekből álló kis csoportokban kell tartani; a külön történő tartást csak akkor kell fontolóra venni, ha az tudományos szempontból indokolt (27) (28) (29). A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C) kell, hogy legyen. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem szabad meghaladnia a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmánynak meg kell felelnie a vizsgált faj összes tápanyagigényének, és a vizsgálat eredményét esetlegesen befolyásoló takarmány-szennyeződések mennyiségének – beleértve többek között a növényvédőszer-maradványokat, a perzisztens szerves szennyező anyagokat, a fitoösztrogéneket, a nehézfémeket és a mikotoxinokat – a lehető legalacsonyabbnak kell lennie. A tápanyagokban és takarmányokban lévő szennyező anyagok szintjére vonatkozó analitikai információkat időszakos jelleggel kell meghatározni, legalább a vizsgálat kezdetekor, valamint amikor változás következik be a felhasznált adagban, és ezeket az információkat a zárójelentésben közölni kell. A vizsgálat során felhasznált ivóvízre vonatkozó analitikai információkat hasonló módon kell megadni. A vizsgált vegyi anyag táplálékkal történő beadása esetén a takarmány megválasztását befolyásolhatja annak szükségessége, hogy az megfelelően keveredjen el a takarmánnyal és kielégítse az állatok táplálkozási igényeit.

Az állatok előkészítése

18. A laboratóriumi körülményekhez legalább 7 napig szoktatott, egészséges állatokat kell használni, amelyek korábban nem voltak kitéve kísérleti eljárásoknak. Rágcsálók esetében az állatoknak történő adagolást az elválasztást és szoktatást követően a lehető leghamarabb, és lehetőleg az állatok 8 hetes kora előtt meg kell kezdeni. A kísérleti állatokat faj, törzs, eredet, nem, súly és életkor szerint kell jellemezni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya az egyes nemeken belül csak minimálisan térhet el egymástól, a vizsgálatban használt összes állat súlyának átlagos értékétől pedig legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet mindkét nem esetében. Az állatokat véletlenszerűen kell besorolni a kontroll- és kezelt csoportokba. A véletlenszerű kiválasztást követően nem lehet lényeges különbség az egyes nemeken belül a csoportok átlagos testsúlya között. Ha statisztikailag szignifikáns különbségek fordulnak elő, a véletlenszerű kiválasztás lépését lehetőség szerint meg kell ismételni. Minden egyes állatnak egyedi azonosító számot kell kapnia, és minden egyes állatot maradandóan meg kell jelölni ezzel a számmal tetoválás, mikrochip-beültetés vagy más megfelelő módszer segítségével.

ELJÁRÁS

Az állatok száma és neme

19. A vizsgálathoz mindkét nemet fel kell használni. Megfelelő számú állatot kell használni az alapos biológiai és statisztikai értékelés lehetővé tétele érdekében. Rágcsálók esetében ezért a vizsgálat karcinogenitási fázisára szánt minden egyes dóziscsoport (a 22. bekezdésben leírtak szerint) és kísérő kontrollcsoport nemenként legalább 50 állatból kell álljon. A vizsgálat céljától függően a főbb becslések statisztikai ereje növelhető lehet az állatok különböző dóziscsoportokba történő egyenlőtlen elosztásával oly módon, hogy több mint 50 állatnak kell lennie az alacsony dózisú csoportokban, például az alacsony dózisok karcinogenitásának becslése céljából. Meg kell azonban jegyezni, hogy a csoport méretének mérsékelt növelése viszonylag kis mértékben növeli a vizsgálat statisztikai erejét. Rágcsálók esetében a vizsgálat krónikus toxicitási fázisára szánt minden egyes dóziscsoport (a 22. bekezdésben leírtak szerint) és kísérő kontrollcsoport

▼M4

nemenként legalább 10 állatból kell álljon. Meg kell jegyezni, hogy ez a szám alacsonyabb, mint a krónikus toxicitási vizsgálatnál (e melléklet B.30. fejezete). Az együttes vizsgálat krónikus toxicitási fázisában vizsgált, csoportonként kisebb számú állattól származó adatok értelmezését ugyanakkor a vizsgálat karcinogenitási fázisában vizsgált, nagyobb számú állattól származó adatokkal lehet alátámasztani. Az egerekkel végzett vizsgálatok esetében a krónikus toxicitási fázisban további állatok bevonása lehet szükséges minden egyes dóziscsoportban az összes előírt hematológiai meghatározás elvégzése céljából. A vizsgálat statisztikai tervezéséről és a dózisszinteknek a statisztikai erő maximális szintre való növelése érdekében történő kiválasztásáról további információk a 116. iránymutatásban (7) találhatók.

Időközi elpusztításra, kísérő csoportra és jelzőállatokra vonatkozó rendelkezések

20. Amennyiben ez tudományos szempontból indokolt, a vizsgálat a nem neoplasztikus elváltozások alakulására vonatkozó és mechanisztikai információk megszerzése céljából előírhatja az időközi elpusztítást, például a krónikus toxicitási fázis esetén a 6. hónapban. Abban az esetben, ha ilyen információk a vizsgált vegyi anyaggal végzett korábbi, ismételt adagolású toxicitási vizsgálatokból már rendelkezésre állnak, az időközi elpusztítás tudományos szempontból nem feltétlenül indokolt. A vizsgálat krónikus toxicitási fázisában általában 12 hónapon keresztül használt állatok (34. bekezdés) időközi elpusztítással kapcsolatos adatokat szolgáltatnak a vizsgálat karcinogenitási fázisához, ezzel csökkentve az összesen felhasznált állatok számát. Kísérő csoportok is bevonhatók a vizsgálat krónikus toxicitási fázisába a vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából. E csoportok vizsgálata korlátozódhat a vizsgálat legnagyobb dózisával való kezelésre és kontrollvizsgálatra. Szükség szerint egy jelzőállatokból álló további (jellemzően nemenként 5 állatból álló) csoport is bevonható a betegség állapotának a vizsgálat közben történő megfigyelése céljából (30). A vizsgálat időközi elpusztításokat, kísérő csoportokat és jelzőállatokat magában foglaló, és egyúttal az összesen felhasznált állatok számát minimálisra csökkentő megtervezésével kapcsolatban a 116. iránymutatásban (7) található további útmutatás.

21. Ha a vizsgálati terv kísérő csoportot és/vagy időközi elpusztítást tartalmaz, az erre a célra bevont állatok száma rendszerint minden egyes dóziscsoportban nemenként 10, a vizsgálati tervben szereplő állatok teljes számát pedig annyival kell megnövelni, ahány állat elpusztítását tervezzük a vizsgálat befejezése előtt. Az időközben elpusztított és a kísérő csoportban lévő állatokat általában ugyanazoknak a megfigyeléseknek kell alávetni, mint a fő vizsgálat krónikus toxicitási fázisában vizsgált állatokat, beleértve a testsúlyra, táplálék-/vízfogyasztásra, hematológiára és klinikai kémiára vonatkozó méréseket, valamint patológiai vizsgálatokat, de előírható (az időközi elpusztítás céljából bevont csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy az immuntoxicitásra korlátozódjanak.

Dóziscsoportok és adagolás

22. A dózis kiválasztásának és a dózisszintek felosztásának összes szempontjára vonatkozó útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Legalább három dózisszintet és egy ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni, a krónikus és a karcinogenitási fázishoz egyaránt. A dózisszintek megválasztása általában a rövidebb távú ismételt adagolású vagy tartománybehatároló vizsgálatok eredményein alapul, figyelembe véve a vizsgált vegyi anyagra vagy rokon vegyi anyagokra vonatkozóan rendelkezésre álló bármilyen toxikológiai és toxikokinetikai adatot.

▼M4

23. A vizsgálat krónikus toxicitási fázisa esetében a három dózisszintet alkalmazó teljes vizsgálat nem feltétlenül szükséges, ha előre jelezhető, hogy az egyetlen, legalább 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap dózisnak megfelelő dózisszinttel végzett vizsgálat valószínűleg nem okoz kedvezőtlen hatásokat. Ennek az előrejelzésnek előzetes vizsgálatokból származó információkon, valamint azon a megfontoláson kell alapulnia, hogy a szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás. 1 000 mg/testsúlykilogramm/nap határadag alkalmazható, kivéve, ha a humán expozíció magasabb dózisszint használatát indokolja.

24. Ha a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek korlátot, a legmagasabb dózisszintet olyan módon kell kiválasztani, hogy az alkalmas legyen az elsődleges célszervek és toxikus hatások meghatározására, ugyanakkor elkerülhető legyen a szenvedés, a súlyos toxicitás, a morbiditás vagy az elhullás. A legmagasabb dózisszintet általában úgy kell megválasztani, hogy toxicitást váltson ki, amely például a testsúly növekedésének (körülbelül 10 %-os) visszaesésével bizonyítható. A vizsgálat célkitűzéseitől függően azonban (lásd a 6. bekezdést) a toxicitást bizonyíthatóan kiváltó dózisnál alacsonyabb maximális dózis is választható, például ha egy dózis káros hatást idéz elő, amely azonban csak kismértékben befolyásolja az élettartamot vagy a testsúlyt.

25. A dózisszintek és azok felosztása megválasztható úgy, hogy meghatározható legyen a dózis-válasz összefüggés, valamint a vizsgált vegyi anyag hatásmechanizmusától függően a NOAEL vagy a vizsgálat egyéb tervezett kimenetele, például a BMD (lásd a 27. bekezdést). Az alacsonyabb dózis kiválasztása során figyelembe veendő tényezők többek között a dózis-válasz görbe várható meredeksége, azok a dózisok, amelyeknél fontos változások következhetnek be a metabolizmusban vagy a toxikus hatás mechanizmusában, amelyeknél küszöbérték várható, vagy amelyeknél az alacsony dózis extrapolálásához használható kiindulási pont várható. A rákkeltő hatás/krónikus toxicitás együttes vizsgálatának elsődleges célja a karcinogenitási kockázatértékelést szolgáló információk megszerzése, a krónikus toxicitásra vonatkozó információk megszerzése pedig rendszerint másodlagos cél. Ezt szem előtt kell tartani a vizsgálat dózisszintjeinek és a dózisszintek felosztásának kiválasztásakor.

26. A dózisszintek felosztásának kiválasztása függ a vizsgálat célkitűzéseitől és a vizsgált vegyi anyag jellemzőitől, és nem írható elő részletesen a jelen vizsgálati módszerben, ugyanakkor csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, az adagolások közötti nagyon nagy intervallumok (például körülbelül 6–10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazásával szemben pedig gyakran előnyben részesítendő egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása. A 10-nél magasabb szorzófaktorokat általában kerülni kell, és használatukat meg kell indokolni.

27. A 116. iránymutatásban részletesebben leírtak szerint (7) a dózis kiválasztásakor figyelembe veendő szempontok többek között a következők:

— ismert vagy feltételezett nemlinearitások vagy elhajlási pontok a dózis-válasz görbén,

— toxikokinetika, valamint azok a dózistartományok, amelyek esetében a metabolikus indukció, a telítettség vagy a külső és belső dózisok közötti nemlinearitás előfordul, vagy nem fordul elő,

— prekurzor elváltozások, hatásmarkerek vagy a főbb mögöttes biológiai folyamatok működésének mutatói,

▼M4

— a hatásmechanizmus főbb (vagy feltételezett) aspektusai, például azok a dózisok, amelyeknél megjelenik a citotoxicitás, felborulnak a hormonszintek és a homeoszatikus mechanizmusok stb.,

— a dózis-válasz görbe azon területei, ahol különösen pontos becslés szükséges, például a várt BMD vagy egy feltételezett küszöbérték tartományában,

— a várható humán expozíciós szintek figyelembevétele, különösen a közepes és alacsony dózis kiválasztása során.

28. Kontrollcsoportként egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgált vegyi anyag beadásához vivőanyagot használunk, egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport alkalmazandó. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgált vegyi anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a vivőanyagot a dóziscsoportokban alkalmazott legnagyobb mennyiségben kell beadni. Ha a vizsgált vegyi anyagot a táplálékkal adjuk be, és emiatt a táplálékfogyasztás a táplálék lecsökkent ízletessége miatt jelentősen csökken, hasznos lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazása a megfelelőbb kontroll biztosítása érdekében.

A dózisok előkészítése és a vizsgált vegyi anyag beadása

29. A vizsgált vegyi anyagot általában orálisan, a takarmánnyal vagy az ivóvízzel, vagy gyomorszonda segítségével adjuk be. A bejuttatás útvonalára és módjára vonatkozó további információk a 116. iránymutatásban találhatók (7). A bejuttatás útvonala és módja függ a vizsgálat céljától, a vizsgált vegyi anyag fizikai/kémiai tulajdonságaitól, biológiai hozzáférhetőségétől, valamint az emberi expozíció meghatározó útvonalától és módjától. A bejuttatás útvonalának és módjának kiválasztását indokolni kell. Állatjóléti okokból gyomorszonda rendszerint csak olyan hatóanyagoknál alkalmazandó, amelyek esetében a bejuttatásnak ez az útvonala és módja ésszerűen tükrözi a lehetséges humán expozíciót (például gyógyszerek esetében). A táplálékban vagy környezetben előforduló vegyi anyagok, többek között a növényvédő szerek esetében a beadás jellemzően a táplálékon vagy az ivóvízen keresztül történik. Néhány forgatókönyv, például a munkahelyi expozíció esetében ugyanakkor a beadás egyéb útvonalai megfelelőbbnek bizonyulhatnak.

30. A vizsgált vegyi anyagot szükség esetén feloldjuk vagy szuszpendáljuk alkalmas vivőanyagban. Adott esetben figyelembe kell venni a vivőanyag és más adalékanyagok következő tulajdonságait: a vizsgált vegyi anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszamaradására gyakorolt hatások, a vizsgált vegyi anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt azon hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit, valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. Lehetőség szerint elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (például kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A vizsgált vegyi anyag beadási körülmények közötti (például takarmánnyal történő beadás során fennálló) stabilitására és (adott esetben) a beadáshoz használt oldatok vagy takarmányok homogenitására vonatkozó információknak rendelkezésre kell állniuk.

31. A takarmánnyal vagy ivóvízzel adagolt vegyi anyagok esetében fontos biztosítani, hogy a vizsgált vegyi anyag beadott mennyisége ne zavarja meg a szokásos táplálékfelvételt vagy a vízháztartás egyensúlyát. A takarmánnyal történő beadást alkalmazó hosszú távú toxicitási vizsgálatok esetében a takarmányban lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációja a kiegyensúlyozatlan táplálkozás elkerülése érdekében általában nem haladhatja meg a teljes takarmány 5 %-át. Ha a vizsgált vegyi anyagot a takarmányba keverve adjuk be, akkor vagy állandó takarmánykoncentráció (mg/takarmánykilogramm vagy ppm), vagy az állatok testsúlyára heti rendszerességgel kiszámított állandó dózisszint (mg/testsúlykilogramm) alkalmazható. A kiválasztott alternatívát meg kell nevezni.

▼M4

32. Orális úton történő beadás esetén a vizsgált vegyi anyagot naponta kell az állatoknak beadni (heti hét napon keresztül) 12 hónapon (krónikus toxicitási fázis) vagy 24 hónapon át (karcinogenitási fázis), lásd még a 33. és a 34. bekezdést. Bármely más adagolási rendszer – például heti öt napon történő beadás – használatát indokolni kell. Dermális úton történő beadás esetén az állatokat az e melléklet B.9. fejezetében meghatározottak szerint általában legalább napi 6 órán keresztül, heti 7 napon kell a vizsgált vegyi anyaggal kezelni 12 hónapon (krónikus toxicitási fázis) vagy 24 hónapon át (karcinogenitási fázis). Az inhaláció útján történő expozíciót napi 6 órán keresztül, heti 7 nap kell elvégezni, de indokolt esetben heti 5 napos expozíció is alkalmazható. Az expozíció időtartama általában 12 hónap (krónikus toxicitási fázis) vagy 24 hónap (karcinogenitási fázis). Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A napi 6 óránál rövidebb expozíciós időtartam alkalmazását indokolni kell. Lásd még e melléklet B.8. fejezetét (9).

33. Ha a vizsgált vegyi anyagot szondán át adagoljuk, a dózist mindig a nap hasonló időszakában, gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át kell beadni az állatoknak. Általában egyetlen dózist kell beadni naponta egyszer; abban az esetben, ha a vegyi anyag például helyi irritációt okoz, a napi dózisarány fenntartható lehet elosztott (napi kétszeri) beadással. Az egy alkalommal beadható folyadék maximális mennyisége a kísérleti állat méretétől függ. A mennyiséget a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, és rágcsálók esetében általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 testsúlygramm térfogatot (31). A koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni. A fentiek alól kivételt jelentenek az esetlegesen maró vagy irritatív hatást kiváltó anyagok, amelyeket hígítani kell a súlyos helyi hatások elkerülése érdekében. Kerülni kell az emésztőrendszerben valószínűsíthetően maró vagy irritatív hatást kiváltó koncentrációkkal történő vizsgálatokat.

A vizsgálat időtartama

34. Az adagolási időszak és a vizsgálat krónikus toxicitási fázisának időtartama általában 12 hónap, bár a vizsgálati terv az adott szabályozási rendszer követelményeitől vagy bizonyos mechanisztikai céloktól függően lehetővé teszi a rövidebb (például 6 vagy 9 hónapos) vagy hosszabb (például 18 vagy 24 hónapos) időtartamú vizsgálatokat, illetve alkalmazható ilyen időtartamú vizsgálatok során is. A 12 hónapos expozíciós időtartamtól való eltérést indokolni kell, különösen a rövidebb időtartamok esetében. Az ehhez a fázishoz hozzárendelt összes dóziscsoportot a krónikus toxicitás értékelése és a nem neoplasztikus patológiai vizsgálatok céljából meg kell szüntetni a meghatározott időpontban. A vizsgált vegyi anyag által esetlegesen okozott toxikológiai változások visszafordíthatóságának megfigyelése céljából bevont kísérő csoportokat az expozíció megszüntetését követően legalább 4 hétig, de legfeljebb a vizsgálat teljes időtartamának egyharmadáig fenn kell tartani adagolás nélkül.

35. A vizsgálat karcinogenitási fázisának időtartama rágcsálók esetében általában 24 hónap, amely a felhasznált állatok normális élettartamának legnagyobb részére kiterjed. A vizsgált állattörzs élettartamától függően rövidebb vagy hosszabb vizsgálati időtartamok is alkalmazhatók, de ezt meg kell indokolni. Bizonyos egértörzsek, például az AKR/J, a C3H/J vagy a C57BL/6J törzs esetében a 18 hónapos időtartam megfelelőbb lehet. A következőkben iránymutatás olvasható a vizsgálat idejével és befejezésével, valamint a túléléssel kapcsolatban; további, többek között a negatív karcinogenitás túlélési arányhoz viszonyított elfogadhatóságának megfontolásával kapcsolatos útmutatás a 116. iránymutatásban (7) található:

▼M4

— Meg kell fontolni a vizsgálat befejezését, ha az életben maradt állatok száma az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokban vagy a kontrollcsoportban 25 százalék alá csökken.

— Abban az esetben, ha csak a magas dózissal kezelt csoportban figyelhető meg idő előtti elhullás a toxicitás következtében, a vizsgálatot nem kell befejezni.

— Az életben maradt egyedek számát nemenként külön-külön kell figyelembe venni.

— A vizsgálat nem tarthat tovább annál a pontnál, amikor a vizsgálat révén nyert adatok már nem elegendőek a statisztikailag érvényes értékelés lefolytatásához.

MEGFIGYELÉSEK (KRÓNIKUS TOXICITÁSI FÁZIS)

36. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Általános klinikai megfigyelést naponta legalább egyszer kell végezni, lehetőleg minden nap ugyanazon időpont(ok)ban, szondával történő adagolás esetén figyelembe véve az adagolást követően várható hatások érvényesülésének csúcsidőszakát.

37. Az első expozíció előtt legalább egyszer (az egyedek közötti összehasonlítás érdekében), a vizsgálat első hetének végén, azt követően pedig havonta egyszer az összes állatot részletes klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. A megfigyelési protokollt úgy kell kialakítani, hogy az egyes megfigyelők közötti különbségek minimálisak legyenek, és függetlenek legyenek a vizsgált csoportoktól. E megfigyeléseket az állatok tartására egyébként használt ketreceken kívül, lehetőleg egy szabványos karámban, minden alkalommal a nap hasonló időszakában kell elvégezni. A megfigyeléseket gondosan fel kell jegyezni, lehetőleg a vizsgálatokat végző laboratórium által kifejezetten meghatározott pontozásos rendszer segítségével. Törekedni kell arra, hogy a megfigyelési körülmények közötti különbségek minimálisak legyenek. A feljegyzett észleléseknek ki kell terjedniük többek között a bőr, a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák állapota, a váladékok és kiválasztott anyagok előfordulása, valamint az autonóm aktivitás (például könnyezés, szőrzet felborzolódása, pupillaméret, szokatlan légzési ritmusok) tekintetében megfigyelhető változásokra. A járás, a testtartás és a kézbevételre adott reakció megváltozását, valamint a klónusos vagy tónusos görcsök, sztereotip viselkedés (például túlzott mosdás, megkergülés) vagy bármilyen bizarr viselkedésmód (például öncsonkítás, hátrafelé járás) megfigyelt eseteit is fel kell jegyezni (32).

38. A vizsgált vegyi anyag első beadását szemtükörrel vagy más, megfelelő eszközzel végzett szemészeti vizsgálat előzi meg, amelyet az összes állaton el kell végezni. E vizsgálatot a vizsgálatsorozat végén meg kell ismételni, lehetőleg az összes állaton, de legalább a magas dózissal kezelt és kontrollcsoportok tagjain. Ha a szemben a kezeléssel összefüggő elváltozást tapasztalunk, az összes állatot meg kell vizsgálni. Ha szerkezeti elemzés vagy egyéb információ szemtoxicitásra utal, a szemvizsgálatot gyakrabban kell elvégezni.

39. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges neurotoxikus hatásokat jeleztek, a vizsgálat megkezdését megelőzően, valamint a vizsgálat kezdetét követő 12. hónap végéig 3 hónapos időközönként, továbbá a vizsgálat végén (ha az tovább tart 12 hónapnál) elvégezhető a különböző típusú ingerekre (32) (például hallószervi, vizuális, önérzékelési ingerek) mutatott érzékszervi reakciók vizsgálata (33) (34) (35), a szorítás erejének értékelése (36) és a motoros aktivitás felmérése (37). A követendő eljárásokkal kapcsolatban további részletek a vonatkozó szakirodalomban találhatók. Ettől függetlenül a hivatkozottaktól eltérő alternatív eljárások is alkalmazhatók.

▼M4

40. Az olyan vegyi anyagok esetében, amelyeknél a korábbi, ismételt adagolású, 28 napos és/vagy 90 napos toxicitási vizsgálatok lehetséges immuntoxikus hatásokat jeleztek, e végpont további vizsgálatát lehet végezni a vizsgálat végén.

Testsúly, táplálék-/vízfogyasztás és táplálékhasznosítási képesség

41. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok

42. A rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében az összes vizsgált állaton (csoportonként 10 hímen és 10 nőstényen) hematológiai vizsgálatokat kell végezni a 3., 6. és 12. hónapban, valamint a vizsgálat végén (ha az hosszabb, mint 12 hónap). Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt hematológiai vizsgálat elvégzése céljából (lásd a 19. bekezdést). A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a hematológiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt.

43. Az alábbi paramétereket kell vizsgálni (38): teljes és differenciált leukocitaszám, eritrocitaszám, trombocitaszám, hemoglobinkoncentráció, hematokrit (vérsejtsüllyedés), átlagos sejttérfogat (MCV), eritrociták átlagos hemoglobintartalma (MCH), eritrociták átlagos hemoglobinkoncentrációja (MCHC), prothrombin idő, valamint aktivált parciális tromboplasztin idő. A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint egyéb hematológiai paramétereket, például Heinz-testeket vagy egyéb atipikus eritrocitamorfológiát vagy methemoglobint is lehet mérni. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ. Ha a vizsgált vegyi anyag a vérképző rendszerre hat, a retikulocitaszám és a csontvelőcitológia is feltüntethető, habár ezek vizsgálatát nem szükséges rutinszerűen elvégezni.

44. A szövetekben jelentkező fontosabb toxikus hatások és különösen a vesékre és a májra gyakorolt hatás vizsgálata érdekében a klinikai biokémiai értékek meghatározását az összes vizsgált állattól (csoportonként 10 hím és 10 nőstény egyedtől) vett vérmintákból kell elvégezni a hematológiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként. Az egereken végzett vizsgálatok esetében kísérő csoportra lehet szükség az összes előírt klinikai biokémiai vizsgálat elvégzése céljából. A nem rágcsálókon végzett vizsgálatok esetében kisebb számú (kutyákon végzett kísérleteknél például nemenként 4) állattól kell mintát venni köztes mintavételi időpontokban, valamint a vizsgálat végén, a rágcsálók esetében leírtak szerint. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a klinikai biokémiai paraméterek vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni, rágcsálók és egyéb fajok esetében sem. A

▼M4

vérvétel előtti éjszaka ajánlatos az állatokat koplaltatni (kivéve egerek esetében) ([1]). A következő paramétereket kell vizsgálni (38): glükóz, karbamid (karbamid-nitrogén), kreatinin, teljes fehérje, albumin, kalcium, nátrium, kálium, teljes koleszterin, legalább két értékelhető minta a májsejtek értékeléséhez (alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, glutamát-dehidrogenáz, teljes epesav) (39), valamint legalább két értékelhető minta a máj és az eperendszer értékeléséhez (alkáli foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, 5'-nukleotidáz, teljes bilirubin, teljes epesav) (39). A vizsgált vegyi anyag toxicitásától függően szükség szerint más klinikai kémiai paraméterek, például az éhgyomorra mért trigliceridek, bizonyos hormonok és a kolinészterázszint mérése is elvégezhető. Általánosságban elmondható, hogy rugalmas megközelítés alkalmazandó, amely az adott vizsgált vegyi anyag megfigyelt és/vagy várható hatásaitól egyaránt függ.

45. Vizeletelemzést az összes vizsgált állaton (csoportonként 10 hím és 10 nőstény egyeden), a hematológiai és klinikai kémiai vizsgálatokhoz meghatározott időközönként levett mintákon kell elvégezni. Ha a korábbi, hasonló dózisszintekkel elvégzett 90 napos vizsgálatok nem mutattak változást a vizeletelemzés vonatkozásában, a vizsgálat 3. hónapjában nem szükséges méréseket végezni. A klinikai patológiai vizsgálatra vonatkozó szakértői ajánlás a következő vizsgálandó paramétereket tartalmazza (38): küllem, mennyiség, ozmolalitás vagy fajsúly, pH-érték, összes fehérje, valamint glükóz. Az egyéb mérések közé tartozik a keton, az urobilinogén, a bilirubin és a vizeletben jelen lévő vér vizsgálata. Szükség szerint további paraméterek vizsgálatát is be lehet vezetni a megfigyelt hatás(ok) vizsgálati körének bővítése érdekében.

46. Általánosan elfogadott, hogy kutyákon végzett vizsgálatok esetében a kezelés előtt meg kell határozni a kiinduló hematológiai és klinikai biokémiai változókat, rágcsálók vizsgálatánál azonban ez nem szükséges (38). Ha azonban a rendelkezésre álló kiinduló adatok (lásd az 58. bekezdést) nem bizonyulnak elegendőnek, megfontolandó ezen adatok meghatározása.

PATOLÓGIA

Autopszia

47. Általában a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. Előírható ugyanakkor (az időközi elpusztítás céljából bevont vagy kísérő csoportoknál), hogy a mérések csak bizonyos főbb paraméterekre, például a neurotoxicitásra vagy immuntoxicitásra korlátozódjanak (lásd a 21. bekezdést). Ezeket az állatokat nem kell alávetni boncolásnak és az azt követő, a következő bekezdésekben ismertetett eljárásoknak. A jelzőállatok esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség.

([1]) Bizonyos szérum- és a plazmavizsgálatok, főleg a glükóz meghatározása esetén ajánlatos a vizsgálat előtti éjszaka koplaltatni az állatokat. Ennek fő indoka az, hogy a vizsgálatokat megelőző koplaltatás mellőzése szükségszerűen növelné a kapott eredmények variabilitását, ami így megnehezítené a kevésbé jellegzetes hatások felismerését és értelmezését. Meg kell jegyezni azonban, hogy az éjszakai koplaltatás megzavarhatja az állatok általános anyagcseréjét és – különösen azon vizsgálatok esetében, amelyeknél a vizsgált anyagot a táplálékkal adagolják – megzavarhatja a vizsgált vegyi anyagnak való napi expozíciót. Az összes állatot ugyanabban a fiziológiai állapotban kell megvizsgálni, és ezért a részletes vagy neurológiai vizsgálatokat lehetőleg más napra kell ütemezni, mint a klinikai biokémiai vizsgálatokhoz szükséges mintavételt.

▼**M4**

48. A 47. bekezdés utóbbi részében kivételként megjelölt állatokéin kívül az összes állat szerveinek súlyát meg kell mérni. Az összes állat (eltekintve az elhullásközeli állapotban lévő és/vagy a vizsgálat befejeztét megelőzően elpusztított egyedektől) mellékveséit, agyát, mellékheréit, szívét, veséit, máját, petefészkeit, lépét, heréit, pajzsmirigyét (amelyet fixálás után mérünk meg a mellékpajzsmirigyekkel együtt) és méhét megfelelően meg kell tisztítani minden rátapadt szövettől, és azok nedves súlyát a boncolást követően a lehető legrövidebb időn belül meg kell mérni, mielőtt azok kiszáradnának.

49. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (40) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigygyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]
koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag
patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

▼M4

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni, továbbá a bőrből mintát kell venni a beadás helyéről, és ezt a mintát tartósítani kell. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. (9) és B.29. fejezetében (10) tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

Kórszövettani vizsgálatok

50. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (40). Legalább a következő szöveteket kell kórszövettani vizsgálatnak alávetni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket mutató összes szövet,

— a célszöveteket, vagy azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

MEGFIGYELÉSEK (KARCINOGENITÁSI FÁZIS)

51. Rendszerint a nap elején és végén – beleértve a hétvégéket és az ünnepnapokat is – az összes állatot meg kell vizsgálni, hogy nem mutatja-e megbetegedés jeleit vagy nem hullott-e el. Ezen túlmenően az állatokat naponta egyszer meg kell vizsgálni, hogy mutatnak-e meghatározott, toxikológiai szempontból lényeges tüneteket. A gyomorszondát alkalmazó vizsgálatok esetében az állatokat közvetlenül az adagolás után meg kell vizsgálni. Külön figyelmet kell fordítani a daganatképződésre; minden, szemmel látható vagy kitapintható daganat megjelenésének idejét, helyét, méreteit, megjelenési formáját és növekedését fel kell jegyezni.

52. A kezelés kezdetekor, az első 13 hét során legalább hetente egyszer, ezután pedig legalább havonta egyszer meg kell mérni az összes állat testsúlyát. A táplálékfogyasztást és a táplálékhasznosítási képességet a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. Ha a vizsgált vegyi anyagot ivóvízzel adjuk be, a vízfogyasztást a vizsgálat első 13 hetében legalább hetente, azt követően pedig legalább havonta egyszer kell mérni. A vízfogyasztás mérését olyan vizsgálatok esetében is fontolóra kell venni, amelyek során az ivási szokások megváltoznak.

▼M4

Hematológiai, klinikai biokémiai és egyéb mérések

53. A vizsgálatból nyerhető lehető legtöbb információ megszerzése érdekében – különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos szempontok meghatározása céljából – vérminták vehetők a hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatokhoz, habár ez a vizsgálatvezető döntésén múlik. Vizeletelemzés elvégzése is célszerű lehet. Ezekről a paraméterekről a vizsgálat rendszerint 12 hónapig tartó (lásd a 34. bekezdést) krónikus toxicitási fázisában használt állatokra vonatkozó adatok szolgáltatnak információt. Az ilyen minták karcinogenitási vizsgálat részeként történő levételének értékére vonatkozó további útmutatás a 116. iránymutatásban található (7). Vérminták levétele esetén ezeket a mintákat a vizsgálati időszak végén kell levenni, közvetlenül az állatok elpusztítása előtt vagy ennek részeként. Vérmintákat meghatározott helyről kell venni, például a szívből vagy a szemgolyó mögötti üregből altatás alatt. Vérkenet is készíthető vizsgálat céljára, különösen akkor, ha a csontvelő tűnik a célszervnek, bár a vérkenetek karcinogenitási fázisban történő ilyen jellegű vizsgálatának a karcinogén/onkogén hatás meghatározása szempontjából képviselt értéke megkérdőjelezhető (38).

PATOLÓGIA

Autopszia

54. A jelzőállatok és a kísérő csoportba tartozó többi állat kivételével (lásd a 20. bekezdést) a vizsgálatokba bevont összes állatot teljes körű, beható autopsziának kell alávetni, ideértve a következők alapos vizsgálatát: a test külső felszíne, az összes testnyílás, a koponya, a mellüreg, a hasüreg és ezek tartalma. A jelzőállatok és a kísérő csoportba tartozó többi állat esetében a vizsgálatvezető döntésétől függően eseti alapú boncolásra lehet szükség. A szervek súlyának mérése általában nem képezi a rákkeltő hatás meghatározására irányuló vizsgálatok részét, mivel a geriátriai változások és – a későbbi szakaszokban – a tumorok kifejlődése zavaró tényezők lehetnek a szervek súlyával kapcsolatos adatok hasznosságát illetően. Ezek a mérések azonban kritikusak lehetnek az adatok bizonyító erejének mérlegelése során és különösen a hatásmechanizmussal kapcsolatos megfontolások tekintetében. Ha a szervek súlyának mérése kísérő vizsgálat részét képezi, a mérést legkésőbb a vizsgálat megkezdése után egy évvel el kell végezni.

55. Az alábbi szöveteket a szövet típusa és a később elvégezni kívánt kórszövettani vizsgálat szempontjából legmegfelelőbb fixálóanyaggal kell tartósítani (40) (a szögletes zárójelben megadott szövetek megőrzése nem kötelező):

minden makroszkopikus elváltozás	szív	hasnyálmirigy	gyomor (előgyomor, mirigygyomor)
mellékvese	csípőbél	mellékpajzsmirigy	[fogazat]
aorta	éhbél	perifériás idegek	here
agy (beleértve a nagyagy, a kisagy és a nyúltvelő/nyúltagyi híd metszeteit)	vese	agyalapi mirigy	csecsemőmirigy
vakbél	könnymirigy (szemüregen kívüli)	prosztata	pajzsmirigy
méhnyak	máj	végbél	[nyelv]
koaguláló mirigy	tüdő	nyálmirigy	légcső
vastagbél	nyirokcsomók (felszíni és mély)	ondóhólyag	húgyhólyag

▼M4

patkóbél	emlőmirigy (nőstényeknél kötelező, hímeknél csak ha láthatóan kimetszhető)	harántcsíkolt izom	méh (beleértve a méhnyakat)
mellékhere	[felső légutak, beleértve az orrot, az orrkagylókat és az orrmelléküregeket]	bőr	[húgyvezeték]
szem (beleértve a retinát)	nyelőcső	gerincvelő (három szinten: nyaki, mellkasi középső és ágyéki szakasz)	[húgycső]
[combcsont az ízületi felülettel együtt]	[szaglógumó]	lép	hüvely
epehólyag (patkánytól eltérő fajoknál)	petefészek	[szegycsont]	metszet a csontvelőből és/vagy egy friss, csontvelőből felszívott minta
Harder-mirigy			

Páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet tartósítani kell. A klinikai és más jellegű megfigyelések alapján további testszövetek vizsgálata is szükséges lehet. A fentieken túl meg kell őrizni minden olyan más szervet is, amely a vizsgált vegyi anyag ismert tulajdonságai alapján valószínűleg célszervnek tekinthető. A dermális úton történő bejuttatást alkalmazó vizsgálatok esetében az orális módon történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni, továbbá a bőrből mintát kell venni a beadás helyéről, és ezt a mintát tartósítani kell. Inhalációs vizsgálatok esetében a légzőrendszerből származó tartósított és vizsgált szövetek felsorolásának követnie kell az e melléklet B.8. (8) és B.29. fejezetében (9) tett ajánlásokat. Egyéb szervek/szövetek esetében (valamint a légzőrendszerből származó tartósított szöveteken túl) az orális úton történő beadásnál felsorolt szerveket kell vizsgálni.

Kórszövettani vizsgálatok

56. A toxikológiai patológiai vizsgálatok elvégzésének legjobb gyakorlatára vonatkozóan iránymutatás áll rendelkezésre (40). Legalább az alábbi szöveteket kell vizsgálni:

— a magas dózissal kezelt csoportból és a kontrollcsoportokból származó összes szövet,

— a vizsgálat során elpusztult vagy elpusztított állatokból származó összes szövet,

— a makroszkopikus rendellenességeket, többek között tumorokat mutató összes szövet,

— azon szöveteket, amelyek a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a kezelésnek tulajdonítható kórszövettani elváltozásokat mutatnak, az összes többi dóziscsoport összes állatánál meg kell vizsgálni,

— páros szervek, például vesék, mellékvesék esetében mind a két szervet vizsgálni kell.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS (KARCINOGENITÁS ÉS KRÓNIKUS TOXICITÁS)

Adatok

57. Az összes értékelt paraméterre vonatkozó adatokat minden egyes állat esetében rögzíteni kell. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegezni kell, a vizsgált állatok minden csoportja tekintetében bemutatva, hogy hány egyeddel indult a vizsgálat, hány állat pusztult el, illetve hányat kellett elpusztítani humánus okokból a vizsgálat során, valamint az elpusztulás vagy humánus okokból való elpusztítás időpontját, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ideértve bármely toxikus hatás kezdetének idejét, időtartamát és súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát és az egyes elváltozástípusokat mutató állatok százalékos arányát. Az összegző adattáblázatoknak tartalmazniuk kell a toxikus hatásokat vagy elváltozásokat mutató állatokra vonatkozó átlagértékeket és szórásokat (folyamatos vizsgálati adatok esetében), valamint az elváltozások osztályozását.

58. A vizsgálat eredményeinek értékelése szempontjából hasznosak lehetnek a korábbi kontrolladatok, például abban az esetben, ha a párhuzamos kontrollokból származó adatok vélhetően lényegesen eltolódottak az ugyanabban a vizsgálati létesítményben/kolóniában lévő kontrollállatoktól származó újabb adatokhoz képest. Korábbi kontrolladatok elemzése esetén ugyanazon laboratórium által benyújtott, ugyanolyan korú és ugyanabba a törzsbe tartozó állatokra vonatkozó, az adott vizsgálatot megelőző öt évből kell származó adatokat kell felhasználni.

59. A számszerű eredményeket adott esetben megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket és az elemezendő adatokat a vizsgálat tervezése során kell kiválasztani (9. bekezdés). A kiválasztás során szükség szerint elő kell írni a túlélésre vonatkozó kiigazításokat.

60. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

— a vegyi anyag származási helye,

— gyártási szám,

— kémiai elemzésről szóló tanúsítvány.

Vivőanyag (ha van):

— a vivőanyag kiválasztásának indokolása (ha az nem víz).

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs, és a választás indokolása,

— az állatok száma, életkora és neme a vizsgálat kezdetekor,

— az állatok származása, tartási körülmények, takarmány stb.,

— az egyes állatok testsúlya a vizsgálat kezdetekor.

▼M4

Vizsgálati körülmények:

— a beadási mód és a dózis kiválasztásának indokolása,

— az adatok elemzéséhez adott esetben használt statisztikai módszerek,

— a vizsgált vegyi anyag formulázására/a takarmány előkészítésére vonatkozó részletes adatok,

— a készítmény elért koncentrációjára, stabilitására és homogenitására vonatkozó analitikai adatok,

— a beadási mód és a vizsgált vegyi anyag bejuttatására vonatkozó részletes adatok,

— inhalációs vizsgálatok esetében információ arra vonatkozóan, hogy a bejuttatás csak orron vagy a teljes testfelületen keresztül történt-e,

— tényleges dózisok (mg/testsúlykilogramm/nap), valamint a vizsgált vegyi anyagnak a takarmányban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (mg/kg vagy ppm) a tényleges dózisra való átszámításhoz használt átszámítási tényező, ha ez alkalmazható,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok.

Eredmények (az adatok táblázatos összefoglalását és az egyes állatokra vonatkozó adatokat is meg kell adni):

Általános

— túlélési adatok,

— testsúly/testsúlyban bekövetkezett változások,

— takarmányfogyasztás, a táplálékhasznosítási képességgel kapcsolatos számítások, ha vannak, valamint adott esetben vízfogyasztás,

— toxikokinetikai adatok, ha rendelkezésre állnak,

— oftalmoszkópia (ha rendelkezésre áll),

— hematológia (ha rendelkezésre áll),

— klinikai kémia (ha rendelkezésre áll).

Klinikai leletek

— toxicitási tünetek,

— az esetleges rendellenességek előfordulása (és – ha pontozzuk – azok súlyossága),

— a megfigyelt klinikai tünetek jellege, súlyossága és időtartama (átmeneti vagy állandó).

Boncolási adatok

— testsúly elpusztuláskor,

— szervek súlya és ezek aránya, ha alkalmazható,

— boncolási eredmények; rendellenességek előfordulása és súlyossága.

Kórszövettani vizsgálatok

— nem neoplasztikus kórszövettani leletek,

— neoplasztikus kórszövettani leletek,

▼M4

— a makroszkopikus és mikroszkopikus vizsgálatok leletei közötti összefüggés,

— a kezeléssel összefüggő összes kórszövettani lelet részletes leírása, beleértve a súlyossági fokokat,

— a tárgylemezek szakértői felülvizsgálatáról szóló jelentés.

Az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható

Az eredmények tárgyalása, beleértve a következőket:

— az esetlegesen alkalmazott modellezési megközelítések tárgyalása,

— dózis-válasz összefüggések,

— korábbi kontrolladatok,

— a hatásmechanizmusra vonatkozó bármely információ figyelembevétele,

— BMD, NOAEL vagy LOAEL meghatározása,

— humán relevancia.

Következtetések

SZAKIRODALOM

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, 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) E melléklet B.27., Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat, 90 napos, ismételt adagolású orális toxicitási vizsgálat nem rágcsálókon című fejezete.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at 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) E melléklet B.8., Szubakut inhalációs toxicitás: 28 napos vizsgálat című fejezete.

(10) E melléklet B.29., Szubkrónikus inhalációs toxicitás: 90 napos vizsgálat című fejezete.

(11) E melléklet B.9., Ismételt adagolású (28 napos) toxicitás (dermális) című fejezete.

▼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 and 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 and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 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) Az Európai Parlament és a Tanács 2010. szeptember 22-i 2010/63/EU irányelve a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről HL L 276., 2010.10.20., 33. o.

(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. 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. Appéldául 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. & Appéldául Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. 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**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼B

B.34. **EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincsenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta szájon át, fokozatosan növekvő adagokban adjuk be több kísérleti állatcsoportnak, hímeknek és nőstényeknek. A hímeknek a növekedés ideje alatt és legalább egy teljes csírasejtképzési cikluson keresztül (egérben megközelítőleg 56 nap, patkányban 70 nap) kell adni a vizsgált anyagot, hogy annak a csírasejtképzésre gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen.

A szülői (P) nemzedék nőstényeinek legalább két teljes párzási időszakon keresztül kell adagolni a vizsgált anyagot, hogy annak az ivarzási ciklusra gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen. Ezután a kísérleti állatokat pároztatják. A vizsgált anyagot a párzási időszak alatt mindkét nemnek adagolni kell, azt követően csak a nőstényeknek a vemhesség ideje alatt, valamint a szoptatás időszakában. Az anyag inhalációs adagolásához a módszer módosítást igényel.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Nincsenek.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. A vizsgált anyag ajánlott adagolási módja: a takarmánnyal vagy az ivóvízzel. Más alkalmazási módok is elfogadhatók. A vizsgált anyagokat valamennyi állatnak azonos módszerrel kell adagolni a vizsgálat teljes időtartama alatt. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más adalékanyagot használnak, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással.

Az adagolást heti hét napon kell végezni.

▼B

1.6.2. *A kísérlethez felhasznált állatok*

A faj kiválasztása

A javasolt faj a patkány vagy az egér. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges állatokat kell használni. Ne használjunk rossz termékenységű törzseket. Az állatokat faj, törzs, nem, súly és/vagy kor szerint kell jellemezni.

A termékenység megállapítása érdekében mind a hím, mind a nőstény állatokat meg kell vizsgálni. Mind a kontroll-, mind a kísérleti csoportban csak az elválasztást követően lehet megkezdeni a vizsgált anyag adagolását.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási és kontrollcsoportnak elegendő állatot kell tartalmaznia ahhoz, hogy legalább 20 vemhes, illetve az elléshez közel álló nőstény legyen benne.

A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhességet és utódot hozzanak létre ahhoz, hogy felmérhessük az anyag hatását a termékenységre, a vemhességre és az anyai viselkedésre a szülői (P) nemzedékben, valamint a szopásra, a növekedésre és a fejlődésre az F1 utódnemzedékben a fogamzástól a szoptatástól való elválasztásig.

1.6.3. *Vizsgálati körülmények*

Annyi élelmet és vizet kell adni, amennyire csak szükség van (ad libitum). Az ellés előtt a vemhes nőstényeket el kell különíteni, elletőketrecekbe kell rakni, és az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal is el lehet látni.

1.6.3.1. Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. Ha az anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, akkor a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia. Ha a vizsgált anyag csökkent táplálékfelvételt, illetve táplálékhasznosítást vált ki, szükség lehet egy korlátozott etetéssel tartott kontrollcsoport beállítására. Ideális esetben, ha azt a vizsgált anyag biológiai, illetve fizikokémiai tulajdonságai lehetővé teszik, a legnagyobb adaggal kezelt csoport szülő állataiban (P) ugyan jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, de elhullásnak nem. A közepes adaggal kezelt csoport(ok)ban a vizsgált anyagnak tulajdonítható toxikus hatás minimális jeleinek kell megjelenni, és az alacsony adaggal kezelt csoportban az anyag nem okozhat észrevehető kedvezőtlen hatást sem a szülőknél, sem az utódoknál. Ha az állatok gyomorszondával vagy kapszulában kapják az adagot, azt az adott állat testsúlyára számítva kell adni, és azt hetente a testsúly változásaihoz kell igazítani. A vemhesség alatt a nőstények adagja szükség esetén a vemhesség nulladik, illetve hatodik napján mért testsúlyra számítható ki.

1.6.3.2. Határérték-vizsgálat

Alacsony toxicitású anyagoknál, ha az 1 000 mg/testsúlykilogramm, illetve az azt meghaladó dózis nem okoz semmilyen zavart a szaporodási képességben, a többi adagolási szinten végzett vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők. Ha a nagy dózissal kezelt csoportban az anyára gyakorolt toxikus hatást egyértelműen mutató előzetes vizsgálatban nem volt észlelhető kedvezőtlen hatás a termékenység vonatkozásában, akkor a többi adagolási szinten végzett vizsgálat szükségtelennek tekinthető.

▼B

1.6.3.3. A kísérlet végrehajtása

Vizsgálati ütemterv

A szülői (P) nemzedék hímjeinél a napi adagolást az állatok öt- és kilenchetes kora között kell megkezdeni, miután a szoptatott állatokat elválasztották, és legalább öt napon keresztül a vizsgálati körülmények mellett tartották. A patkányoknál az adagolást a párzási időszak előtt 10 héten át kell folytatni (egér esetében ez az idő nyolc hét). A hímeket vagy a párzási időszakot követően kell elpusztítani és megvizsgálni, vagy a vizsgálati étrend mellett kell azokat tovább tartani egy esetleges második alom létrehozásához, majd nem sokkal a vizsgálat vége előtt kell elpusztítani és megvizsgálni. A szülői nemzedék (P) nőstényeinél az ötnapos szoktatást követően kell megkezdeni a vizsgált anyag adagolását, és legalább a párzást két héttel megelőző időpontig kell folytatni. A P nőstényeknél a napi adagolást folytatni kell az egész, háromhetes párzási időszak során és a vemhesség alatt, amíg az F1 utódnemzedéket el nem választjuk. Az adagolás ütemezése szükséges lehet akkor, ha más információ is rendelkezésre áll a vizsgált anyagról, például annak anyagcserefokozó hatásairól vagy biológiai felhalmozódásáról.

Pároztatás

A reprodukciós toxicitásvizsgálatokban vagy 1:1 (egy hím-egy nőstény) vagy 1:2 (egy hímkét nőstény) párosítást alkalmazhatunk.

Az 1:1 arányú pároztatás esetén egy nőstényt addig kell ugyanazon hímmel együtt tartani, míg teherbe nem esett, vagy három hét időtartamig. A nőstényt minden reggel megvizsgáljuk a sperma vagy a hüvelydugó jelenléte szempontjából. A vemhesség nulladik napjának azt a napot tekintjük, amikor a hüvelydugó vagy a sperma megtalálható.

A sikertelen párokat megvizsgálják annak megállapítása érdekében, hogy mi az oka a terméketlenségnek.

Ez adott esetben azt jelentheti, hogy tovább kell pároztatni az állatot olyan hímekkel vagy anyaállatokkal, amelyek termékenységéről már meggyőződtek, illetve a szaporítószerveket mikroszkóppal megvizsgálják, illetve az ivarzási ciklust vagy az ondóképződést ellenőrzik.

Alomszám

A termékenységi vizsgálat alatt kezelt állatokat a szokványos módon hagyják megelleni, és bárminemű külső beavatkozás nélkül hagyják, hogy utódaikat az elválasztásig neveljék.

Ha standardizálunk, az alábbi eljárás javasolt. Az ellés utáni első és negyedik nap között módosíthatjuk az egyes almok egyedszámát a létszám fölötti kölykök eltávolításával, hogy az eredmény – amennyire lehetséges – almonként négy hím és négy nőstény utód legyen.

Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például öt hím és három nőstény). A nyolcnál kevesebb egyedet számláló almokban a kiegyenlítés nem lehetséges.

▼B

1.6.4. *Megfigyelések*

A vizsgálati időszak folyamán minden állatot naponta legalább egyszer meg kell figyelni. Feljegyzést kell készíteni a lényeges magatartászavarokról, az elhúzódó vagy nehéz ellés jeleiről, valamint a toxikus hatásra utaló minden egyéb tünetről, beleértve az elhullást is. A pároztatás előtt és a pároztatási időszak alatt a takarmányfogyasztást naponta kell mérni. Az ellés után és a szoptatás alatt a takarmányfogyasztás mérését (és az ivóvízfogyasztás mérését, ha a vizsgált anyagot az ivóvízben adtuk be) ugyanazon a napon kell elvégezni, mint az utódok testsúlymérését. A P generáció hímjeinek és nőstényeinek testsúlyát az adagolás megkezdésének napján kell megmérni, és ezt követően hetente meg kell ismételni a mérést. E megfigyeléseket minden felnőtt állatnál egyedenként kell rögzíteni.

A terhességi (gesztációs) időszakot a vemhesség nulladik napjától kell számolni. Minden utódot az ellést követően a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni, és meg kell állapítani a kicsinyek számát és nemét, a halvaszületések arányát, valamint a durva rendellenességek jelenlétét.

A halva született és a negyedik napig elpusztított utódokat meg kell őrizni, és meg kell vizsgálni az esetleges születési rendellenességek szempontjából. Az élő utódokat az ellést követő reggelen meg kell számolni és testsúlymérést is kell végezni, majd ezt meg kell ismételni előbb a negyedik és hetedik napon, majd a vizsgálat végéig hetente, egyedileg mérve az állatokat.

Az anyaállatokon vagy az utódokon észlelt fizikai és magatartásbeli rendellenességeket fel kell jegyezni.

1.6.5. *Kórtan*

1.6.5.1. Autopszia

A P generációhoz tartozó állatokat, ha azokat elpusztítják, illetve azok elpusztulnak a vizsgálat során, makroszkópos vizsgálatnak kell alávetni rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat keresve, különös tekintettel a szaporodási rendszer szerveire. Az elhullott, illetve haldokló kicsinyeket a rendellenességek szempontjából kell megvizsgálni.

1.6.5.2. Kórszövettan

A P generációhoz tartozó állatok petefészkeit, méhét, méhnyakát, hüvelyét, heréit, mellékheréjét, ondóhólyagját, prosztatáját, alvadékképző mirigyét, agyalapi mirigyét és cél szervét/cél szerveit el kell tenni mikroszkópos vizsgálatok céljaira. Abban az esetben, ha más, többféle dózissal végzett vizsgálatokban e szerveknek a vizsgálata nem történt meg, akkor valamennyi nagy adaggal kezelt és kontrollállat szóban forgó szerve esetében el kell végezni a mikroszkópos vizsgálatot, és – ha a gyakorlatban megoldható – ugyanez vonatkozik a menet közben elpusztult állatokra is.

Azon szerveket, amelyek az említett állatokban rendellenességeket mutatnak, a továbbiakban az összes többi P állatban is meg kell vizsgálni. Ezen esetekben az összes olyan szövetet mikroszkópos szövettani vizsgálatnak kell alávetni, amelyeken feltűnő kóros elváltozások mutatkoztak. Amint az a pároztatási eljárások ismertetése során javasolt volt, a feltehetően terméketlen állatok szervei esetében is elvégezhető a mikroszkópos vizsgálat.

▼B

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a termékeny hím állatok számát, a vemhes nőstények számát, az elváltozások típusait és az egyes elváltozási fajtákat mutató állatok százalékos arányát.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— felhasznált faj, törzs,

— a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és az életképességet is,

— az elhullás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e az elpusztítás tervezett időpontját, illetve a vizsgálat végét,

— egy táblázat az utódok súlyáról, a kicsinyek átlagos súlyáról, valamint a vizsgálat végén az egyes utódok súlyáról,

— a szaporodásra, az utódokra, illetve a születés utáni fejlődésre gyakorolt toxikus és egyéb hatások leírása,

— az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

— testsúlyadatok a P generációnál,

— boncolási leletek,

— valamennyi mikroszkópos lelet részletes leírása,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

— az eredmények megvitatása,

— az eredmények értelmezése.

3.2. ÉRTÉKELÉS ÉS ÉRTELMEZÉS

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

▼B

B.35. KÉTGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 416 (2001) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

E kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálati módszer segítségével általános információk nyerhetők egy vizsgálandó anyagnak a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, ezen belül az ivarmirigyek működésére, az ivari ciklusra, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a vemhességre, az ellésre, a szoptatásra és az elválasztásra, valamint az utódok növekedésére és fejlődésére gyakorolt hatásaival kapcsolatosan. A vizsgálat emellett információkat nyújthat a vizsgálandó anyagnak az újszülött kori morbiditásra, mortalitásra gyakorolt hatásaival kapcsolatosan, előzetes adatokat szolgáltathat a prenatális és posztnatális fejlődési toxicitásról, illetve útmutatóként szolgálhat a későbbi vizsgálatokhoz is. Az F1 generáció növekedésének és fejlődésének tanulmányozásán kívül e vizsgálati módszer segítségével a hím és női szaporítórendszer épsége és teljesítőképessége, valamint az F2 generáció növekedése és fejlődése is tanulmányozható. A fejlődési toxicitással és a funkcionális defektusokkal kapcsolatban további információk úgy szerezhetők, ha ezt az eljárást adott esetben a fejlődési toxicitási és/vagy fejlődési neurotoxicitási módszereket segítségül híva további vizsgálati protokollokkal egészítik ki, de az említett végpontok a megfelelő vizsgálati módszerek alkalmazásával külön vizsgálatokban is tanulmányozhatók.

1.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A P generációba tartozó hímeknek egyrészt a növekedés során, másrészt legalább egy teljes spermaképződési ciklus során (egérben körülbelül 56 nap, patkányban pedig körülbelül 70 nap) kell adagolni az anyagot ahhoz, hogy bármilyen, a spermaképződésre gyakorolt káros hatást ki lehessen váltani. A spermára gyakorolt hatásokat egy sor spermaparaméter (pl. spermamorfológia és -motilitás), valamint szövetpreparátumok és részletes kórszövettani vizsgálatok segítségével kell meghatározni. Ha rendelkezésre állnak megfelelő időtartamú, pl. legalább 90 napos ismételt dózisú vizsgálatokból származó, a spermaképződéssel kapcsolatos adatok, a P generációba tartozó hímeket nem kell bevonni az értékelésbe. A spermamintákat vagy az azokról készült digitális felvételeket azonban ajánlatos az esetleges későbbi értékelések céljára megőrizni, illetve elmenteni. A P generációba tartozó nőstényeknek egyrészt a növekedés során, másrészt több teljes ivari ciklus során kell adagolni a vizsgálandó anyagot ahhoz, hogy észlelhetők legyenek az ivari ciklus szabályosságára kifejtett esetleges káros hatások. A vizsgálandó anyagot a párzás és az ennek eredményeként létrejövő vemhesség során, sőt egészen az F1 utódok elválasztásának ideje alatt is kell adagolni a szülőknek (azaz a P generációba tartozó állatoknak). Az elválasztáskor a kezelést az F1 utódokon kell folytatni, egészen felnőtté válásukig, párzásukig, illetve az F2 generáció létrejöttéig, amíg meg nem történik az F2 generáció elválasztása.

Minden állaton klinikai megfigyeléseket és kórbonctani vizsgálatokat kell végezni a toxicitás jeleinek kimutatása érdekében, és külön hangsúlyt kell fektetni a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, valamint az utódok növekedésére és fejlődésére.

▼B

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.3.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A vizsgálatok céljára a preferált állatfaj a patkány. Ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell, és a megfelelő módosításokra is szükség lesz. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevéssé termékenyek, vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. A vizsgálat megkezdésekor az egyes kísérleti állatok testtömegének csak minimális mértékben szabad különböznie egymástól, és egyik ivar esetében sem térhet el 20 %-nál magasabb mértékben az ivar átlagától.

1.3.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását az is befolyásolhatja, hogy ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal adják be, akkor azok megfelelő módon keveredjenek el egymással.

Az állatok egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is tarthatók. A pároztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Ha meggyőződtek a párzás megtörténtéről, a pároztatott nőstényeket egyedileg kell elhelyezni ellető vagy fiaztató ketrecekben. A pároztatott patkányokat kis csoportokban is lehet tartani, de az ellés előtt egy vagy két nappal külön kell választani őket. Az ellés közeledtével a pároztatott állatok számára megfelelő és meghatározott fészekrakó anyagot kell biztosítani.

1.3.3. **Az állatok előkészítése**

Legalább 5 napon át a laboratórium körülményeihez szoktatott, egészséges állatokat kell alkalmazni, amelyek korábban nem voltak más kísérletnek alanyai. A kísérleti állatok jellemzésekor meg kell adni az állat faját, törzsét, származását, ivarát, testtömegét és/vagy életkorát. Ismerni kell, hogy mely állatok között áll fenn testvéri viszony, hogy elkerülhető legyen ezek pároztatása. Az állatokat véletlenszerűen kell beosztani a kontroll- és a kezelési csoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezése jelentette lehetséges hatásokat. Minden állatot egyedi azonosító számmal kell ellátni. A P generáció esetében ezt még a kezelés megkezdése előtt meg kell tenni. Az F1 generáció esetében a későbbi pároztatásra kiválasztott állatokat az elválasztáskor egyedi azonosítóval kell ellátni. Minden kiválasztott F1 állat esetében meg kell őrizni azokat az adatokat, amelyek rögzítik, hogy az állat melyik alomból származik. Ha az utódok testtömegének mérését vagy bármely más funkcionális vizsgálat elvégzését is fontolóra veszik, akkor ajánlatos a születés után a lehető leghamarabb azonosítóval ellátni a kölyköket.

A kezelés megkezdésekor a szülőknek (P generáció) körülbelül 5–9 hetesnek kell lenniük. Amennyire csak megoldható, az állatoknak az összes vizsgálati csoportban nagyjából azonos testtömegűnek és korúnak kell lenniük.

▼B

1.4. ELJÁRÁS

1.4.1. **Az állatok száma és ivara**

Minden kezelési és kontrollcsoportban elegendő számú állatnak kell lennie ahhoz, hogy az elléskor vagy akörül lehetőleg legalább 20 vemhes nőstény tartozzon egy-egy csoportba. A kezeléssel összefüggésben nemkívánatos hatásokat (pl. sterilitást vagy magas dózisban túlzott toxicitást) kiváltó anyagok esetében előfordulhat, hogy ezt nem lehet megoldani. A cél az, hogy elegendő számú vemhesség jöjjön létre az anyagnak a termékenységre, a vemhességre, az anyai viselkedésre és szoptatásra, az F1 utódoknak a fogantatástól az ivarérettségig történő növekedésére és fejlődésére, valamint az F2 utódoknak az elválasztásig tartó időszakban történő fejlődésére gyakorolt esetleges hatások értékeléséhez. Nem feltétlenül teszi érvénytelenné tehát a vizsgálatot az, ha nem lehet megoldani, hogy a kívánt számú (azaz 20) vemhes állat álljon rendelkezésre, és ennek jelentőségét minden egyes esetben külön-külön kell értékelni.

1.4.2. **A dózisok előkészítése**

A vizsgálandó anyagot ajánlatos orálisan adagolni (a táplálékkal, az ivóvízzel vagy mesterséges táplálással), kivéve, ha más beadási módot (pl. dermális vagy inhalálásos alkalmazást) tartanak megfelelőbbnek.

Ahol szükséges, a vizsgálandó anyagot megfelelő vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni. Ahol lehet, elsősorban vizes oldatot/-szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikus jellemzőit. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálandó anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban.

1.4.3. **Adagolás**

Legalább három dózist és ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. Hacsak a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy toxicitást idézzen elő, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést. Váratlan elhullások esetén, ha a szülői (P) generáció elhullási aránya alacsonyabb, mint körülbelül 10 százalék, a vizsgálat még általában elfogadható. A dózisok csökkenő sorrendjét úgy kell megválasztani, hogy kimutathatók legyenek az esetleges dózisfüggő hatások és a nem észlelhető káros hatás szintje (NOAEL). A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. A táplálékkal való beadást alkalmazó vizsgálatok esetében a dózisintervallum nem lehet háromszorosnál nagyobb. A dózisszinteket a korábbi toxicitási adatok és különösen az ismételt dózisú vizsgálatok eredményeinek figyelembevételével kell megválasztani. A vizsgálandó vegyület és a szerkezetileg rokon anyagok metabolizmusával és kinetikájával kapcsolatban rendelkezésre álló összes információt is figyelembe kell venni. Ezek az információk segítik majd az adagolási rend megfelelő voltának igazolását is.

▼B

A kontrollcsoport egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálandó anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot. Ha a vizsgálandó anyagot a táplálékkal adják be, és emiatt csökken a táplálékfogyasztás vagy hasznosítás, akkor szükség lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazására is. A párhuzamos párban etetett kontrollcsoport helyett felhasználhatók olyan kontrollcsoportokkal végzett vizsgálatokból származó adatok is, amelyek célja a csökkent táplálékfogyasztás reproduktív paraméterekre gyakorolt hatásának értékelése.

A vivőanyagok vagy egyéb adalékok esetében a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

1.4.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat sem a szülőkben, sem utódaikban nem idéz elő észlelhető toxicitást, és ha a szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás, megfontolható a több dózisszinttel végzett teljes vizsgálat elhagyása. Határérték-vizsgálatot kell minden esetben alkalmazni, kivéve, ha a humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi szükségessé. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságai – így például oldhatósága – gyakran előre jelezhetik, illetve korlátozhatják a lehetséges expozíciós szint maximumát.

1.4.5. **A dózisok beadása**

Az állatoknak a hét minden napján adagolni kell a vizsgálandó anyagot. A preferált beadási mód az orális (táplálékkal, ivóvízzel vagy mesterséges táplálással történő bevitel). Az ettől eltérő beadási módok használatát meg kell indokolni, és ennek megfelelő módosításokra is szükség lehet. A megfelelő hosszúságú kísérleti időszak során minden állatnak azonos módszerrel kell beadni az anyagot. Ha a vizsgálandó anyagot mesterséges táplálással juttatják be, gyomorszondát kell alkalmazni. Az egyszerre beadott folyadéktérfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömegarányt (kukoricacsíra-olajban történő adagolás esetén a maximum a 0,4 ml/100 g testtömegarány), kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. Az irritáló vagy korróziós hatású anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációt kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani. A mesterséges táplálást alkalmazó vizsgálatokban a kölykök általában mindaddig csak közvetve, az anyatejen keresztül kapják a vizsgálandó anyagot, amíg az elválasztáskor meg nem kezdődik a közvetlen adagolás. A táplálékkal vagy ivóvízzel történő adagolást alkalmazó vizsgálatok esetében a kölykök közvetlenül is megkapják a vizsgálandó anyagot, amikor a szoptatási időszak utolsó hetében önállóan is elkezdenek táplálkozni.

▼B

A táplálékkal vagy ivóvízzel bejuttatott anyagok esetében fontos, hogy a vizsgálandó anyag mennyisége ne zavarja a normál táplálkozást vagy vízháztartást. Ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal juttatják be, vagy a táplálékbeli koncentrációt (ppm), vagy pedig az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát alkalmazzák. A mesterséges táplálással bejuttatott anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. A mesterséges táplálással bejuttatott és testtömegen alapuló dózis beállításakor figyelembe kell venni a méhlepénybeli eloszlással kapcsolatos információkat is.

1.4.6. **A kísérleti program**

A P generációba tartozó hímek és nőstények napi kezelését 5–9 hetes korukban kell elkezdeni. Az F1 hímek és nőstények napi kezelését az elválasztáskor kell elkezdeni; nem szabad megfeledkezni arról, hogy ha vizsgálandó anyagot táplálékkal vagy ivóvízzel adagolják, az F1 utódok közvetlen expozíciója már a szoptatási időszakban megkezdődhet. Az adagolást mindkét ivar (P és F1) esetében legalább 10 héten át folytatni kell a párzási időszak előtt. Az adagolást a 2 hetes pároztatási időszakban sem szabad abbahagyni egyik ivar esetében sem. Amikor a reproduktív hatások értékelése szempontjából már nincs szükség a hím állatokra, humánus módon exterminálni kell őket, és megvizsgálni. A szülői (P) generációba tartozó nőstények esetében az adagolást a vemhesség ideje alatt is folytatni kell, egészen az F1 generáció elválasztásáig. Fontolóra kell venni az adagolási rend módosítását a vizsgálandó anyaggal, ezen belül a meglévő toxicitási adatokkal, az anyagcsere fokozódásával vagy biológiai felhalmozódással kapcsolatban rendelkezésre álló információk alapján. Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömegmérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó trimeszterében azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor.

A P és F1 hímek és nőstények kezelését exterminálásukig kell folytatni. Minden felnőtt P és F1 hímet és nőstényt humánus módon exterminálni kell, ha már nincs rájuk szükség a reproduktív hatások értékeléséhez. Az elválasztás után a pároztatásra ki nem választott F1 utódokat és minden F2 utódot humánus módon exterminálni kell elválasztásukat követően.

1.4.7. **A pároztatási eljárás**

1.4.7.1. *A szülői (P) generáció pároztatása*

Minden egyes pároztatáskor a nőstényt egy azonos dózissal kezelt hímmel kell összerakni (1:1 pároztatás), és addig kell együtt hagyni őket, amíg a párzás meg nem történik, vagy 2 hét el nem telik. Minden nap meg kell vizsgálni, hogy a nőstényben észlelhető-e ondó vagy hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor hüvelydugó vagy ondó figyelhető meg a nőstényben. Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra kell venni a nőstények újrapároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel. Az adatok között egyértelműen fel kell tüntetni a pároztatott párokat. Kerülni kell a testvérek pároztatását.

▼B

1.4.7.2. *F1 pároztatás*

Az F1 utódok pároztatásakor minden alomból legalább egy hím és egy nőstény állatot kell kiválasztani az elválasztáskor, hogy később egy másik alomból származó, de azonos csoportba tartozó állattal pároztatva létrejöjjön az F2 generáció. A kölykök kiválasztását minden egyes alomban véletlenszerűen kell elvégezni, feltéve, hogy nincs szignifikáns különbség az egy alomba tartozó állatok testtömege vagy külső megjelenése között. Ha azonban van különbség, akkor minden alomból a legreprezentatívabb egyedet kell kiválasztani. A gyakorlatban ezt a testtömeg alapján lehet a legjobban elvégezni, de esetenként megfelelőbb lehet a külső megjelenés alapján tenni ezt. Mindaddig nem szabad pároztatni az F1 utódokat, amíg teljesen ivaréretté nem válnak.

Az utód nélküli pároknál meg kell vizsgálni a látszólagos terméketlenség okát. Ennek keretében lehetőség biztosítható számukra más olyan hímekkel vagy nőstényekkel való párzásra, amelyeket már sikeresen pároztattak, vagy el lehet végezni a szaporítószervek mikroszkópos vizsgálatát, vagy meg lehet vizsgálni az ivari ciklust vagy a spermaképződést.

1.4.7.3. *Második pároztatás*

Bizonyos esetekben, így például ha az alomméret a kezeléssel összefüggésben megváltozik, vagy ha az első pároztatáskor nem egyértelmű hatásokat figyelnek meg, ajánlatos a felnőtt P és F1 állatokat újrapároztatni, és így egy második almot kialakítani. Ajánlatos újrapároztatni azokat a hímeket és nőstényeket is, amelyek bizonyítottan nemzőképes ellenkező nemű partnerekkel sem hoztak utódokat. Ha a két generáció bármelyikében szükségesnek látszik egy második alom kialakítása, az állatokat körülbelül egy héttel az utolsó alom elválasztása után kell újrapároztatni.

1.4.7.4. *Az alom mérete*

Hagyni kell, hogy az állatok a szokásos módon elljék és neveljék utódaikat az elválasztásig. Az alomméret standardizálása nem kötelező. Ha azonban elvégezzük a standardizálást, részletesen ismertetni kell az erre alkalmazott módszert.

1.5. MEGFIGYELÉSEK

1.5.1. **Klinikai megfigyelések**

Minden nap klinikai megfigyelést kell végezni, és a mesterséges táplálással való adagolás beadás időpontjának meghatározásakor azt is figyelembe kell venni, hogy a beadás után a hatások várhatóan mikor érik el a maximumukat. A viselkedésbeli változásokat, a nehéz vagy hosszan tartó ellés jeleit és a toxicitás minden tünetét rögzíteni kell a jegyzőkönyvben. Legalább hetente egyszer alaposabban is meg kell vizsgálni az állatokat, célszerűen akkor, amikor a testtömegmérésre kerül sor. Naponta kétszer, illetve a hétvégeken adott esetben naponta egyszer meg kell vizsgálni az állatokat megbetegedés és elhullás szempontjából.

▼B

1.5.2. **A szülők testtömege, valamint táplálék- és vízfogyasztása**

A kezelés első napján, majd azt követően legalább hetente egyszer meg kell mérni a szülők (P és Fl) testtömegét. Az anyaállatokat (P és F1) legalább a vemhesség 0., 7., 14. és 20. vagy 21. napján kell megmérni, a szoptatás időszakában pedig ugyanazokon a napokon, amikor az utódokat is megmérik, valamint az állatok exterminálásának napján is. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni. A pároztatás előtti időszakban és a vemhesség alatt legalább hetente meg kell mérni a táplálékfogyasztást. Ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adagolják, legalább hetente egyszer a vízfogyasztást is meg kell mérni.

1.5.3. **Ivari ciklus**

Az ivari ciklus hosszát és szabályosságát hüvelykenet alkalmazásával kell meghatározni a P és F1 nőstényekben a pároztatás előtt és adott esetben a pároztatás során mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy párzás történt. A hüvelyi/méhnyaki sejtek vétele során vigyázni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, és ezáltal nehogy álvemhesség alakuljon ki (1).

1.5.4. **Spermaparaméterek**

A vizsgálat befejezésekor minden P és F1 hím esetében meg kell mérni a here és a mellékhere, valamint a kórszövettani vizsgálatokra megőrzött minden szerv közül az egyiknek a tömegét (lásd 1.5.7. és 1.5.8.1. szakasz). A P és F1 hímek minden egyes csoportjából egy-egy, legalább tíz hímből álló részhalmaz esetében a megmaradó heréket és mellékheréket a homogenizálásnak ellenálló spermatidák és mellékhere farki részében tárolt ondósejtek számlálására kell felhasználni. A hímek ugyanezen részhalmazában spermát kell gyűjteni a mellékhere farki részéből vagy az ondóvezetékből, amelyet a spermamotilitás és -morfológia vizsgálatára kell felhasználni. Ha kezeléssel összefüggő hatásokat észlelnek, vagy ha más vizsgálatok eredményei a spermaképződésre gyakorolt lehetséges hatásokra utalnak, a sperma értékelését az összes dóziscsoportban minden hímben el kell végezni; egyéb esetben elegendő lehet, ha a számlálást csak a kontroll- és a magas dózissal kezelt P és F1 hímekben végzik el.

Meg kell határozni a herében lévő homogenizálásnak ellenálló spermatidák és a mellékhere farki részében található ondósejtek teljes számát (2) (3). A mellékhere farki részében lévő ondókészlet nagyságát a kvalitatív értékelésekhez használt szuszpenzióban lévő ondó koncentrációja és mennyisége, valamint a fennmaradt mellékhere farki részéből kinyert szövet ezt követő darálásával és/vagy homogenizálásával kinyert ondósejtek száma alapján lehet meghatározni. Az összes kezelési csoportban közvetlenül az exterminálás után kell elvégezni a számlálást a hímek e kiválasztott részhalmazában, kivéve, ha video- vagy digitális felvételt készítenek, vagy ha a mintákat későbbi elemzésig lefagyasztják. Ilyen esetekben a kontroll- és a magas dózissal kezelt csoportot célszerű először megvizsgálni. Ha nem észlelhető kezeléssel összefüggő hatás (pl. az ondósejtszámra, valamint a motilitásra és morfológiára gyakorolt hatás), a többi dóziscsoportot nem kell megvizsgálni. Ha a magas dózissal kezelt csoportban kezeléssel összefüggő hatásokat észlelünk, akkor az alacsonyabb dóziscsoportokat is meg kell vizsgálni.

▼B

Az exterminálás után azonnal értékelni kell vagy videofelvételen rögzíteni kell a mellékheréből (vagy ondózsinórból) kinyert ondósejtek motilitását. A spermát a károsodások minimális szintre szorítása mellett kell kinyerni, majd elfogadható módszerek segítségével kell hígítani a motilitásvizsgálathoz (4). Az előre haladó mozgást mutató ondósejtek százalékos arányát vagy szubjektíven, vagy objektíven kell meghatározni. Ha számítógéppel támogatott motilitásvizsgálatot alkalmaznak (5) (6) (7) (8) (9) (10), az előre haladó mozgás levezetése az átlagos pályasebesség és egyenes vonalú mozgás vagy lineáris index felhasználó által beállított küszöbértékein alapul. Ha a boncoláskor a mintákról videofelvételt (11) készítenek, vagy a képeket más módon rögzítik, esetleg csak a kontroll- és a nagy dózissal kezelt P és F1 hímek esetében kell további elemzést végezni, kivéve ha kezeléssel összefüggő hatásokat észlelnek; ebben az esetben ugyanis az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokat is értékelni kell. Videofelvétel vagy digitális képek hiányában a boncoláskor az összes kezelési csoportba tartozó valamennyi állat mintáját ki kell elemezni.

Egy mellékheréből (vagy ondóvezetékből) származó spermaminta morfológiai értékelését is el kell végezni. Az ondósejteket (mintánként legalább 200-at) fixált nedves preparátum (12) formájában kell megvizsgálni, és normálnak vagy rendellenesnek kell minősíteni. A morfológiai sperma-rendellenességek közé tartoznak például a fúzió, az izolált fejek és a torz fej és/vagy farok. Az értékelést a hímeknek az egyes dóziscsoportból kiválasztott részhalmazán, az állatok exterminálása után azonnal, vagy a video- vagy digitális felvételek alapján egy későbbi időpontban kell elvégezni. Fixálás után a keneteket is el lehet tenni későbbi elemzésre. Ilyen esetekben a kontroll- és magas dózissal kezelt csoportokat célszerű először megvizsgálni. Ha nem észlelnek kezeléssel összefüggő hatásokat (pl. az ondósejtek morfológiájára gyakorolt hatásokat), akkor nem kell elvégezni a többi dóziscsoport elemzését. Ha a magas dózissal kezelt csoportban kezeléssel összefüggő hatásokat tapasztalnak, akkor az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokat is ki kell értékelni.

Ha a fenti spermavizsgálati paramétereket egy legalább 90 napos szisztémás toxicitási vizsgálatban már meghatározták, akkor a kétgenerációs vizsgálatban nem kell ezt feltétlenül megismételni. A P generáció spermamintáit vagy az azokról készült digitális felvételeket azonban, ha szükséges, ajánlatos az esetleges későbbi értékelések céljára megőrizni, illetve elmenteni.

1.5.5. **Az utódok**

Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni (0. szoptatási nap) a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések és élveszületések számának, valamint a makroszkópos rendellenességeknek a megállapítására. Ha nem történt maceráció, a 0. napon elhalva talált kölykökben lehetőség szerint meg kell vizsgálni az esetleges defektusokat, és meg kell állapítani az elhullás okát, majd konzerválni kell őket. Az élő kölyköket meg kell számolni, és meg kell mérni a testtömegüket a születéskor (0. szoptatási nap), vagy az 1. napon, majd ezt követően a rendszeres testtömegmérési napokon, azaz pl. a szoptatás 4., 7., 14. és 21 napján. Az anyaállatokban vagy az utódokban megfigyelt fizikai vagy viselkedésbeli rendellenességeket is fel kell jegyezni.

▼B

Az utódok fizikai fejlődését főleg a testtömeg-gyarapodás alapján kell nyomon követni. Az egyéb fizikai paraméterek (pl. a fülek és a szemek kinyílása, fogzás, szőrnövekedés) kiegészítő információkat szolgáltathatnak, de ezeket az adatokat lehetőleg a szexuális éréssel összefüggésben kell értékelni (pl. kor és testtömeg a hüvelykinyílás vagy a makk-fityma szétválás időpontjában) (13). Ha nem történtek korábban külön ilyen vizsgálatok, akkor ajánlatos az elválasztás előtt és/vagy után funkcionális vizsgálatokat (pl. motoros aktivitás, szenzoros működés, a reflexek kifejlődése) is végezni az F1 utódokon, különösen a szexuális éréssel kapcsolatos vizsgálatokat. Az elválasztott és pároztatásra kiválasztott F1 utódok esetében meg kell határozni azt az életkort, amikor a hüvelykinyílás, illetve a fitymaelválás megtörténik. Ha az F1 generáció ivararányában vagy az ivarérés idejében észlelt változások azt indokolják, a születés utáni 0. napon meg kell mérni az anogenitális távolságot az F2 utódokban.

Kihagyhatók a funkcionális vizsgálatokból azok a csoportok, amelyek egyébként egyértelműen káros hatások tüneteit mutatják (pl. a testtömeg-gyarapodás szignifikáns lassulása stb.). Funkcionális vizsgálatok végzése esetén a pároztatásra kiválasztott kölyköket nem szabad e vizsgálatokba bevonni.

1.5.6. **Makroszkópos boncolás**

A vizsgálat befejezésekor vagy a vizsgálat során történt elhullás esetén minden szülő (P és F1 állatok), minden külső rendellenességet vagy klinikai tüneteket mutató kölyök, valamint az F1 és az F2 generációból is egy-egy véletlenszerűen kiválasztott kölyök/ivar/alom esetében makroszkópos vizsgálatot kell végezni az esetleges strukturális rendellenességek vagy kórbonctani elváltozások feltárására. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. Az elhullásközeli állapotba került, és ezért humánus módon exterminált vagy a nem macerált, elpusztult kölykökben meg kell határozni az esetleges defektusokat és/vagy az elhullás okát, majd konzerválni kell őket.

Az először ellő nőstények méhében kórszövettani értékelés nélkül kell megvizsgálni a beágyazódási helyek jelenlétét és számát.

1.5.7. **A szervek tömege**

A vizsgálat befejezésekor a P és F1 állatoknál meg kell határozni a testtömeget, valamint az alábbi szervek tömegét (a páros szervek tagjait külön-külön kell megmérni):

— méh, petefészkek,

— herék, mellékherék (teljes és farki rész),

— prosztata,

— ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel és váladékukkal, valamint a prosztata (egy egységként),

— agy, máj, vese, lép, agyalapi mirigy, pajzsmirigy és mellékvese, valamint az ismert célszervek.

Meg kell határozni a boncolásra kiválasztott F1 és F2 kölykök végső testtömegét. Az egyetlen véletlenszerűen kiválasztott kölyök/ivar/-alom (lásd 1.5.6. szakasz) esetében az alábbi szervek tömegét kell megmérni: agy, lép és csecsemőmirigy.

▼B

Ha megoldható, a makroszkópos boncolási eredményeket és a szervtömeg-adatokat a más, ismételt dózisú vizsgálatokban tett megfigyelésekkel összefüggésben kell értékelni.

1.5.8. **Kórszövettan**

1.5.8.1. *A szülőállatok*

A szülőállatokban (P és F1) a következő szerveket és szöveteket vagy az ezekből készített reprezentatív mintákat fixálni kell a kórszövettani vizsgálatokhoz, majd megfelelő közegben el kell eltárolni:

— hüvely, méh és méhnyak, valamint petefészkek (megfelelő rögzítőszerrel fixálva),

— egy here (Bouin-féle vagy hasonló rögzítőszerben tartósítva), egy mellékhere, ondóhólyagok, prosztata és koaguláló mirigy,

— a pároztatásra kiválasztott összes P és F1 állatból származó, korábban meghatározott célszerv(ek).

Minden kontroll- és nagy dózissal kezelt csoportban el kell végezni a pároztatásra kiválasztott P és F1 állatok fent felsorolt és konzervált szerveinek és szöveteinek teljes körű kórszövettani vizsgálatát. A P állatok petefészkének vizsgálata nem kötelező. A NOAEL meghatározásának elősegítése érdekében a kezeléssel összefüggő változásokat mutató szerveket az alacsony és közepes dózissal kezelt csoportokban is meg kell vizsgálni. El kell végezni továbbá azon alacsony és közepes dózissal kezelt állatok szaporítószerveinek kórszövettani vizsgálatát, amelyek gyaníthatóan csökkent termékenységgel bírnak, így például azok esetében, amelyek nem tudtak párzani, megfoganni, utódokat nemzeni vagy egészséges utódokat a világra hozni, vagy amelyeknél az ivari ciklusra vagy a spermaszámra, spermamotilitásra vagy spermamorfológiára gyakorolt hatásokat észleltek. Minden makroszkópos léziót, így például atrófiát vagy daganatot is meg kell vizsgálni.

A kezeléssel összefüggő hatások, így például a visszatartott spermatidák, hiányzó csírasejtrétegek vagy típusok, sokmagvú óriássejtek, vagy a spermaképző sejtek leválása és lumenbe kerülésének azonosítása érdekében el kell végezni a here részletes kórszövettani vizsgálatát (pl. Bouin-féle rögzítőszer, paraffinba ágyazás és 4–5 μm vastag harántmetszetek) (14). Az ép mellékhere vizsgálatának ki kell terjednie a mellékhere feji részére, testére és farki részére, amelyet egy hosszanti metszet értékelésével lehet elvégezni. A mellékherében meg kell vizsgálni a leukocita infiltrációt, a sejttípusok gyakoriságában bekövetkező változásokat, az abnormális sejttípusokat, valamint az ondósejek fagocitózisát. A hím szaporítószervek vizsgálatára PAS- és hematoxilin-festés alkalmazható.

A szoptatási időszak után a petefészeknek tüszőkezdeményeket és növekvő tüszőket kell tartalmaznia, valamint egy nagyméretű laktációs sárgatestet. A kórszövettani vizsgálat során meg kell vizsgálni a tüszőkezdemény-állomány kvalitatív deplécióját. Az F1 nőstények esetében el kell végezni a tüszőkezdemények kvantitatív értékelését is; az állatok számának, a kiválasztott petefészekmetszeteknek és -metszetmintáknak az alkalmazott értékelési eljáráshoz statisztikai szempontból adekvátnak kell lennie. A kezelt és kontrollpetefészkek összehasonlításához a vizsgálatoknak ki kell terjedniük a tüszőkezdemények összeszámlálására, amelyekhez hozzá lehet venni a kis növekvő tüszőket is (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Az elválasztott állatok*

A külső rendellenességeket vagy klinikai tüneteket mutató összes kölykök, valamint az F1 és az F2 generációból az egy véletlenszerűen kiválasztott és pároztatásra ki nem jelölt kölyök/ivar/alom makroszkóposan rendellenes szöveteit és célszerveit fixálni kell, majd megfelelő közegben el kell ezeket tárolni a kórszövettani vizsgálatokhoz. A konzervált szövetek teljes kórszövettani vizsgálatát úgy kell elvégezni, hogy külön hangsúlyt kell fektetni a szaporítószervekre.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az adatokat egyedileg kell a jelentésben rögzíteni, majd táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport és generáció esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, az elhullások és humánus okok miatti exterminálások időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a szülőkkel és az utódokkal kapcsolatos megfigyelések típusait, a kórszövettani változások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot.

A számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel kell kiértékelni; a statisztikai módszereket a vizsgálat megtervezésének keretében kell kiválasztani, és meg is kell azt indokolni. Az adatok elemzéséhez célszerű lehet dózis-válasz statisztikai modelleket alkalmazni. A jelentésnek elegendő információt kell tartalmaznia az alkalmazott elemzési módszerrel és számítógépes programmal kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, ezen belül a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálandó anyag dózisa és a rendellenességek, ezen belül a makroszkópos léziók, az azonosított célszervek, a csökkent termékenység, a klinikai rendellenességek, a csökkent reproduktív teljesítmény vagy alomszám, a testtömegváltozások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre vagy ezek hiányára. A vizsgálati eredmények értékelésekor figyelembe kell venni a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságait és az esetlegesen rendelkezésre álló toxikokinetikai adatokat is.

Egy megfelelően elvégzett reprodukciós toxicitási vizsgálat alapján kielégítő becslés tehető a hatást nem okozó szintre vonatkozóan, és megismerhetők a reprodukcióra, ellésre, szoptatásra, posztnatális fejlődésre, ezen belül a növekedésre és szexuális fejlődésre gyakorolt hatások.

▼B

2.3. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat információkkal szolgál valamely anyagnak a szaporodási ciklus összes fázisában történő, ismételt expozíciója hatásairól. A vizsgálat különösen a reproduktív paraméterekkel, valamint az utódok fejlődésével, növekedésével, érésével és túlélésével kapcsolatban ad információkat. A vizsgálat eredményeit a szubkrónikus, prenatális fejlődési, toxikokinetikai és egyéb vizsgálatok eredményeivel összefüggésben kell értelmezni. A vizsgálat eredményeit fel lehet használni annak felmérésére is, hogy szükség van-e egy vegyület további vizsgálataira. A vizsgálat eredményeinek emberre történő extrapolálása csak korlátozott mértékben érvényes. A vizsgálat leginkább arra alkalmazható, hogy információt nyerjünk a hatást nem okozó szintekkel és megengedhető humán expozícióval kapcsolatban (20) (21) (22) (23).

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és ahol fontos, fizikai-kémiai tulajdonságok,

— azonosító adatok,

— tisztaság.

Vivőanyag (ha szükséges):

— ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

— a felhasznált faj/törzs,

— az állatok száma, életkora és ivara,

— származás, tartási körülmények, takarmány, fészekrakó anyagok stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

— a dózisszintek megválasztásának indoklása;

— a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval kapcsolatos információk;

— a készítmény stabilitása és homogenitása,

— a vizsgálandó anyag adagolására vonatkozó adatok,

— adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap),

— a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos információk.

▼B

Eredmények:

— táplálékfogyasztási és – ha van – vízfogyasztási adatok, táplálékhasznosítási képesség (egy gramm elfogyasztott táplálékra számított testtömeg-növekedés) és vizsgálandó anyag felvétele a P és F1 állatok esetében, kivéve az együttes tartás időszakát és legalább a szoptatási időszak utolsó harmadát,

— felszívódási adatok (ha vannak),

— a pároztatásra kiválasztott P és F1 állatok testtömegadatai,

— az almok és a kölykök testtömegadatai,

— a testtömeg az exterminálláskor, valamint a szülői generáció abszolút és relatív szervtömegadatai,

— a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (visszafordíthatóság),

— a vizsgálat során bekövetkező elhullás időpontja, illetve hogy az állatok életben maradtak-e az exterminálásig,

— toxikus válaszadatok ivaronként és dózisonként, ezen belül a párzás, a termékenység, a vemhesség, a születés, az életképesség és a szoptatás mérőszámai; a jelentésben fel kell tüntetni a mérőszámok kiszámításához felhasznált adatokat,

— a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások,

— boncolási eredmények,

— az összes kórszövettani lelet részletes ismertetése,

— a szabályos ciklust mutató P és F1 nőstények száma, és a ciklusok időtartama,

— teljes ondósejtszám a mellékhere farki részében, az előrehaladó mozgást végző ondósejtek százalékos aránya, morfológiailag normál ondósejtek százalékos aránya és az azonosított rendellenességet mutató ondósejtek százalékos aránya,

— a pároztatás időtartama, ezen belül a párzásig eltelt napok száma,

— a vemhesség időtartama,

— a beágyazódások és sárgatestek száma, az almok mérete,

— az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség,

— a makroszkóposan látható rendellenességeket mutató kölykök száma, és ha meghatározták, akkor a csökött utódok számát is fel kell tüntetni a jelentésben,

— a kölykökben meghatározott fizikai tájékozódási pontokkal kapcsolatos adatok és más posztnatális fejlődési adatok; a kiértékelt fizikai tájékozódási pontokat meg is kell indokolni,

— adott esetben a kölykökben és felnőtt állatokban végzett funkcionális megfigyelésekkel kapcsolatos adatok,

— adott esetben az eredmények statisztikai elemzése.

▼B

Az eredmények diszkussziója.

Következtetések, ezen belül az anyai és utódhatásokra vonatkozó NOAEL-értékek.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mammals: 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-Induced 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 and Fertility 54:103–107.

(4) Klinefelter, 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: Methodologic 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: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401–415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic 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, J. 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. **TOXIKOKINETIKAI VIZSGÁLAT**

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 417. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. A vizsgált vegyi anyag toxikokinetikai vizsgálatára irányuló tanulmányok célja a vegyi anyag felszívódásával, eloszlásával, biotranszformációjával (azaz metabolizmusával) és kiürülésével kapcsolatos megfelelő információk megszerzése, a megfigyelt toxicitás és a koncentráció vagy a dózis közötti összefüggés meghatározásának, valamint a toxicitás mechanizmusa megértésének elősegítése. A toxikokinetika a vizsgált állatok vizsgált vegyi anyagnak való szisztémás kitettségének bizonyítása, valamint a keringésbe került molekularészek (kiindulási vegyi anyagok/metabolitok) meghatározása révén hozzájárulhat a toxikológiai vizsgálatok értelmezéséhez. Az e vizsgálatok alapján meghatározott alapvető toxikokinetikai paraméterek információt szolgáltatnak továbbá a vizsgált vegyi anyag szövetekben és/vagy szervekben történő felhalmozódásra, valamint a vizsgált vegyi anyagnak való kitettség eredményeként bekövetkező biotranszformáció előidézésére való képességéről.

2. A toxikokinetikai adatok hozzájárulhatnak az állati toxicitással kapcsolatos adatok emberi veszély- és/vagy kockázatértékelés céljából történő extrapolálásra való alkalmasságának és relevanciájának értékeléséhez. A toxikokinetikai vizsgálatok hasznos információt szolgáltathatnak továbbá a toxicitási vizsgálatokhoz szükséges dózisszintek (lineáris, illetve nem lineáris kinetika), a beadási módok okozta hatások, a biológiai hozzáférhetőség, valamint a vizsgálati tervvel kapcsolatos kérdések meghatározásához. A toxikokinetikai adatok bizonyos típusai felhasználhatók élettani alapú toxikokinetikai (PBTK) modellek kidolgozásához.

3. A metabolit-/toxikokinetikai adatok fontos felhasználási területei közé tartozik például a lehetséges toxicitások és hatásmechanizmusok feltárása, valamint ezek dózisszinthez és expozíciós útvonalhoz való viszonyának meghatározása. A metabolizmussal kapcsolatos adatok emellett olyan információkat szolgáltathatnak, amelyek hasznosak lehetnek a vizsgált vegyi anyag exogén módon termelt metabolitjainak való kitettség toxikológiai jelentőségének értékelésében.

4. A megfelelő toxikokinetikai adatok hasznosak lehetnek a mennyiségi szerkezet-hatás összefüggések, a vegyi anyagok biztonsági értékelése csoportosításos vagy read across módszer alapján történő megközelítése további elfogadhatóságának és alkalmazhatóságának támogatása szempontjából. A kinetikai adatok felhasználhatók továbbá egyéb (például *in vivo*/*in vitro*) vizsgálatok toxikológiai relevanciájának értékelésében is.

5. Amennyiben a szöveg más bejuttatási útvonalat nem említ (lásd különösen a 74–78. bekezdést), a jelen vizsgálati módszert a vizsgált vegyi anyag szájon át történő bejuttatására kell alkalmazni.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

6. A szabályozási rendszerek különböző követelményeket és igényeket támasztanak a vegyi anyagok különböző osztályainak (például növényvédő szerek, biocid anyagok, ipari vegyszerek) toxikokinetikájával kapcsolatos végpontok és paraméterek mérésével szemben. A legtöbb vizsgálati módszerrel ellentétben ez a vizsgálati módszer toxikokinetikai vizsgálatot határoz meg, amely több mérést és végpontot foglal magában. A jövőben több új vizsgálati módszer és/vagy iránymutatás kidolgozására kerülhet sor minden egyes végpont külön-külön és részletesebben történő leírása érdekében. A jelen vizsgálati módszer esetében az elvégzendő vizsgálatokat vagy értékeléseket az egyes szabályozási rendszerek követelményei és/vagy igényei határozzák meg.

▼M4

7. Számos vizsgálat végezhető el egy vizsgált vegyi anyag toxikokinetikai viselkedésének szabályozási célú értékelése érdekében. Meghatározott szabályozási igényektől vagy helyzetektől függően azonban nem feltétlenül szükséges az összes lehetséges vizsgálatot elvégezni a vizsgált vegyi anyag értékeléséhez. A toxikokinetikai vizsgálatok tervezését rugalmasan, a szóban forgó vizsgált vegyi anyag jellemzőinek figyelembevételével kell megközelíteni. Bizonyos esetekben csak néhány kérdést szükséges feltárni a vizsgált vegyi anyaggal összefüggésbe hozható veszélyességi vagy kockázati problémák megoldásához. Bizonyos helyzetekben a toxikokinetikai adatok egyéb toxikológiai vizsgálatok értékelésének részeként gyűjthetők össze. Más esetekben további és/vagy kiterjedtebb toxikokinetikai vizsgálatok szükségesek a szabályozási igényektől függően és/vagy ha új kérdések merülnek fel a vizsgált vegyi anyag értékelése során.

8. A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálati laboratóriumnak a vizsgált vegyi anyagra, valamint az ahhoz kapcsolódó metabolitokra és analóg vegyületekre vonatkozó összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie a vizsgálat minőségének javítása és a szükségtelen állatkísérletek elkerülése érdekében. Ebbe beletartozhatnak egyéb releváns vizsgálati módszerek (*in vivo* vizsgálatok, *in vitro* vizsgálatok és/vagy *in silico* értékelések) adatai. A fizikai és kémiai tulajdonságok – úgymint a (log P_{OW}-ként kifejezett) oktanol-víz megoszlási hányados, a pKa, a vízoldékonyság, a gőznyomás, valamint a vegyi anyag molekulatömege – hasznosak lehetnek a vizsgálat tervezése és az eredmények értelmezése szempontjából. Ezek a megfelelő vizsgálati módszereknél leírt módszerek használatával határozhatók meg.

KORLÁTOK

9. Ez a vizsgálati módszer nem alkalmas speciális körülmények között, például vemhes vagy szoptató állatoknál vagy fiatal állatoknál, vagy a vizsgált anyagnak kitett élelmiszertermelő állatokban lévő lehetséges maradványok értékelése céljából való alkalmazásra. A B.36. vizsgálatból szerzett adatok azonban háttér-információt szolgáltathatnak az ilyen vizsgálatokhoz szükséges konkrét tanulmányok tervezéséhez. A jelen vizsgálati módszer nem nanoanyagok vizsgálatára szolgál. Az OECD vizsgálati iránymutatásainak nanoanyagokra történő alkalmazhatóságára vonatkozó előzetes felülvizsgálatról szóló jelentés szerint a 147. vizsgálati iránymutatás (amely a jelen B.36. vizsgálati módszerrel egyenértékű) nem alkalmazható nanoanyagokra (1).

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

10. A jelen vizsgálati módszer alkalmazásában használt fogalommeghatározások a függelékben találhatók.

ÁLLATJÓLLÉTI SZEMPONTOK

11. Az állatokkal való kíméletes bánásmódra vonatkozóan az OECD 19. iránymutatásában (2) található útmutatás. Ajánlott az OECD 19. iránymutatásának alkalmazása a jelen vizsgálati módszerben meghatározott összes *in vivo* és *in vitro* vizsgálat esetében.

A MÓDSZEREK LEÍRÁSA

Előzetes vizsgálatok

12. A toxikokinetikai vizsgálatok kísérleti paramétereinek megválasztása érdekében (például metabolizmus, tömegmérleg, analitikai eljárások, dózismeghatározás, CO_2 kilégzése stb.) előzetes vizsgálatok elvégzése javasolt. E paraméterek némelyikének jellemzése nem feltétlenül teszi szükségessé a radioizotóppal megjelölt vegyi anyagok használatát.

▼M4

Az állatok kiválasztása

Faj

13. A toxikokinetikai vizsgálatokhoz használt állatfaj (és törzs) lehetőleg ugyanaz legyen, mint amelyet az adott vizsgált vegyi anyaggal elvégzett egyéb toxikológiai vizsgálatokhoz használunk. Általában a patkányt kell használni, mivel ezt a fajt széles körben alkalmazzák a toxikológiai vizsgálatokhoz. Egyéb vagy további fajok használata abban az esetben indokolt, ha kritikus toxikológiai vizsgálatok bizonyítják az e fajokban megfigyelhető jelentős toxicitást, vagy ha e fajok toxicitási/toxikokinetikai szempontból hasonlóbbak az emberhez. Az állatfaj és a törzs megválasztását indokolni kell.

14. Amennyiben a vizsgálati módszer más fajt nem említ, a jelen vizsgálati módszer alkalmazásában vizsgálati faj alatt a patkány értendő. A módszer egyes szempontjai más vizsgálati fajok használata esetén módosításra szorulhatnak.

Életkor és törzs

15. Egészséges, fiatal, ivarérett (általában az adagolás időpontjában 6–12 hetes) állatokat kell használni a vizsgálat során (lásd még a 13. és 14. bekezdést). Amennyiben az állatok nem fiatal, ivarérett egyedek, használatukat indokolni kell. Az összes állatnak hasonló életkorúnak kell lennie a vizsgálat kezdetekor. Az egyes állatok súlya nem térhet el ± 20 %-nál nagyobb mértékben a vizsgált csoport átlagértékétől. A használt törzsnek ideális esetben meg kell egyeznie a vizsgált vegyi anyag toxikológiai adatbázisának előállításához használt törzzsel.

Az állatok száma és neme

16. Minden egyes vizsgált dózishoz legalább négy, azonos nemű állat szükséges. A felhasznált állatok nemére vonatkozó döntést indokolni kell. Meg kell fontolni mindkét nem (négy hím és négy nőstény) használatát, ha a nemek között jelentős különbségek bizonyíthatóak a toxicitás vonatkozásában.

Tartási és etetési körülmények

17. A vizsgálati időszak alatt az állatokat általában külön-külön kell tartani. Különleges körülmények között indokolt lehet a csoportos tartás. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. A kísérleti állatok tartására szolgáló helyiség hőmérséklete 22 °C (± 3 °C), relatív páratartalma 30–70 % között kell, hogy legyen. Az etetéshez hagyományos laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Vizsgált vegyi anyag

18. A tömegmérleg és a metabolitok meghatározásához C^{14} radioizotóppal megjelölt vizsgált vegyi anyagot kell használni, azonban nem szükséges a radioizotóppal megjelölt vizsgált vegyi anyag használata, ha az alábbiak bizonyíthatók:

— a tömegmérleg- és metabolitmeghatározás megfelelően értékelhető a nem jelölt vizsgált vegyi anyag használatával,

— a nem radioaktív vizsgált vegyi anyag használatán alapuló módszer analitikai specifikussága és érzékenysége megegyezik vagy nagyobb annál, amelyet a radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag használatával lehetett volna elérni.

▼M4

Egyéb radioaktív és stabil izotópok is használhatók, különösen abban az esetben, ha az adott elem a vizsgált vegyi anyag toxikus részéért felelős vagy annak részét képezi. Amennyiben lehetséges, a radioizotópos jelölésnek a molekula olyan, központi részében kell elhelyezkednie, amely metabolikusan stabil (nem kicserélhető, anyagcsere útján nem távozik CO_2-ként, és nem válik a szervezet egy szénatomos csoportjának részévé). A vizsgált vegyi anyag metabolikus útjának nyomon követése céljából a molekula több területének vagy meghatározott régióinak jelölése is szükséges lehet.

19. A radioizotóppal jelölt és nem jelölt vizsgált vegyi anyagokat a megfelelő módszerek alkalmazásával kell elemezni a tisztaság és az azonosság meghatározása érdekében. A radioaktív vizsgált vegyi anyag radiokémiai tisztaságának az adott vizsgált vegyi anyagnál elérhető legmagasabbnak (ideális esetben 95 %-nál nagyobbnak) kell lennie, és ésszerű erőfeszítéseket kell tenni a 2 %-os vagy annál nagyobb arányú szennyeződések azonosítása érdekében. A tisztaságot, valamint minden azonosított szennyeződés meghatározását és arányát jegyzőkönyvezni kell. Egyes szabályozási programok további iránymutatást adhatnak a keverékekből összetevődő vizsgált vegyi anyagok meghatározásának és specifikációjának, valamint a tisztaság meghatározására szolgáló módszerek kialakításának támogatása érdekében.

A dózis megválasztása

Előzetes vizsgálat

20. Általában egyetlen, szájon át beadott dózis elegendő az előzetes vizsgálathoz. A dózis nem lehet toxikus, de elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kiürülő anyagokból (és adott esetben plazmából) történő metabolitmeghatározást, valamint ahhoz, hogy megfeleljen az előzetes vizsgálat kitűzött céljának a jelen vizsgálati módszer 12. bekezdése szerint.

Fő vizsgálatok

21. A fő vizsgálatokhoz legalább két dózis javasolt, mivel a legalább két dózis-csoportból nyert információk segítséget nyújthatnak a dózisok más toxikológiai vizsgálatokban történő meghatározásához, valamint segíthetnek a már rendelkezésre álló toxicitási vizsgálatok dózis-válasz összefüggésének értékelésében.

22. Két dózis bejuttatása esetén mindkét dózisnak elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a szervezetből kiürülő anyagokból (és adott esetben plazmából) történő metabolitmeghatározást. A dózis megválasztásakor figyelembe kell venni a rendelkezésre álló toxicitási adatokból származtatott információkat. Ha nem áll rendelkezésre információ (például a toxicitás klinikai tüneteit rögzítő akut orális toxicitási vizsgálatokból vagy ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokból), a magasabb dózisként egy, a becsült LD_{50} értéknél (szájon át vagy bőrön át történő bejuttatás) vagy LC_{50} értéknél (belégzésen keresztül történő bejuttatás) alacsonyabb, vagy az akut toxicitási tartomány legkisebb becsült értékénél alacsonyabb érték fontolható meg. Az alacsonyabb dózisnak a magasabb dózis valamely hányadának kell lennie.

23. Amennyiben csak egy dózisszintet vizsgálunk, a dózisnak ideális esetben elég magasnak kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a kiürülő anyagokból (és adott esetben plazmából) történő metabolitmeghatározást anélkül, hogy megfigyelhető toxicitást okozna. A második dózisszint kihagyását indokolni kell.

24. Ha a dózis kinetikai folyamatokra gyakorolt hatását kell meghatározni, lehetséges, hogy két dózis nem elegendő, és legalább az egyik dózisnak elég magasnak kell lennie e folyamatok telítéséhez. Ha a plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület a fő vizsgálatban használt valamely két dózisszint között nem lineáris, az annak a határozott jele, hogy egy vagy több kinetikai folyamat telítődése valahol a két dózisszint között következik be.

▼M4

25. Az alacsony toxicitású vizsgált vegyi anyagok esetében a maximális dózis 1 000 mg/testsúlykilogramm (szájon és bőrön át történő bejuttatás) (belégzés útján történő bejuttatás esetén e melléklet B.2. fejezete ad iránymutatást, az ez esetben alkalmazott dózis általában nem haladja meg a 2 mg/l mennyiséget). Az adott vegyi anyaggal összefüggő szempontok a szabályozási igényektől függően magasabb dózist tehetnek szükségessé. A dózis megválasztását minden esetben indokolni kell.

26. A felhalmozódás és/vagy maradandóság lehetőségének meghatározásához elegendőek lehetnek az egyszeri dózisú vizsgálatokból származó toxikokinetikai és szöveti eloszlási adatok. Bizonyos körülmények között azonban ismételt dózis bejuttatása válhat szükségessé i. a felhalmozódás és/vagy maradandóság vagy a toxikokinetikai változások (azaz például az enzimindukció és -inhibíció) lehetőségének teljesebb körű meghatározása céljából, vagy ii. ha az alkalmazandó szabályozási rendszer megköveteli. Az ismételt adagolású vizsgálatok esetében az ismételt alacsony dózis beadása ugyan általában elegendő, bizonyos körülmények között azonban a magas dózis megismétlése is szükséges lehet (lásd még az 57. bekezdést).

A vizsgált vegyi anyag bejuttatása

27. A vizsgált vegyi anyagot homogén módon kell feloldani vagy szuszpendálni a vizsgált vegyi anyaggal elvégzett más orális szondás toxicitási vizsgálatoknál alkalmazott vivőanyagban, amennyiben a vivőanyagra vonatkozó információk rendelkezésre álnak. A vivőanyag megválasztását indokolni kell. A választott vivőanyagot és a dózis mértékét figyelembe kell venni a vizsgálat tervezésekor. A hagyományos bejuttatási módszer a szájon át történő szondatáplálás, azonban bizonyos helyzetekben előnyös lehet a zselatinkapszulával vagy étrendi keverékként történő bejuttatás (mindkét esetben indokolás szükséges). Az egyes állatoknak ténylegesen beadott dózist meg kell erősíteni.

28. A szájon át történő szondatáplálás révén egyszerre bejuttatandó folyadék maximális mennyisége a vizsgált állatok méretétől, a dózis vivőanyagának típusától, valamint attól függ, hogy az etetést felfüggesztjük-e a vizsgált vegyi anyag bejuttatása előtt. Az adagolás előtti etetést vagy annak korlátozását indokolni kell. A mennyiséget általában a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani a vizes és nem vizes vivőanyagok esetében is. Rágcsálók esetében a dózis mennyisége rendszerint nem haladhatja meg a 10 ml/testsúlykilogrammot. A zsírban jobban oldódó vizsgált vegyi anyagokhoz használt vivőanyag mennyisége 4 ml/testsúlykilogrammnál is kezdődhet. Ismételt adagolás esetén, amikor a napi táplálékmegvonás nem javasolt, alacsonyabb dózismennyiségek (például 2-4 ml/testsúlykilogramm) alkalmazását kell megfontolni. Amennyiben lehetséges, megfontolható a vizsgált vegyi anyaggal elvégzett egyéb, szájon át történő szondatáplálásos vizsgálatok során bejuttatott dózisnak megfelelő mennyiség használata.

29. A biológiai hozzáférhetőség vagy a szájon át történő relatív felszívódás meghatározásához alkalmazható a vizsgált vegyi anyag intravénás bejuttatása, valamint a vizsgált vegyi anyag vérben és/vagy kiürülő anyagokban történő mérése. Az intravénás vizsgálat esetében a vizsgált vegyi anyag egyszeri (az alacsonyabb, szájon át bejuttatott dózissal általában megegyező, de azt meg nem haladó – lásd a dózis megválasztására vonatkozó részt) dózisát juttatjuk be a megfelelő vivőanyag használatával. Ezt az anyagot a megfelelő mennyiségben (például 1 ml/testsúlykilogramm) kell bejuttatni legalább négy, megfelelő nemű állat választott bejuttatási területén (indokolt esetben mindkét nem is használható, lásd a 16. bekezdést). A vizsgált vegyi anyag intravénás bejuttatásához teljesen feloldódott vagy szuszpendált dóziskészítmény szükséges. Az intravénás bejuttatáshoz használt vivőanyag nem

▼M4

befolyásolhatja a vér integritását vagy a véráramlást. Ha a vizsgált vegyi anyagot infúzióval juttatjuk be, az infúzió adagolását jegyzőkönyvezni és az egyes állatok között egységesíteni kell, feltéve, hogy infúziós pumpát használunk. Érzéstelenítést kell használni, ha kanült helyezünk a nyaki vénába (a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához és/vagy vérvételhez), vagy ha a vegyi anyagot a combverőéren keresztül juttatjuk be. Az érzéstelenítés típusára kellő figyelmet kell fordítani, mivel hatással lehet a toxikokinetikára. Az állatok számára lehetővé kell tenni a megfelelő felépülést a vizsgált vegyi anyag és a vivőanyag bejuttatását megelőzően.

30. Bizonyos vizsgált vegyi anyagok esetében egyéb bejuttatási útvonalak – például a bőrön vagy belégzésen keresztüli bejuttatás (lásd a 74–78. bekezdést) – alkalmazhatók azok fizikai és kémiai tulajdonságainak, valamint a várt emberi használat vagy kitettség figyelembevételével.

Mérések

Tömegmérleg

31. A tömegmérleget a bejuttatott (radioaktív) dózis vizelettel, széklettel és kilélegzett levegővel kiürülő százalékának, valamint a szövetekben, elhullott állatokban és ketreclemosóban jelen lévő százalékának összeadásával határozzuk meg (lásd a 46. bekezdést). Általában a bejuttatott vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) 90 %-nál nagyobb mennyiségének visszanyerése tekinthető megfelelőnek.

Felszívódás

32. A felszívódás kezdeti becslése úgy kapható meg, hogy kihagyjuk a dózis emésztőrendszerben és/vagy a székletben lévő százalékát a tömegmérleg meghatározásából. A felszívódás százalékos arányának számítási módját lásd a 33. bekezdésben. A kiürülés vizsgálatához lásd a 44–49. bekezdést. Ha a szájon át történő adagolást követő felszívódás pontos mértékét nem lehet meghatározni a tömegmérleg-vizsgálatokkal (például ha a bejuttatott dózis több mint 20 %-a található meg a székletben), további vizsgálatok lehetnek szükségesek. Ezek a vizsgálatok vagy 1) a vizsgált vegyi anyag beadásából és a vizsgált vegyi anyag epében történő méréséből, vagy 2) a vizsgált vegyi anyag szájon át vagy intravénásan történő bejuttatásából és a vizsgált vegyi anyag vizeletben, valamint a kilélegzett levegőben és az elhullott állatokban jelen lévő nettó mennyiségének mindkét bejuttatási mód tekintetében történő méréséből állnak. Mindkét vizsgálati tervben a vizsgált vegyi anyag és a metabolitok vegyszerspecifikus elemzésére szolgáló helyettesítő módszerként elvégezzük a radioaktivitás mérését.

33. Az epén keresztüli kiürülés vizsgálata során általában a szájon át történő bejuttatást alkalmazzuk. A vizsgálat során kanült kell vezetni legalább négy, megfelelő nemű (vagy indokolt esetben mindkét nemből választott) állat epevezetékébe, és a vizsgált vegyi anyag egyszeri dózisát kell bejuttatni. A vizsgált vegyi anyag bejuttatását követően a radioaktivitás/vizsgált vegyi anyag epén keresztüli kiürülését addig kell megfigyelni, ameddig az szükséges a bejuttatott dózis ezen útvonalon kiürülő százalékának becsléséhez, amely alapján a következőképpen közvetlenül kiszámítható a szájon át történő felszívódás mértéke:

$$\text{Százalékos felszívódás} = \begin{array}{l}(\text{epében} + \text{vizeletben} + \text{kilélegzett levegőben} + \text{elhullott állatokban lévő mennyiség, az emésztőrendszerben lévő mennyiséget leszámítva})/\text{bejuttatottmennyiség} \times 100\end{array}$$

34. A vizsgált vegyi anyagok néhány osztálya esetében a felszívódott dózis közvetlen kiürülése fordulhat elő a bélcsatorna membránjai között. Ilyen esetekben a százalékos dózis azon patkány székletében a szájon át történő adagolást követően végzett mérése, amelynek az epevezetékébe kanült vezettünk, nem tekinthető reprezentatívnak a nem felszívódott dózis szempontjából. Amennyiben vélhetően bélcsatornán keresztüli kiürülés is előfordulhat, ajánlott a dózis százalékos felszívódását a szájon át történő és az intravénás bejuttatást követő kiürülés (érintetlen vagy kanülözött epevezetékű patkány) összehasonlításából kiszámított felszívódás alapján meghatározni (lásd a 35. bekezdést). Amennyiben a bélcsatornán keresztüli kiürülés mennyiségének meghatározását szükségesnek ítéljük, ajánlott a kanülözött epevezetékű patkányból történő kiürülés intravénás bejuttatást követő mérése is.

▼M4

Biológiai hozzáférhetőség

35. A biológiai hozzáférhetőséget az orális és intravénás csoportok plazmájának/vérének kinetikája alapján lehet meghatározni az 50–52. bekezdésben leírtak szerint, a vizsgált vegyi anyag és/vagy a megfelelő metabolitok speciális kémiai elemzése útján, így ez esetben nincs szükség radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag használatára. A vizsgált vegyi anyag vagy a megfelelő metabolit(ok) biológiai hozzáférhetősége (F) a következőképen számítható ki:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dózis_{IV}/Dózis_{exp})$$

ahol az AUC a plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület, az exp pedig a kísérleti útvonal (szájon át, bőrön át vagy belégzéssel történő adagolás).

36. A szisztémás hatások kockázatfelmérésében történő használatkor a toxikus összetevő biológiai hozzáférhetősége általában elsőbbséget élvez a százalékos felszívódással szemben az állatkísérletekből megállapított szisztémás koncentrációk és a munkahelyi kitettséggel kapcsolatos vizsgálatokból származó analóg biomonitoring-adatok összehasonlítása során. A helyzet összetettebbé válhat, ha a dózisok a nem lineáris tartományban vannak, fontos tehát, hogy a toxikokinetikai szűréssel a lineáris tartományban lévő dózisokat határozzuk meg.

Szöveti eloszlás

37. A vizsgált vegyi anyag és/vagy metabolitjai szövetekben történő eloszlásának ismerete fontos a célszövetek meghatározása, valamint a toxicitás mögöttes mechanizmusainak megértése szempontjából, továbbá a vizsgált vegyi anyag és a metabolit felhalmozódási vagy megmaradási képességével kapcsolatos információk megszerzése céljából. A teljes (radioaktív) dózis szövetekben, valamint az elhullott állatokban lévő százalékos arányát legalább a kiürülési kísérlet befejezésekor (például általában az adagolást követő 7 napig, vagy a vizsgált vegyi anyagra jellemző viselkedéstől függően rövidebb ideig) kell mérni. Ha a vizsgálat befejezésekor nem észlelhető vizsgált vegyi anyag a szövetekben (például mert a vizsgált vegyi anyag annak rövid felezési ideje miatt kiürülhetett a vizsgálat befejezése előtt), megfelelő körültekintéssel kell eljárni az adatok félreértelmezésének megelőzése érdekében. Ebben a helyzetben a szöveti eloszlást akkor kell vizsgálni, amikor a vizsgált vegyi anyag (és/vagy metabolit) plazmában/vérben lévő koncentrációja a legmagasabb (T_{max}), vagy amikor a vizeleten keresztül történő kiürülés mennyisége a legmagasabb (lásd a 38. bekezdést). A vizsgált vegyi anyag és/vagy metabolitjai szövetekben történő eloszlásának meghatározása, (adott esetben) az időtől való függőség értékelése, a tömegmérleg meghatározásának elősegítése érdekében és/vagy az illetékes hatóság előírásai szerint a szövetek további időpontokban történő gyűjtésére is szükség lehet. A begyűjtendő szövetek közé tartoznak a májszövetek, a zsírszövetek, az emésztőrendszerből származó szövetek, a vese-, lép-, teljesvér-szövetek, az elpusztult állatokból származó szövetek, a célszervből származó szövetek, valamint bármely egyéb szövet (például pajzsmirigyszövetek, eritrociták, szaporítószervekből származó szövetek, bőrszövetek, szemszövetek [különösen a pigmentált állatokból]), amely jelentőséggel bírhat a vizsgált vegyi anyag toxikológiai értékelése szempontjából. Meg kell fontolni további szövetek ugyanazon időpontokban történő elemzését az állatok lehető legteljesebb felhasználása céljából, valamint abban az esetben, ha célszervi toxicitás figyelhető meg szubkrónikus és krónikus toxicitási vizsgálatokban. A (radioaktív) maradvány koncentrációját, valamint a szövet-plazma (vér) arányt is jegyzőkönyvezni kell.

38. Szükséges lehet, vagy az illetékes hatóság előírhatja, hogy a plazma/vér megfelelő kinetikai vagy kiürülési kísérletei alapján megállapított szöveti eloszlást további időpontokban is értékeljük, például akkor, amikor a plazmában/vérben lévő koncentráció a legmagasabb (például T_{max}), vagy amikor a vizeleten keresztül történő kiürülés mennyisége a legmagasabb. Ezen információk hasznosak lehetnek a toxicitás megértése, valamint a vizsgált vegyi anyag és a metabolit felhalmozódási és megmaradási képességének meghatározása szempontjából. A minták megválasztását indokolni kell; az elemzendő mintáknak általában meg kell egyezniük a fent említettekkel (lásd a 37. bekezdést).

▼M4

39. A radioaktivitás szöveti eloszlási vizsgálatokhoz szükséges mennyiségi meghatározását szervboncolás, homogenizáció, oxidáció és/vagy oldhatóvá tétel segítségével lehet elvégezni, amelyet a befogott maradványok folyadékszcintillációs számlálása (LSC) követ. Bizonyos, jelenleg a fejlesztés különböző stádiumaiban lévő technikák – például a mennyiségi egésztest-autoradiográfia és a mikroszkópos receptor-autoradiográfia – hasznosnak bizonyulhatnak a vizsgált vegyi anyag szervekben és/vagy szövetekben történő eloszlásának maghatározása szempontjából (3) (4).

40. A szájon át történő bejutás kivételével az expozíciós útvonalak tekintetében meghatározott szöveteket kell gyűjteni és elemezni, például tüdőszöveteket az inhalációs vizsgálatok során és bőrszöveteket a bőrön át történő bejutással kapcsolatos vizsgálatok során. Lásd a 74–78. bekezdést.

Metabolizmus

41. A változatlan vizsgált vegyi anyag, valamint a metabolitok azonosításához és mennyiségének meghatározásához a kiürülő anyagok (és adott esetben plazma) összegyűjtése szükséges a 44–49. bekezdésben leírtak szerint. A kiürülő anyagok metabolitok egy adott dóziscsoporton belüli meghatározásának elősegítése céljából történő összevonása megengedhető. Ajánlatos az egyes időszakokból származó metabolitok profiljának meghatározása. Ha azonban a minta és/vagy radioaktivitás hiánya ezt kizárja, a több időpontban gyűjtött vizelet és széklet összevonása megengedhető, de a több nemhez vagy dózishoz tartozó vizeleté és székleté nem. Megfelelő minőségi és mennyiségi módszerek használata szükséges a kezelt állatok vizeletének, székletének, kiürült radioaktivitásának és adott esetben epéjének vizsgálatához.

42. Ésszerű erőfeszítéseket kell tenni a bejuttatott dózis 5 vagy nagyobb százalékában jelen lévő összes metabolit azonosságának meghatározása, valamint a vizsgált vegyi anyag metabolikus rendszerének meghatározása érdekében. A kiürülő anyagokban a bejuttatott dózis 5 vagy több százalékában jelen lévő vizsgált vegyi anyagoknakmeg kell határozni az azonosságát. Az azonosság meghatározása az összetevők pontos strukturális meghatározását jelenti. Az azonosság meghatározása általában vagy a metabolit ismert standardokkal való, két lényegileg különböző rendszer használatával végzett együttes kromatográfiájával, vagy pozitív strukturális azonosításra alkalmas technikákkal, például tömegspektrometriával, magmágneses rezonanciával (NMR) stb. történik. Együttes kromatográfia esetén nem tekinthetők a metabolit azonossága megfelelő kétmódszeres ellenőrzési módszerének azok a kromatográfiai technikák, amelyek ugyanazt az állófázist használják két különböző oldószerrendszerrel, mivel a két módszer nem független egymástól. Az azonosság együttes kromatográfiával történő meghatározását két különböző, analitikailag egymástól független rendszerrel, például reverz és normál fázisú vékonyréteg-kromatográfiával (TLC) vagy nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) kell elvégezni. Spektroszkópiai módszerekkel végzett további megerősítés nem szükséges, ha a kromatográfiai szeparáció megfelelő minőségű. Alternatív módszerként az azonosság egyértelmű meghatározása strukturális információkat szolgáltató módszerek, például folyadékkromatográfia/tömegspektrometria (LC-MS), vagy folyadékkromatográfia/tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS), gázkromatográfia/tömegspektrometria (GC-MS) és NMR-spektometria alkalmazásával is elvégezhető.

43. Ha a bejuttatott dózis 5 vagy nagyobb százalékában jelen lévő metabolitok azonosságának meghatározása nem lehetséges, a zárójelentésben ezt meg kell indokolni/magyarázni. Ahhoz, hogy a vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos veszélyek és/vagy kockázatok elemzéséhez az anyagcsere-útvonalakat alaposabban is megismerhessük, helyénvaló lehet a bejuttatott dózis kevesebb mint 5 %-át kitevő mennyiségben jelen lévő metabolitok azonosságát is meghatározni. Ahol csak lehetséges, strukturális megerősítést is kell végezni. Ez magában foglalhatja a plazmában vagy vérben, vagy más szövetekben történő profilmeghatározást.

▼M4

Kiürülés

44. A bejuttatott dózis kiürülésének sebességét és mértékét a vizeletből, székletből és kilélegzett levegőből visszanyert (radioaktív) dózis százalékos arányának mérésével kell meghatározni. Ezek az adatok segítenek a tömegmérleg meghatározásában is. A vizeleten, székleten és kilélegzett levegőn keresztül távozó vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) mennyiségét megfelelő időközönként kell meghatározni (lásd a 47–49. bekezdést). Az ismételt dózisú kísérleteket úgy kell megtervezni, hogy azok a 26. bekezdésben meghatározott célkitűzések elérése érdekében lehetővé tegyék a kiürülési adatok összegyűjtését. Ez lehetővé teszi az egyszeri dózisú kísérletekkel történő összehasonlítást.

45. Ha az előzetes vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy nem ürül ki jelentős mennyiségű vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) a kilélegzett levegővel (a 49. bekezdés szerint), akkor a fő vizsgálat során nem szükséges a kilélegzett levegő összegyűjtése.

46. A kiürülő anyagok (vizelet, széklet, kilélegzett levegő) gyűjtéséhez minden állatot külön metabolikus egységbe kell helyezni. Az egyes gyűjtési időszakok végén (lásd a 47–49. bekezdést) a metabolikus egységeket át kell mosni megfelelő oldószerrel (úgynevezett „ketreclemosóval”) a vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) maximális visszanyerése érdekében. A kiürülő anyagok gyűjtésével 7 nap után kell felhagyni, vagy azután, hogy a bejuttatott dózis legalább 90 %-át visszanyertük, attól függően, hogy melyik következik be előbb.

47. A vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) vizeletben jelen lévő teljes mennyiségét a gyűjtés első napján legalább két időpontban kell meghatározni, amelyek közül az egyiknek az adagolást követő 24. órában kell történnie, azt követően pedig a vizsgálat befejezéséig naponta. Az első napon érdemes lehet kettőnél több mintavételi időpontot is kijelölni (például a 6., a 12. és a 24. órában). Az alternatív, illetve a további gyűjtési időpontokat az előzetes vizsgálatok eredményei alapján kell kijelölni. A gyűjtés ütemezését indokolni kell.

48. A vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) székletben jelen lévő teljes mennyiségét, hacsak az előzetes vizsgálatok eltérő vagy további gyűjtési időpontokat nem indokolnak, naponta kell meghatározni a vizsgálat befejezéséig, első alkalommal az adagolást követő 24. órában. Az ettől eltérő gyűjtési ütemezést indokolni kell.

49. A kilélegzés útján távozó CO_2 és egyéb illékony anyagok gyűjtését meg kell szakítani az adott vizsgálatban, ha egy 24 órás gyűjtési időszak alatt a bejuttatott dózis kevesebb mint 1 %-át találjuk a kilélegzett levegőben.

Az időbeli lefolyással kapcsolatos vizsgálatok

A plazma/vér kinetikája

50. E vizsgálatok célja a vizsgált vegyi anyag alapvető toxikokinetikai paramétereinek (például C_{max}, T_{max}, felezési idő [$t_{1/2}$], AUC) becslése. Ezek a vizsgálatok egy dózissal, vagy – gyakrabban – két vagy több dózissal végezhetők el. A dózis beállítását a kísérlet jellege és/vagy a vizsgálat célja határozza meg. A kinetikai adatok olyan kérdések megválaszolásához lehetnek szükségesek, mint a vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetősége és/vagy a dózis kiürülésre gyakorolt hatásának meghatározása (például annak meghatározása, hogy a kiürülés dózistól függően telítődik-e).

51. Ezekhez a vizsgálatokhoz dóziscsoportonként legalább négy, azonos nemű állatot kell használni. A felhasznált állatok nemére vonatkozó döntést indokolni kell. Meg kell fontolni mindkét nem (négy hím és négy nőstény) használatát, ha a rendelkezésre álló adatok alapján a nemek között jelentős különbségek feltételezhetők a toxicitás vonatkozásában.

▼M4

52. A (radioizotóppal jelölt) vizsgált vegyi anyag bejuttatása után megfelelő mintavételi módszertan alkalmazásával megfelelő időpontokban minden állattól vérmintát kell venni. Az állatonként levehető vérminták mennyiségét és számát korlátozhatja az ismételt mintavételnek az állat egészségére/fiziológiájára gyakorolt lehetséges hatása és/vagy az analitikai módszer érzékenysége. A mintákat minden egyes állatra vonatkozóan kell elemezni. Bizonyos körülmények között (például a metabolitok jellemzőinek meghatározásakor) több állattól származó minták összevonására lehet szükség. Az összevont mintákat egyértelműen azonosítani kell, és az összevonást indokolni kell. Amennyiben radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyagot használunk, megfelelő lehet a jelen lévő teljes radioaktivitás elemzése. Ebben az esetben a teljes radioaktivitást a teljes vérben és plazmában, vagy a plazmában és a vörösvérsejtekben kell elemezni, ami lehetővé teszi a vér/plazma arány kiszámítását. Más körülmények között a kiindulási vegyület és/vagy a metabolitok azonosítását igénylő konkrétabb vizsgálatok, vagy a fehérjekötés vizsgálatának elvégzése lehet szükséges.

Egyéb szövetek kinetikája

53. E vizsgálatok célja időbeli lefolyással kapcsolatos információk megszerzése olyan szempontokkal összefüggő kérdéseknek a vizsgált vegyi anyag különböző szövetekben lévő szintjeinek meghatározása révén történő megválaszolása céljából, mint a toxikus hatásmechanizmus, a bioakkumuláció és a bioperzisztencia. A szövetek megválasztása és az értékelt időpontok száma a megválaszolandó kérdéstől és a vizsgált vegyi anyagra vonatkozó toxikológiai adatbázistól függ. E további, szövetek kinetikájával kapcsolatos vizsgálatok megtervezésekor figyelembe kell venni a 37–40. bekezdésben leírtak szerint összegyűjtött információkat. Ezek a vizsgálatok egyszeri vagy ismételt adagolással végezhetők el. A választott megközelítést részletesen indokolni kell.

54. A szövetek kinetikájával kapcsolatos egyéb vizsgálatok elvégzésének okai többek között a következők lehetnek:

— bizonyíték a vérben megfigyelhető hosszabb felezési időre, ami a vizsgált vegyi anyag különböző szövetekben történő lehetséges felhalmozódására utal, vagy

— annak vizsgálatához fűződő érdek, hogy kialakult-e egy állandósult állapot bizonyos szövetekben (az ismételt dózisú vizsgálatokban például annak ellenére, hogy a vizsgált vegyi anyag nyilvánvaló állandósult állapota már kialakulhatott a vérben, érdekek fűződhetnek annak megerősítéséhez, hogy a célszövetekben is kialakult az állandósult állapot).

55. Az ilyen típusú, időbeli lefolyással kapcsolatos vizsgálatok esetén a vizsgált vegyi anyag megfelelő dózisát időpontonként és dózisonként legalább négy állatnak kell szájon át beadni, és az eloszlás időbeli lefolyását meg kell figyelni a választott szövetekben. Csak az egyik nem egyedei használhatók, hacsak nem figyelhető meg egy adott nemre jellemző toxicitás. A megválaszolandó kérdéstől is függ, hogy a teljes radioaktivitást, vagy a kiindulási vegyületet és/vagy a metabolitokat elemezzük-e. A szöveteken belüli eloszlást a megfelelő technikák alkalmazásával kell vizsgálni.

Enzimindukció/-inhibíció

56. A vizsgált vegyi anyag enzimindukciójának/-inhibíciójának vagy biotranszformációjának lehetséges hatásaival foglalkozó vizsgálatokra akkor lehet szükség, ha az alábbi feltételek közül egy vagy több fennáll:

1. a rendelkezésre álló bizonyítékok a vizsgált vegyi anyag biotranszformációja és a megnövekedett toxicitás közötti kapcsolatra utalnak;

2. a rendelkezésre álló toxicitási adatok a dózis és a metabolizmus közötti nem lineáris kapcsolatra utalnak;

▼M4

3. a metabolitok azonosítására irányuló vizsgálatok egy potenciálisan toxikus metabolit meghatározását eredményezték, amelyet a vizsgált vegyi anyag által előidézett enzimfolyamat hozhatott létre;

4. olyan hatásokra keresünk magyarázatot, amelyek feltételezhetően enzimindukciós jelenségekkel függnek össze;

5. ha a vizsgált vegyi anyag metabolitprofiljában különböző fajokkal vagy különböző körülmények között elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* kísérletek révén toxikológiai szempontból jelentős váltakozások figyelhetőek meg, szükség lehet az érintett enzim(ek) (például 1-es fázisú enzimek, úgymint a citokróm P450-függő monooxigenáz rendszer izoenzimei, 2-es fázisú enzimek, úgymint a szulfotranszferáz vagy az uridin-difoszfát-glükuroniltranszferáz izoenzimei, vagy bármely más, ide tartozó enzim) jellemzőinek meghatározására. Ezek az információk felhasználhatók a fajok közötti extrapoláció megfelelőségének értékeléséhez.

57. A vizsgált vegyi anyaggal összefüggő toxikokinetikai változások értékelésére megfelelően validált és indokolt vizsgálati protokollokat kell alkalmazni. A példaként megemlíthető vizsgálati tervek a jelöletlen vizsgált vegyi anyag ismételt adagolását, azt követően pedig a radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag 14. napon történő egyszeri adagolását, vagy a radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag ismételt adagolását és az 1., 7. és 14. napon a metabolitprofilok meghatározása céljából végzett mintavételt foglalják magukban. A radioizotóppal jelölt vizsgált vegyi anyag ismételt adagolása információkat szolgáltathat a bioakkumulációról is (lásd a 26. bekezdést).

KIEGÉSZÍTŐ MEGKÖZELÍTÉSEK

58. A jelen vizsgálati módszerben leírt *in vivo* kísérleteken túlmutató kiegészítő megközelítések hasznos információkat szolgáltathatnak a vizsgált vegyi anyag bizonyos fajokban végbemenő felszívódásával, eloszlásával, metabolizmusával vagy kiürülésével kapcsolatban.

***In vitro* információk használata**

59. A vizsgált vegyi anyag metabolizmusával kapcsolatos számos kérdés megválaszolható megfelelő vizsgálati rendszereket alkalmazó *in vitro* vizsgálatok segítségével. A májból származó, frissen izolált vagy tenyésztett hepatociták és szubcelluláris frakciók (például mikroszómák és citoszol vagy S9 frakció) felhasználhatók az esetleges metabolitok vizsgálatához. A célszervben, például a tüdőben végbemenő helyi metabolizmus vizsgálata hasznos lehet a kockázatértékelés szempontjából. Ebből a célból hasznosak lehetnek a célszövetek mikroszómás frakciói. A mikroszómákkal végzett vizsgálatok hasznosak lehetnek a lehetséges nembeli és életkorbeli különbségek meghatározása, valamint az enzimparaméterek (K_m és V_{max}) jellemzőinek meghatározása szempontjából, amelyek segítséget nyújthatnak a metabolizmus dózisfüggőségének kitettségi szintek vonatkozásában történő vizsgálatához. A mikroszómák hasznosak lehetnek továbbá a vizsgált vegyi anyag metabolizmusában részt vevő egyes mikroszómás enzimek azonosításában, ami a fajok közötti extrapoláció szempontjából lehet lényeges (lásd még az 56. bekezdést). A biotranszformáció előidézésének lehetősége is vizsgálható a szóban forgó vizsgált vegyi anyaggal előkezelt állatok májából származó szubcelluláris frakciók (például mikroszómák és citoszol) használatával, *in vitro* kísérletekben hepatocitaindukció alapján, vagy a megfelelő enzimeket kimutató egyes sejtvonalakon keresztül. Bizonyok körülmények között és a megfelelő feltételek mellett emberi szövetekből származó szubcelluláris frakciók használatát is fontolóra lehet venni a biotranszformációval kapcsolatban a fajok között esetlegesen fennálló különbségek meghatározásához. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei hasznosak lehetnek a PBTK-modellek kidolgozása szempontjából is (5).

▼M4

60. A bőrön keresztüli felszívódással kapcsolatos *in vitro* vizsgálatok kiegészítő információkat szolgáltathatnak a felszívódás jellemzőinek meghatározásához (6).

61. A májsejtekből származó elsődleges sejttenyészetek és a friss szövetszeletek felhasználhatók a májmikroszómákra vonatkozókhoz hasonló kérdések megválaszolásához. Bizonyos esetekben meghatározott kérdések a megfelelő enzimet határozottan kimutató sejtvonalak vagy mesterséges sejtvonalak használatával is megválaszolhatók lehetnek. Bizonyos esetekben hasznos lehet egyes citokróm P450 izoenzimek (például CYP1A1, 2E1, 1A2 és más enzimek) és/vagy 2-es fázisú enzimek kiindulási vegyület általi inhibíciójának és indukciójának *in vitro* kísérletek révén történő vizsgálata. Az így szerzett információk hasznosak lehetnek a hasonló szerkezetű vegyületek szempontjából.

Toxicitásvizsgálatokból származó toxikokinetikai adatok kiegészítő információként történő használata

62. A bármely más toxicitásvizsgálat során gyűjtött vér-, szövet-, és/vagy kiürülőanyag-minták elemzése adatokat szolgáltathat a biológiai hozzáférhetőségről, a plazmakoncentráció időbeli változásáról (AUC, C_{max}), a bioakkumulációs képességről, a kiürülési sebességről, valamint a metabolizmus és kinetika nemtől vagy életkortól függő változásairól.

63. A vizsgálati terv figyelembevétele felhasználható az alábbiakkal kapcsolatos kérdések megválaszolásához: a felszívódás telítődése, biotranszformáció vagy kiürülési útvonalak magasabb dózisszinteknél, új anyagcsere-útvonalak működése magasabb dózisoknál, valamint a toxikus metabolitok korlátozása magasabb dózisoknál.

64. Az egyéb veszélyértékelési megfontolások közé tartozhatnak a következők:

— életkorral összefüggő érzékenység a vér-agy gát, a vese és/vagy a detoxikációs képesség állapotában fennálló különbségek miatt,

— szubpopulációra jellemző érzékenység a biotranszformációs képességben fennálló vagy egyéb toxikokinetikai különbségek miatt,

— a magzat vagy újszülött kitettsége a vegyszerek placentán, illetve szoptatáson keresztüli átvitele révén.

Toxikokinetikai modellezés alkalmazása

65. A toxikokinetikai modellek hasznosak lehetnek a veszélyesség- és kockázatértékelés különböző szempontjai, például a szisztémás kitettség és a belső szövetdózis előrejelzése tekintetében. Ezenkívül a hatásmechanizmussal kapcsolatos egyes kérdések is megválaszolhatók, és ezek a modellek a fajok közötti extrapoláció, az expozíciós útvonalak, az adagolási sémák és a humán kockázatértékelés alapjául szolgálhatnak. Az adott vizsgált vegyi anyag bármely fajra vonatkozó PBTK-modelljeinek kidolgozásához többek között a következő adatok lehetnek hasznosak: 1) megoszlási hányadosok, 2) biokémiai állandók és fiziológiai paraméterek, 3) útvonalspecifikus felszívódási paraméterek és 4) a modellek értékeléséhez használt *in vivo* kinetikai adatok (például a megfelelő [> 10 %] kiválasztódási folyamatokhoz tartozó kiürülési paraméterek, a metabolizmus vonatkozásában a K_m és a V_{max}). A modellek kidolgozásához felhasznált kísérleti adatokat tudományos szempontból megalapozott módszerekkel kell előállítani, és az előállított modelleket validálni kell. A vizsgált vegyi anyagtól és a fajtól függő paramétereket, például a felszívódási arányokat, a vér-szövet megoszlást és a metabolizmus gyorsaságának állandóit gyakran határozzuk meg a nem kompartment és az élettani alapú modellek kidolgozásának elősegítése céljából (7).

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

66. Ajánlott tartalomjegyzéket készíteni a vizsgálati jegyzőkönyvhöz.

A jegyzőkönyv törzse

67. A jegyzőkönyv törzsének a jelen vizsgálati módszerben leírt információkat kell tartalmaznia, amelyeket az alábbiak szerint kell szakaszokra és bekezdésekre tagolni:

Összefoglalás

68. A vizsgálati jegyzőkönyv e részének tartalmaznia kell a vizsgálati terv összefoglalását, valamint az alkalmazott módszerek leírását. Az összefoglalásban ki kell emelni a tömegmérleggel, a metabolitok jellegével és mennyiségével, a szövetmaradványokkal, a kiürülés sebességével, a bioakkumulációs képességgel, a nemek szerinti különbségekkel stb. kapcsolatos fő megállapításokat is. Az összefoglalásnak kellően részletesnek kell lennie ahhoz, hogy lehetővé tegye a megállapítások értékelését.

Bevezetés

69. A jegyzőkönyv e részének tartalmaznia kell a vizsgálat célkitűzéseit, indokolását és tervét, valamint a megfelelő hivatkozásokat és az esetleges előzményeket.

Anyagok és módszerek

70. A jegyzőkönyv e részének tartalmaznia kell az összes lényeges információ, többek között az alábbiak részletes leírását:

a) Vizsgált vegyi anyag

Ennek az alszakasznak tartalmaznia kell a vizsgált vegyi anyag meghatározását: kémiai név, molekuláris szerkezet, a kémiai összetétel minőségi és mennyiségi meghatározása, kémiai tisztaság, valamint lehetőség szerint az esetleges szennyeződések típusa és mennyisége. Információkat kell tartalmaznia továbbá a fizikai/kémiai tulajdonságokkal, többek között a fizikai halmazállapottal, színnel, bruttó oldhatósággal és/vagy megoszlási hányadossal, stabilitással, valamint adott esetben a maró hatással kapcsolatban. Adott esetben az izomerekkel kapcsolatos információkat is fel kell tüntetni. Ha a vizsgált vegyi anyag radioizotóppal jelölt, ennek az alszakasznak a következőkre vonatkozó információkat is tartalmaznia kell: a radioizotóp típusa, a jelölés helye, fajlagos aktivitás és radiokémiai tisztaság.

A vizsgált vegyi anyag bejuttatásához használt bármilyen vivőanyag, hígítószer, szuszpendáló anyag és emulgeálószer, vagy más anyag típusát vagy leírását is meg kell adni.

b) Kísérleti állatok

Ennek az alszakasznak a kísérleti állatokra vonatkozó információkat kell tartalmaznia, beleértve a faj, a törzs és a vizsgálat kezdetekori életkor megválasztását és ennek indokolását, az állatok nemét, valamint testsúlyát, egészségi állapotát és az állattartás módját.

c) Módszerek

Ennek az alszakasznak részleteznie kell a vizsgálati tervet és az alkalmazott módszertant. Tartalmaznia kell az alábbiak leírását:

(1) adott esetben az expozíciós útvonal és expozíciós körülmények bármilyen módosításának indokolása;

▼M4

(2) a dózisszintek megválasztásának indokolása;

(3) az utóvizsgálatok kísérleti tervezéséhez használt előzetes vizsgálatok leírása, ha voltak ilyenek. Be kell nyújtani az előzetes vizsgálatot alátámasztó adatokat;

(4) az adagoló oldat elkészítésének módja, valamint a felhasznált oldószer vagy vivőanyag típusa, ha van ilyen;

(5) a kezelt csoportok száma és az állatok száma csoportonként;

(6) adagolási szintek és mennyiségek (valamint radioaktivitás használata esetén a dózis fajlagos aktivitása);

(7) bejuttatási útvonal(ak) és módok;

(8) az adagolás gyakorisága;

(9) táplálékmegvonási időszak (ha van ilyen);

(10) teljes radioaktivitás állatonként;

(11) az állatok tartása;

(12) a minták gyűjtése és kezelése;

(13) a metabolitok szétválasztásához, mennyiségének meghatározásához és azonosításához használt analitikai módszerek;

(14) az alkalmazott módszerek kimutatási határa;

(15) az alkalmazott egyéb kísérleti mérések és eljárások (beleértve a metabolitelemzéshez használt módszerek validációját).

d) Statisztikai elemzés

Ha a vizsgálat megállapításait statisztikai elemzés útján értékeljük, elegendő információt kell megadni az elemzési módszerre és az alkalmazott számítógépes programra vonatkozóan ahhoz, hogy egy független bíráló/statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést.

A rendszermodellezési vizsgálatok, például a PBTK-vizsgálatok esetében a modellek bemutatásának tartalmaznia kell a modell teljes leírását a modell független rekonstrukciójának és validációjának lehetővé tétele érdekében (lásd a 65. bekezdést és a Függelék: Fogalommeghatározások című részt).

Eredmények

71. Ebben a szakaszban az összes adatot össze kell foglalni és táblázatba kell rendezni a megfelelő statisztikai értékeléssel együtt, valamint szövegesen le kell írni. A radioaktivitás számlálásával kapcsolatos adatokat a vizsgálatnak megfelelő módon kell összefoglalni és bemutatni, általában mikrogramm vagy milligramm egyenérték/minta tömege egységekben, de más egységek is használhatók. Ennek a szakasznak tartalmaznia kell a megállapítások grafikus ábrázolását, a reprezentatív kromatográfiai és spektrometriai adatok reprodukcióját, a metabolitok meghatározását/számszerűsítését, valamint a várható anyagcsere-útvonalakat, beleértve a metabolitok molekuláris szerkezetét. Ennek a szakasznak adott esetben az alábbi információkat is tartalmaznia kell:

(1) A vizeletből, székletből, kilélegzett levegőből, valamint a ketreclemosóban talált vizeletből és székletből visszanyert radioaktivitás mennyisége és százalékos aránya.

— Bőrvizsgálatok esetén a kezelt bőrből, bőrlemosókból visszanyert vizsgált vegyi anyaggal, valamint a bőrt takaró eszközön és a metabolikus egységen visszamaradt radioaktivitással kapcsolatos adatokat, továbbá a bőrlemosási vizsgálat eredményeit is meg kell adni. További részleteket lásd a 74–77. bekezdésben.

▼M4

— Inhalációs vizsgálatok esetén a tüdőből és az orrszövetekből visszanyert vizsgált vegyi anyaggal kapcsolatos adatokat is meg kell adni (8). További részleteket lásd a 78. bekezdésben.

(2) A bejuttatott dózis százalékaként kifejezett szöveti eloszlás és koncentráció (mikrogramm egyenértékek/a szövet grammban kifejezett súlya), valamint a szövet-vér vagy szövet-plazma arány,

(3) a testszövetek és kiürülő anyagok vizsgálatát magában foglaló egyes vizsgálatokból kiszámított anyagmérleg,

(4) plazmakoncentráció és toxikokinetikai paraméterek (biológiai hozzáférhetőség, AUC, Cmax, Tmax, kiürülés, felezési idő) a megfelelő expozíciós útvonal(ak)on keresztül történő bejuttatást követően,

(5) a vizsgált vegyi anyag felszívódásának sebessége és mértéke a megfelelő expozíciós útvonal(ak)on keresztül történő bejuttatást követően,

(6) a vizsgált vegyi anyag és metabolitok kiürülő anyagokból gyűjtött mennyisége (a bejuttatott dózis százalékában kifejezve),

(7) hivatkozás a függelék adataira, amelyek magukban foglalják az egyes állatok összes mérési végpontra vonatkozó adatait (például dózis bejuttatása, százalékos visszanyerés, koncentrációk, toxikokinetikai paraméterek stb.),

(8) a várható anyagcsere-útvonalakat és a metabolitok molekuláris szerkezetét bemutató ábra.

Tárgyalás és következtetések

72. Ebben a szakaszban a szerzőnek

(1) be kell mutatnia a várható anyagcsere-útvonalakat a vizsgált vegyi anyag metabolizmusa és eloszlása vizsgálatának eredményei alapján,

(2) tárgyalnia kell a vizsgált vegyi anyag eloszlásával és/vagy biotranszformációjával kapcsolatos, fajjal és nemmel összefüggő lehetséges eltéréseket,

(3) táblázatba kell foglalnia és tárgyalnia kell a metabolitok meghatározását és mennyiségét, a kiürülés sebességét, a bioakkumulációs képességet, valamint a kiindulási vegyület és/vagy a metabolitok szövetekben jelen lévő maradványait, továbbá a toxikokinetikai paraméterek lehetséges, dózistól függő változásait, ha vannak,

(4) bele kell foglalnia ebbe a szakaszba a toxicitásvizsgálatok elvégzése során szerzett bármely lényeges toxikokinetikai adatot,

(5) röviden össze kell foglalnia a vizsgálat megállapításaival alátámasztható következtetéseket,

(6) további szakaszokat kell beillesztenie (ha szükséges vagy helyénvaló).

73. Az alátámasztó szakirodalmi információknak, táblázatoknak, ábráknak, függelékeknek stb. további szakaszokban kell helyet kapniuk.

▼M4

ALTERNATÍV EXPOZÍCIÓS ÚTVONALAK

Bőrön át történő expozíció

Bőrön át történő kezelés

74. Ez a szakasz a vizsgált vegyi anyag bőrön keresztüli toxikokinetikájának vizsgálatával kapcsolatos konkrét információkat tartalmaz. A bőrön keresztüli felszívódással kapcsolatban az e melléklet B.44. fejezetében (Bőrön át történő felszívódás: *in vivo* módszer (9)) találhatók információk. Egyéb végpontokkal, például az eloszlással és a metabolizmussal kapcsolatban a jelen B.36. vizsgálati módszer használható. A bőrön át történő kezelés során a vizsgált vegyi anyagot egy vagy több dózisszinten kell bejuttatni. A vizsgált vegyi anyagnak (például a bőrön alkalmazott, vizsgált vegyi anyagot tartalmazó tiszta, hígított vagy kevert anyagnak) meg kell egyeznie azzal az anyaggal, amelynek az emberek vagy más lehetséges célfajok ki lehetnek téve (vagy ennek reális helyettesítőjének kell lennie). A dózisszint(ek)et a jelen vizsgálati módszer 20–26. bekezdésében leírtaknak megfelelően kell megválasztani. A bőrön át bejuttatott dózis megválasztásakor figyelembe vehető tényezők többek között a várható humán kitettség és/vagy olyan dózisok, amelyeknél toxicitást figyeltek meg más dermális toxicitási vizsgálatok során. A bőrön át bejuttatott dózis(oka)t szükség szerint fel kell oldani megfelelő vivőanyagban, és olyan mennyiségben kell felvinni, amely elegendő a dózis bejuttatásához. Röviddel a vizsgálat megkezdése előtt a törzs háti felületén le kell nyírni a kísérleti állatok szőrét. Borotválás is alkalmazható, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A szőrzet nyírásakor vagy borotválásakor ügyelni kell arra, nehogy lehorzsoljuk a bőrt, mert az megváltoztathatja a bőr áteresztő képességét. A vizsgált vegyi anyag felviteléhez a testfelület körülbelül 10 %-át kell megtisztítani. Erősen toxikus vegyi anyagok esetében a lefedett testfelület 10 %-nál kevesebb is lehet, de a felület lehető legnagyobb részét le kell fedni egy vékony és egységes filmréteggel. Ugyanazt a kezelt felületrészt kell használni az összes bőrvizsgálati csoportnál. A kezelt területeket megfelelő, rögzített borítással kell védeni. Az állatokat külön kell tartani.

75. Bőrlemosási vizsgálatot kell végezni a vizsgált vegyi anyag felvitt dózisa azon mennyiségének megállapítása érdekében, amelyet el lehet távolítani a bőrről a kezelt bőrfelület kímélő szappannal és vízzel történő lemosásával. Ez a vizsgálat a vizsgált vegyi anyag bőrön keresztüli bejuttatása esetén a tömegmérleg meghatározásában is segíthet. E bőrlemosási vizsgálathoz a vizsgált vegyi anyag egyszeri dózisát kell két állatra felvinni. A dózisszintet a jelen vizsgálati módszer 23. bekezdésének megfelelően kell megválasztani (lásd még a bőrrel való érintkezés időtartamát tárgyaló 76. bekezdést). A vizsgált vegyi anyag lemosókból visszanyert mennyiségét meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag lemosási eljárással történő eltávolítása hatékonyságának értékelése céljából.

76. Amennyiben a maró hatás ezt nem zárja ki, a felvitt vizsgált vegyi anyagot legalább 6 órán keresztül kell a bőrön hagyni. A védőborítás eltávolításakor a kezelt területet a bőrlemosási vizsgálatnál leírtak szerint le kell mosni az eljárást követően (lásd a 75. bekezdést). A védőborítást és a lemosókat is elemezni kell a visszamaradt vizsgált vegyi anyag kimutatása céljából. A vizsgálat befejezésekor minden állatot humánus módon el kell pusztítani a (2) kiadványnak megfelelően, és a kezelt bőrt el kell távolítani. A kezelt bőr megfelelő részét elemezni kell a visszamaradt vizsgált vegyi anyag (radioaktivitás) meghatározása céljából.

77. Gyógyszerészeti készítmények toxikokinetikai értékeléséhez a vonatkozó szabályozási rendszernek megfelelően eltérő eljárások lehetnek szükségesek.

▼M4

Belélegeztetés

78. A vizsgált vegyi anyag egyszeri (vagy szükség esetén többszöri) koncentrációját kell alkalmazni. A koncentráció(ka)t a jelen vizsgálati módszer 20–26. bekezdésében leírtaknak megfelelően kell megválasztani. A belélegeztetéses kezelést orrtölcséres vagy csak fejen alkalmazott berendezés segítségével kell elvégezni annak érdekében, hogy megelőzhető legyen az alternatív expozíciós útvonalakon keresztüli felszívódás (8). Ha egyéb belélegeztetési expozíciós körülményeket alkalmazunk, a módosítás indokolását dokumentálni kell. A belélegeztetés általi expozíció időtartamát meg kell határozni; az expozíció jellemző időtartama 4–6 óra.

SZAKIRODALOM

(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 N°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) E melléklet B.45., Bőrön át történő felszívódás: *In vitro* módszer című fejezete.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, 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) E melléklet B.44., Bőrön át történő felszívódás: *In vivo* módszer című fejezete.

(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 and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Felszívódás: Vegyi anyagok szövetekbe vagy szöveteken keresztül történő felvételének folyamata(i). A felszívódás a kiindulási vegyületre és annak összes metabolitjára vonatkozik. Nem összetévesztendő a biológiai hozzáférhetőség fogalmával.

Felhalmozódás (bioakkumuláció): A vizsgált vegyi anyag mennyiségének időbeli növekedése a szöveteken belül (általában zsírszövetekben, az ismételt expozíciót követően); ha a vizsgált vegyi anyag nagyobb mennyiségben jut be a testbe, mint amennyi kiürül, a szervezet felhalmozza a vizsgált vegyi anyagot, és a vizsgált vegyi anyag toxikus koncentrációi lehetnek megfigyelhetők.

ADME: Az angol »Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion« (felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiürülés) szavak rövidítése.

AUC (a plazmakoncentráció-idő görbe alatti terület): A vizsgált vegyi anyag plazmában lévő koncentrációját az idő függvényében bemutató ábrán a görbe alatti terület. A testben előre meghatározott időtartamon belül felszívódott vizsgált vegyi anyag teljes mennyiségét jelenti. Lineáris feltételek mellett az AUC (a nullától a végtelenig) a felszívódás sebességétől függetlenül arányos a testben felszívódott vizsgált vegyi anyag teljes mennyiségével.

Autoradiográfia (egésztest-autoradiográfia): Radioaktív vizsgált vegyi anyagok szöveteken belüli lokalizációjának minőségi és/vagy mennyiségi meghatározására szolgáló technika, amely röntgenfilmet, vagy az utóbbi időben digitális foszforos képalkotást alkalmaz a radioizotóppal jelölt molekulák vagy molekulafragmentumok láthatóvá tételére oly módon, hogy rögzíti a vizsgált tárgyon belül kibocsátott sugárzást. A mennyiségi egésztest-autoradiográfia előnyökkel járhat a szerv feltárásával szemben a vizsgált vegyi anyag eloszlásának értékelése, valamint a szövetekben lévő radioaktív anyag általános visszanyerésének és bomlásának vizsgálata szempontjából. A módszer egyik jelentős előnye például, hogy felhasználható egy pigmentált állatokat alkalmazó modellben a vizsgált vegyi anyag a bizonyos molekulák megkötésére képes melaninnal történő lehetséges összekapcsolódásának vizsgálatához. Ugyanakkor bár megfelelő képet nyújthat az egész testről a nagy kapacitású és alacsony affinitású kötési helyek vonatkozásában, a technológia korlátokba ütközhet olyan konkrét célterületek felismerésekor, mint a receptorkötési területek, ahol viszonylag nagy felbontás és magas érzékenység szükséges az észleléshez. Az autoradiográfia használata esetén a bejuttatott vegyület tömegmérlegének meghatározására irányuló kísérleteket különálló csoportként vagy külön vizsgálat során kell elvégezni, nem a szöveti eloszlást vizsgáló kísérlet részeként, ahol az összes kiürülő anyagot (amely magában foglalhatja a kilélegzett levegőt is) és egész testeket homogenizálunk és vizsgálunk folyadékszcintillációs számlálás segítségével.

Epén keresztüli kiürülés: Kiválasztódás az epevezetékeken keresztül.

Bioakkumuláció: Lásd: »Felhalmozódás«.

Biológiai hozzáférhetőség: A bejuttatott dózis azon frakciója, amely eléri a szisztémás keringést, vagy amely elérhetővé válik a fiziológiai hatás helyén. Egy vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetősége általában a kiindulási vegyületre vonatkozik, de vonatkozhat annak metabolitjára is. Csak az egyik kémiai formát veszi figyelembe. *Nota bene:* a biológiai hozzáférhetőség és a felszívódás nem ugyanaz. A szájon át történő felszívódás (azaz a bélfalon és a portális keringésben való jelenlét) és a biológiai hozzáférhetőség (azaz a szisztémás vérben és szövetekben való jelenlét) közötti különbség például a kémiai lebomlásból adódhat a bélfali anyagcsere vagy a bél belső részébe történő kiáramló szállítás vagy a májban végbemenő preszisztémás metabolizmus, vagy más tényezők miatt (10). A toxikus összetevő (kiindulási vegyület vagy metabolit) biológiai hozzáférhetősége kritikus paraméter a humán kockázat értékelése (a magasról az alacsony dózisra való extrapoláció, útvonalak közötti extrapoláció) során a belső értékek külső NOAEL vagy BMD (alkalmazott dózis) alapján történő kiszámítása szempontjából. A májra szájon át történő bejuttatás nyomán gyakorolt hatások tekintetében a szájon át történő felszívódás vizsgálata elegendő. A bejutás helyén jelentkező hatások kivételével azonban a biológiai hozzáférhetőség általában az összes hatás szempontjából megbízhatóbb paraméter a kockázatértékelésben történő további használatra, mint a felszívódás.

▼M4

Bioperzisztencia: Lásd: »Perzisztencia«.

Biotranszformáció: Az adott vizsgált vegyi anyag (általában enzimatikus) kémiai átalakulása egy másik vegyi anyaggá a testen belül. A metabolizmus szinonimája.

$\mathbf{C_{max}}$: Vagy a bejuttatást követő maximális (legmagasabb) koncentráció a vérben (plazmában/szérumban), vagy a bejuttatást követő maximális (legnagyobb mértékű) kiürülés (vizeletben vagy székletben).

Kiürülési sebesség: A vizsgált vegyi anyag vérből, plazmából vagy egy bizonyos szövetből egy egységnyi idő alatt történő távozása mértékének mennyiségi meghatározása.

Kompartment: A test, szövet, vagy sejt strukturális vagy biokémiai része (vagy egysége), amely független a többitől.

Detoxikációs útvonalak: A toxikus vegyi anyagok testből történő, metabolikus változás vagy kiürülés útján végbemenő kiürüléséhez vezető lépések sorozata.

Eloszlás: A vizsgált vegyi anyag és származékainak eloszlása a szervezet egészében.

Enzimek/izoenzimek: Kémiai reakciókat katalizáló fehérjék. Az izoenzimek hasonló kémiai reakciókat katalizáló, de aminosav-szekvenciájukban különböző enzimek.

Enzimatikus paraméterek: K_m: Michaelis-állandó, valamint V_{max}: maximális sebesség.

Kiürülés: Azon folyamat(ok), amely(ek) révén a bejuttatott vizsgált vegyi anyag és/vagy annak metabolitjai távoznak a szervezetből.

Exogén: A szervezeten vagy rendszeren kívülről bejuttatott vagy ott termelt.

Extrapoláció: Egy vagy több ismeretlen értékre való következtetés ismert vagy megfigyelt adatok alapján.

Felezési idő ($t_{1/2}$): Egy adott kompartmentben lévő vizsgált vegyi anyag koncentrációjának felére való csökkenéséhez szükséges idő. Általában a plazmabeli koncentrációra vagy a vizsgált vegyi anyag egész testben jelen lévő mennyiségére vonatkozik.

Indukció/enzimindukció: Környezeti inger vagy indukáló molekula hatására lezajló enzimszintézis.

Linearitás/lineáris kinetika: Egy folyamat kinetikai szempontból akkor lineáris, ha a kompartmentek közötti átvitel sebessége arányos a jelen lévő mennyiségekkel vagy koncentrációkkal, azaz elsőrendű. Következésképpen a kiürülési és eloszlási mennyiségek, valamint a felezési idők is állandók. Az elért koncentrációk arányosak az adagolás mértékével (expozícióval), és a felhalmozódás is könnyebben előre jelezhető. A linearitás/nemlinearitás a vonatkozó paraméterek, például a különböző dózisok utáni vagy egyszeri, illetve ismételt expozíció utáni AUC összehasonlításával vizsgálható. A dózistól való függőség hiánya a vegyület metabolizmusában részt vevő enzimek telítődésére, az AUC ismételt expozíciót követő, egyszeri expozícióhoz képesti növekedése pedig a metabolizmus akadályozására utalhat, míg az AUC csökkenése a metabolizmus indukcióját jelezheti (lásd még: (11)).

Tömegmérleg: A vizsgált vegyi anyag szervezetbe bejutott és onnan távozó mennyiségének mérlege.

Anyagmérleg: Lásd: »Tömegmérleg«.

Toxicitás mechanizmusa (módja)/hatásmechanizmus (-mód): A hatásmechanizmus azokat a meghatározott biokémiai interakciókat jelenti, amelyek révén a vizsgált vegyi anyag kifejti hatását. A hatás módja a vizsgált vegyi anyag toxicitásához vezető általánosabb folyamatokat jelenti.

▼M4

Metabolizmus: A biotranszformáció szinonimája.

Metabolitok: A metabolizmus vagy a metabolikus folyamatok termékei.

Szájon át történő felszívódás: A vizsgált vegyi anyag dózisának a bejuttatás helyén (például az emésztőrendszerben) felszívódott százaléka. Ez a kritikus paraméter felhasználható a bejuttatott vizsgált vegyi anyag azon frakciójának megismeréséhez amely eléri a portális vénát, majd a májat.

Megoszlási hányados: Más néven megoszlási együttható; egy vegyi anyag két oldószerben fennálló különböző oldhatóságát fejezi ki.

Vérben (plazmában/szérumban) megfigyelhető legmagasabb szintek: A bejuttatást követő maximális (legmagasabb) koncentráció a vérben (plazmában/szérumban) (lásd még: »C_{max}«).

Perzisztencia (bioperzisztencia): Az adott vegyi anyag hosszú távú jelenléte (egy biológiai rendszerben) a lebomlásnak/eltávolításnak való ellenállás következtében.

Read-across módszer: Egy vagy több vegyi anyag végponti információinak felhasználása a célvegyszer végpontjának előrejelzéséhez.

Receptoros mikroszkopikus autoradiográfia (vagy receptoros mikroautoradiográfia): Ez a technológia a meghatározott szöveti helyekkel vagy sejtpopulációkkal történő xenobiotikus interakció vizsgálatára használható, például a receptorkötéssel vagy meghatározott hatásmóddal foglalkozó vizsgálatok során, amelyek nagy felbontást és magas fokú érzékenységet igényelhetnek, és amelyek más technológiákkal, például egésztest-autoradiográfiával nem megvalósíthatók.

Bejuttatási útvonal (szájon át történő, intravénás, bőrön át történő, belélegeztetéssel történő stb.): A vegyi anyagok testbe történő bejuttatásának módját jelenti (például szájon át szondatáplálással, szájon át táplálékkal, bőrön át, belélegeztetéssel, intravénásan stb.).

Telítettség: Az az állapot, amikor egy vagy több kinetikai folyamat (például felszívódás, metabolizmus vagy kiürülés) eléri a maximumát (azaz »telítetté« válik).

Érzékenység: Egy módszer vagy eszköz azon képessége, hogy meg tudja különböztetni az adott változó különböző szintjeire utaló mérési eredményeket.

Állandósult vér- (plazma-) szintek: Egy nyílt rendszer nem egyensúlyi állapota, amelyben a rendszerre ható összes hatást pontosan kiegyenlítik az ellentétes hatások, oly módon, hogy a rendszer összes összetevőjének koncentrációja állandó annak ellenére, hogy a rendszeren anyag áramlik keresztül.

Rendszermodell (élettani alapú toxikokinetikai, farmakokinetikai alapú, élettani alapú farmakokinetikai, biológiai alapú stb.): Egy rendszer viselkedését a matematika nyelvén leíró absztrakt modell.

Célszövet: Az a szövet, amelyben egy toxikus anyag valamely elsődleges negatív hatása megmutatkozik.

▼M4

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely vegyi anyag vagy keverék.

Szöveti eloszlás: A vizsgált vegyi anyagnak a test egyik helyéről a másikra történő, visszafordítható mozgása. A szöveti megoszlás a szerv feltárása, homogenizáció, oxidáció és folyadékszcintillációs számlálás, vagy minőségi és/vagy mennyiségi egésztest-autoradiográfia segítségével vizsgálható. Az előbbi hasznos az ugyanazon állatok szöveteiből és maradványaiból visszanyert vizsgált vegyi anyag koncentrációjának és százalékos arányának meghatározásához, de felbontása nem feltétlenül megfelelő az összes szövet vizsgálatához, és lehet, hogy általánosságban nem képes elérni a visszanyert vegyi anyag ideális mennyiségét (< 90 %). Az utóbbi meghatározását lásd fent.

$\mathbf{T_{max}}$: A C_{max} eléréséhez szükséges idő.

Toxikokinetika (farmakokinetika): Vegyi anyagok időbeli felszívódásának, eloszlásának, metabolizmusának és kiürülésének vizsgálata.

Modellek validációja: Egy modell rendelkezésre álló toxikokinetikai adatok konzisztens leírására való megfelelősége értékelésének folyamata. A modelleket azok előrejelzéseinek a kísérleti értékekkel történő statisztikai és vizuális összehasonlításával lehet értékelni egy közös, független változó (például az idő) alapján. Az értékelés mértékét indokolni kell a modell tervezett használata vonatkozásában.

▼B

B.37. SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT AKUT KÉSLELTETETT NEUROTOXICITÁS

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

Az egyes anyagok toxikus hatásainak felbecslése és kiértékelése során fontos azt figyelembe venni, hogy az anyagok egyes osztályai bizonyos típusú neurotoxicitást okozhatnak, amelyet esetleg nem lehet bebizonyítani más típusú toxicitásvizsgálatokkal, de szükséges a vizsgálata. Egyes foszfororganikus vegyületek a korábbi megfigyelések szerint késleltetett neurotoxikus hatásokat okoznak, ezek azok az anyagok, amelyeknek az e (alábbiakban ismertett) módszer szerinti vizsgálata szóba jöhet.

In vitro szűrővizsgálatokat lehet alkalmazni azoknak az anyagoknak a meghatározása céljából, amelyek késleltetett polyneuropathiát okozhatnak; mindazonáltal az *in vitro* vizsgálatok negatív eredménye nem biztosíték arra, hogy az anyag nem idegméreg.

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

A foszfororganikus vegyületekhez tartoznak azok a telítetlen foszfororganikus észterek, a tioészterek vagy a szerves foszforsavak, a foszfonsavak és a foszforamid-savak anhidridjei, illetve a rokon foszfortiosav, foszfontiosav vagy foszfortioamid-sav, továbbá egyéb anyagok, amelyek ebbe a vegyületosztályba tartoznak, és olykor megfigyelhető késleltetett neurotoxicitást okozhatnak.

Késleltetett neurotoxicitás az a tünetcsoport, amely a hosszan késleltetett végtagmozgási zavarokkal (ataxia), a gerincvelő és a környéki (perifériás) idegek távoli kötődéseivel és az idegszövetben lévő neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlásával vagy öregedésével kapcsolatos.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Egy referenciaanyagot meg lehet vizsgálni egy pozitív kontrollcsoport segítségével azzal a céllal, hogy bemutassák, hogy laboratóriumi vizsgálati körülmények között a kísérleti fajok reakciója nem változik lényegesen.

Példa egy széleskörűen alkalmazott idegméregre a tri-o-tolil-foszfát (CAS 78-30-8, EINECS 210-103-5, CAS-elnevezése: Foszforsav-trisz(4-metilfenil)-észter, más néven Trikrezil-foszfát.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot egy dózisban, szájon keresztül adják be házityúkoknak, amelyeket szükség esetén megóvtak az akut kolinerg hatásoktól. Az állatokat 21 napon keresztül figyelik meg viselkedési rendellenességek, ataxia és paralízis szempontjából. A biokémiai paramétereket, különösen a neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlását minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott tyúkokon mérik, általában az adagolás után 24–48 órával. Az adagolás után 21 nappal az életben maradt tyúkokat elpusztítják, és egyes idegszövetek kórszövettani vizsgálatát elvégzik.

▼B

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Előkészületek**

Egészséges, fiatal, felnőtt tyúkokkal kísérleteznek, amelyek mentesek a zavaró vírusos betegségektől és gyógykezeléstől, továbbá nincs járászavaruk; az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportba osztják és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják őket a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodni.

Olyan ketrecet vagy karámot használnak, amely elég nagy ahhoz, hogy lehetővé tegye a tyúkok szabad mozgását és a járáskép könnyű megfigyelését.

A vizsgált anyagot orálisan adják be, gyomorszonda segítségével, vagy zselatin kapszulák alkalmazásával vagy egyéb hasonló eljárással. A folyadékokat hígítás nélkül vagy megfelelő vivőanyagban, pl. kukoricaolajban feloldva adják be; a szilárd anyagokat lehetőség szerint feloldják, mivel a zselatin kapszulába helyezett nagy mennyiségű szilárd anyag esetleg nem szívódik fel teljesen. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük, eltérő esetben e tulajdonságokat a vizsgálat megkezdése előtt meghatározzák.

1.5.2. **Vizsgálati körülmények**

1.5.2.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

A fiatal felnőtt, 8–12 hónapos házi tojótyúk (*Gallus gallus domesticus*) használata ajánlott. A szokásos méretű fajtákat használják, olyan tyúkokat, amelyeket szabad mozgást biztosító körülmények között tenyésztettek.

1.5.2.2. *Az állatok száma és neme*

A kezelt csoport mellett mind vivőanyagos kontrollcsoportot, mind pozitív kontrollcsoportot vizsgálnak. A vivőanyagos kontrollcsoportban lévő állatokat a vizsgált anyag beadásától eltekintve a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik.

Az egyes csoportokban lévő állatok számát oly módon határozzák meg, hogy legalább hat madarat el lehessen pusztítani a biokémiai paraméterek meghatározásaihoz (hármat-hármat a két külön megfigyelési időpontban); továbbá hat madár túlélje a 21 napos megfigyelési időszakot, mert ezeken patológiai vizsgálatokat végeznek majd.

A pozitív kontrollcsoportot lehet egyidejűleg vizsgálni, vagy ez lehet egy korábbi, már vizsgált kontrollcsoport is. Ez a csoport legalább hat tyúkból áll, amelyeket egy ismert, késleltetett hatású idegméreggel kezelnek. Az állatok közül hármat biokémiai, hármat patológiai vizsgálatok céljára szánnak. A korábbi adatok rendszeres aktualizálása javasolt. Új pozitív kontrolladatokat vesznek fel, ha a vizsgálat lefolytatásának valamilyen fontos eleme (pl. származás, táplálék, tartási körülmények) megváltozik a vizsgálatot végző laboratóriumban.

▼B

1.5.2.3. *Adagolási szintek*

Az előzetes tanulmány során megfelelő számú állatnak és adagolási csoportnak a fő kísérletben alkalmazott dózist adagolják. Csekély számú kísérleti állat elhullása általában szükséges ebben az előzetes tanulmányban, a fő vizsgálat megfelelő dózisszintjeinek kiválasztásához. Az akut kolinerg hatások miatt bekövetkező elhullások megakadályozása érdekében atropint vagy egyéb olyan védő hatóanyagot alkalmazhatnak, amely közismerten nem befolyásolja a késleltetett neurotoxikus hatásokat. Többféle vizsgálati módszer alkalmazható a vizsgált anyag legnagyobb nem halálos dózisának meghatározásához (lásd B.1.A. módszer). A tyúkokra vonatkozó korábbi adatok vagy egyéb toxikológiai adatok is hasznosnak bizonyulhatnak a dózis kiválasztása során.

A fő vizsgálat során alkalmazott vizsgált anyag dózisa az előzetes dózisbehatároló vizsgálat eredményeinek figyelembevételével meghatározott lehető legmagasabb legyen, 2 000 mg/kg testsúly felső határ mellett. Esetleg előforduló időközbeni elhullás nem gátolhatja meg a szükséges mennyiségű állat túlélését a biokémiai (hat) és a szövettani (hat) vizsgálatokhoz a 21. napon. Az akut kolinerg hatások miatt bekövetkező elhullást atropinnal vagy egyéb védő hatóanyag alkalmazásával kerülik el, amely bizonyított módon nem gyakorol befolyást a késleltetett neurotoxikus hatásokra.

1.5.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha a kísérlet során a legalább 2 000 mg/kg testsúly/nap adagolási szint, illetve az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazható, kivéve ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.5.3. **Megfigyelési időszak**

A megfigyelési időszak 21 nap.

1.5.4. **A kísérlet végrehajtása**

Az akut kolinerg hatások miatt bekövetkező elhullás megakadályozása érdekében alkalmazott védő anyag beadása után a vizsgált anyagot egyszeri dózisban adják be.

M e g f i g y e l é s e k

A megfigyelés mindjárt közvetlenül az expozíció után megkezdődik. Az első 2 napon minden tyúkot többször gondosan megfigyelnek, majd ezt követően 21 napon keresztül vagy a tervezett elpusztításig, legalább naponta egyszer. A toxicitás minden tünetét gondosan feljegyzik, beleértve a viselkedési rendellenesség kialakulásának időpontját, típusát, súlyosságát és tartamát. A végtagok mozgási zavarát (ataxia) skálán mérik, amely legalább négy szintet tartalmaz, továbbá a bénulást (paralízis) is feljegyzik. Hetente legalább kétszer kiveszik a ketrecből azokat a tyúkokat, amelyeket patológiai vizsgálatoknak szándékoznak alávetni, és egy meghatározott időre fokozott motoros tevékenységet váltanak ki (pl. létramászás), hogy már a legkisebb jelentkező toxikus hatások megfigyelhetőségét megkönnyítsék. A haldokló állatokat és súlyosan szenvedő, vagy fájdalommal küszködő állatokat az állatvédelmi előírásoknak megfelelően elpusztítják, majd felboncolják.

▼B

Testsúly

Minden tyúkot lemérnek közvetlenül a vizsgált anyag beadása előtt, majd ezután legalább hetente egyszer.

Biokémiai vizsgálatok

Minden kezelt és vivőanyag kontrollcsoportból hat tyúkot, a pozitív kontrollcsoportból hármat (ha egyidejűleg ezt a csoportot is vizsgálják) véletlenszerűen kiválasztanak és a vizsgált anyag beadása után pár nappal elpusztítanak, azért hogy az agyat és a lumbális gerincvelőt preparálják, és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitást megmérik. Ezen túlmenően hasznos lehet az ülőideg kikészítése és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitásának megmérése. Általában három madarat pusztítanak el mind a kezelt csoportokban, mind a negatív kontrollcsoportban az utolsó dózis után 24 órával, és másik hármat 48 órával később, a pozitív kontrollcsoportból származó három kísérleti állatot 24 órával később pusztítják el. Ha az intoxikáció klinikai tüneteinek megfigyeléséből (pl. a kolinerg tünetek időbeli jelentkezésének megfigyeléséből) arra lehet következtetni, hogy a toxikus hatóanyag kifejezetten lassan hat, akkor ajánlatos mind a három állattól két alakalommal 24–72 órával a vizsgált anyag adagolását követően szövetmimtákat venni.

Acetil-kolin észteráz (AChE) elemzését is el lehet végezni ezeken a mintákon, ha az célszerűnek tűnik. Figyelembe kell azonban venni az AChE spontán újraaktiválódását, amely *in vivo* előfordulhat, és így az anyag AChE gátló hatásának alulértékelését okozhatja.

Autopszia

Minden (a tervezett módon és a haldoklás miatt állatvédelmi okokból elpusztított) állat agyát és gerincvelőjét boncolásnak vetik alá.

Kórszövettani vizsgálat

A vizsgálati időszakot túlélő és azon állatok idegszöveteit, amelyeket nem biokémiai kísérleteknek vetnek alá, mikroszkóppal megvizsgálják. A szöveteket perfúziós módszerrel természetes helyzetben (*in situ*) tartósítják. A metszetek tartalmazzák a kisagyat (középső hosszanti szinten), a nyúltagyat, a gerincvelőt és a környéki (perifériás) idegeket. Gerincvelő-metszeteket a felső nyaki, a középső mellkasi és az ágyékkeresztcsonti szakaszból veszik. A környéki idegi metszeteket a sípcsonti ideg és gyomorizomhoz tartó elágazásaiból és az ülőidegből veszik. A metszeteket megfestik a megfelelő mielinre és axonra érzékeny festékkel. Először elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot minden állat tartósított szövetein a kontroll- és a legnagyobb adagolású csoportnál. Ha bizonyítható a hatás a legnagyobb adagolású csoportnál, akkor elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot a középső és az alacsony adagolású csoport állatainak szövetein is.

2. **ADATOK**

Az ebben a módszerben a kiválasztott végpontokon kapott negatív eredmények (biokémia, kórszövettan és viselkedési megfigyelések) általános esetben nem igényelnek további vizsgálatot a késleltetett neurotoxicitás vonatkozásában. Bizonytalan vagy nem meggyőző eredmények esetén szükség lehet további vizsgálatokra.

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik. Ebből a kísérleti állatok minden csoportja tekintetében kiderül: a kísérlethez felhasznált álltok száma a vizsgálat elején, a sérült állatok száma, viselkedési vagy biokémiai hatások, a sérülések, illetve hatások típusa, súlyossága és az egyes sérüléseket vagy hatásokat mutató állatok százalékos eloszlása, típus és súlyosság szerint csoportosítva.

▼B

E vizsgálat eredményeit az egyes kezelt és kontrollcsoportok tekintetében viselkedési, biokémiai és kórszövettani hatások gyakorisága, súlyossága, korrelációja, valamint bármely más megfigyelt hatás alapján értékelik ki.

A számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel értékelik ki. Az alkalmazott statisztikai módszereket a vizsgálat tervezése során választják ki.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – tartalmazza a következő információkat:

3.1. Kísérleti állatok

— a felhasznált állatok faja,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok eredete, tartási körülmények stb.,

— az egyes állatok súlya a vizsgálat kezdetekor.

3.2. Vizsgálati körülmények

— a vizsgált anyag előkészítésére, stabilitására és homogenitására vonatkozó részletek,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag beadására vonatkozó adatok,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,

— a dózis kiválasztásának indoka,

— a beadott dózisok jellemzése, beleértve a vivőanyagot, térfogatot és a beadott anyag fizikai formáját,

— bármely beadott védőanyag nevét, illetve beadására vonatkozó adatokat.

3.3. Eredmények

— testsúlyadatok,

— a toxikus reakciókra vonatkozó adatok csoportonként, beleértve az elhullást,

— a megfigyelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek vagy nem),

— a biokémiai módszerek részletes leírása és eredményei,

— boncolási eredmények,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható.

Az eredmények tárgyalása

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

Ez a módszer megfelel az OECD TG 418-nak.

▼B

B.38. **SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEKKEL KIVÁLTOTT KÉSLELTETETT NEUROTOXOCITÁS-VIZSGÁLAT, 28 NAPOS ISMÉTELT ADAGOLÁS ESETÉN**

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

Az egyes anyagok toxikus hatásainak felbecslése és kiértékelése során fontos azt figyelembe venni, hogy az anyagok egyes osztályai bizonyos típusú neurotoxicitást okozhatnak, amelyet esetleg nem lehet bebizonyítani más típusú toxicitásvizsgálatokkal, de szükséges a vizsgálata. Egyes foszfororganikus vegyületek a korábbi megfigyelések szerint késleltetett neurotoxikus hatásokat okoznak, ezek azok az anyagok, amelyeknek az e (alábbiakban ismerteti) módszer szerinti vizsgálata szóba jöhet.

In vitro szűrővizsgálatokat lehet alkalmazni azoknak az anyagoknak a meghatározása céljából, amelyek késleltetett polyneuropathiát okozhatnak; mindazonáltal az *in vitro* vizsgálatok negatív eredménye nem biztosíték arra, hogy az anyag nem idegméreg.

Ez a 28 napos késleltetett neurotoxicitást vizsgáló tanulmány ismereteket szolgáltat azokról a lehetséges egészségügyi veszélyekről, amelyek adott időn keresztül ismétlődő expozíció során fennállhatnak. Ezen vizsgálat eredményeiből következtetéseket lehet levonni a dózis-hatás viszonyra, valamint lehetővé teszi annak a küszöbdózisnak a meghatározását, amelynél nem észlelhető kedvezőtlen hatás (NOAEL), és amely hasznos lehet az emberi expozíció biztonsági kritériumainak meghatározása során.

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

A foszfororganikus vegyületekhez tartoznak azok a telítetlen foszfororganikus észterek, a tioészterek vagy a szerves foszforsavak, a foszfonsavak és a foszforamid-savak anhidridjei, illetve a rokon foszfortiosav, foszfontiosav vagy foszfortioamid-sav, továbbá egyéb anyagok, amelyek ebbe a vegyületosztályba tartoznak, és olykor megfigyelhető késleltetett neurotoxicitást okozhatnak.

Késleltetett idegmérgezés az a tünetcsoport, amely a hosszan késleltetett végtagmozgási zavarokkal (ataxia), a gerincvelő és a környéki (perifériás) idegek távoli kötődéseivel és az idegszövetben lévő neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlásával vagy öregedésével kapcsolatos.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot naponta egyszer, szájon át adják be házityúkoknak 28 napon keresztül. Az állatokat az utolsó dózis beadását követően 14 napon keresztül figyelik, legalább naponta egyszer a viselkedési rendellenességek, ataxia és paralízis szempontjából. A biokémiai paramétereket, különösen a neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlását minden csoportból véletlenszerűen kiválasztott tyúkokon mérik, általában az adagolás után 24–48 órával. Az adagolás után két héttel az életben maradt tyúkokat elpusztítják, és az egyes idegszövetek kórszövettani vizsgálatát elvégzik.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

Egészséges, fiatal, felnőtt tyúkokkal kísérleteznek, amelyek mentesek a zavaró vírusos betegségektől és gyógykezeléstől, továbbá nincs járászavaruk; az állatokat véletlenszerűen kezelt és kontrollcsoportba osztják, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják őket a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodni.

Olyan ketrecet vagy karámot használnak, amely elég nagy ahhoz, hogy lehetővé tegye a tyúkok szabad mozgását és a járáskép könnyű megfigyelését.

A vizsgált anyagot heti hét napon át orálisan adják be, gyomorszonda segítségével, vagy zselatin kapszulák alkalmazásával. A folyadékokat hígítás nélkül vagy megfelelő vivőanyagban, pl. kukoricaolajban feloldva adják be; a szilárd anyagokat lehetőség szerint feloldják, mivel a zselatin kapszulába helyezett nagy mennyiségű szilárd anyag esetleg nem szívódik fel teljesen. Amennyiben nem víz a vivőanyag, akkor a vivőanyag toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük, eltérő esetben e tulajdonságokat a vizsgálat megkezdése előtt meghatározzák.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Kísérlethez felhasznált állatok*

A fiatal felnőtt, 8–12 hónapos házi tojótyúk (*Gallus gallus domesticus*) használata ajánlott. A szokásos méretű fajtákat használják, olyan tyúkokat, amelyeket szabad mozgást biztosító körülmények között tenyésztettek.

1.4.2.2. *Az állatok száma és neme*

Általában a három kezelt csoport mellett vivőanyagos kontrollcsoportot is vizsgálnak. A vivőanyagos kontrollcsoportban lévő állatokat a vizsgált anyag beadásától eltekintve a kezelt csoportba beosztottakkal azonos bánásmódban részesítik.

Az egyes csoportokban lévő állatok számát oly módon határozzák meg, hogy legalább hat madarat el lehessen pusztítani a biokémiai paraméterek meghatározásaihoz (hármat-hármat a két külön megfigyelési időpontban); továbbá hat madár túlélje 14 nappal az utolsó beadott adagot, mert ezeken patológiai vizsgálatokat végeznek majd.

1.4.2.3. *Adagolási szintek*

Az adagolási szintek kiválasztásánál figyelembe veszik a késleltetett neurotoxicitás (akut) megállapítására elvégzett vizsgálat eredményeit és a vizsgált anyag toxicitásra, illetve kinetikájára vonatkozóan rendelkezésre álló adatokat. A legmagasabb dózist úgy választják ki, hogy az toxikus tüneteket keltsen, de ne okozzon halált, vagy súlyos szenvedést a kísérleti állatoknak. Ezután az adagokat fokozatosan csökkentik, azzal a céllal, hogy bemutassák az adagolási szinttől függő hatásokat és a nem észlelhető kedvezőtlen hatás szintet.

▼B

1.4.2.4. *Határérték-vizsgálat*

Ha a kísérlet során a legalább 1 000 mg/kg testsúly/nap adagolási szint, illetve az e vizsgálat lefolytatására előírt eljárás betartása mellett a vizsgált anyag nem okoz észlelhető toxikus hatásokat, és ha a szerkezet tekintetében rokon anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható a toxicitás bekövetkezése, akkor a teljes, három adagolási szintet átfogó tanulmány elvégzése szükségtelennek tekinthető. A határérték-vizsgálat alkalmazható, kivéve ha emberi expozíció ennél nagyobb adagolási szint használatát indokolja.

1.4.2.5. *Megfigyelési időszak*

Minden állatot legalább naponta megfigyelnek az expozíció időszaka alatt, majd azt követően 14 napon keresztül, kivéve ha tervezett boncolást hajtanak végre.

1.4.3. **A kísérlet végrehajtása**

Az állatoknak 28 napon keresztül hetente hétszer adják be a vizsgálati anyagot.

M e g f i g y e l é s e k

A megfigyelés mindjárt közvetlenül a kezelés kezdetétől tart. A kezelés mind a 28 napján majd az utolsó adag beadását követően 14 napon át vagy a tervezett elpusztításig legalább naponta egyszer megfigyelnek minden állatot. A toxicitás minden tünetét gondosan feljegyzik, beleértve kialakulásuk időpontját, a típust, súlyosságot és tartamot. A megfigyelések kiterjednek viselkedési rendellenességekre is. A végtagok mozgási zavarát (ataxia) skálán mérik, amely legalább négy szintet tartalmaz, továbbá a bénulást (paralízis) is feljegyzik. Hetente legalább kétszer kiveszik a ketrecből az állatokat, és egy meghatározott időre fokozott motoros tevékenységet váltanak ki (pl. létramászás), hogy már a legkisebb jelentkező toxikus hatások megfigyelhetőségét megkönnyítsék. A haldokló állatokat és súlyosan szenvedő vagy fájdalommal küszködő állatokat az állatvédelmi előírásoknak megfelelően elpusztítják, majd felboncolják.

T e s t s ú l y

Minden tyúkot lemérnek közvetlenül a vizsgált anyag beadása előtt, majd ezután legalább hetente egyszer.

B i o k é m i a i v i z s g á l a t o k

Minden kezelt és vivőanyag kontrollcsoportból hat tyúkot kiválasztanak véletlenszerűen, és a vizsgált anyag utolsó beadása után pár nappal elpusztítanak, azért hogy az agyat és a lumbális gerincvelőt preparálják, és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitást megmérjék. Ezen túlmenően hasznos lehet az ülőideg kikészítése és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) gátló aktivitásának megmérése. Általában három madarat pusztítanak el mind a kezelt csoportokban, mind a kontrollcsoportban az utolsó dózis után 24 órával és másik hármat 48 órával később. Ha az akut vizsgálatból vagy más kísérletekből (pl. toxikokinetikai) arra lehet következtetni, hogy az utolsó adag beadását követően a fentiektől eltérő időpontban fognak mutatkozni a pusztulás jelei, akkor a kísérlet menetét ennek megfelelően megváltoztatják, és meg is indokolják a döntést.

Az acetil-kolin-észteráz (AChE) elemzését is el lehet végezni a mintákon, ha az célszerűnek látszik. Figyelembe kell azonban venni az AChE spontán újraaktiválódását, amely *in vivo* előfordulhat, és így az anyag AChE gátló hatásának alulértékelését okozhatja.

▼B

Autopszia

Minden (a tervezett módon és a haldoklás miatt állatvédelmi okokból elpusztított) állat agyát és gerincvelőjét boncolásnak vetik alá.

Kórszövettani vizsgálatok

A vizsgálati időszakot túlélő és azon állatok idegszöveteit, amelyeket nem biokémiai kísérleteknek vetnek alá, mikroszkóppal megvizsgálják. A szöveteket perfúziós módszerrel természetes helyzetben (*in situ*) tartósítják. A metszetek tartalmazzák a kisagyat (középső hosszanti szinten), a nyúltagyat, a gerincvelőt és a környéki (perifériás) idegeket. Gerincvelő-metszeteket a felső nyaki, a középső mellkasi és az ágyékkeresztcsonti szakaszból veszik. A környéki idegi metszeteket a sípcsonti ideg és gyomorizomhoz tartó elágazásaiból és az ülőidegből veszik. A metszeteket megfestik a megfelelő mielinre és axonra érzékeny festékkel. Először elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot minden állat tartósított szövetein a kontroll- és a legnagyobb adagolású csoportnál. Ha bizonyítható a hatás a legnagyobb adagolású csoportnál, akkor elvégzik a mikroszkópos vizsgálatot a középső és az alacsony adagolású csoport állatainak szövetein is.

2. **ADATOK**

Az ebben a módszerben a kiválasztott végpontokon kapott negatív eredmények (biokémia, kórszövettan és viselkedési megfigyelések) általános esetben nem igényelnek további vizsgálatot a késleltetett neurotoxicitás vonatkozásában. Bizonytalan vagy nem meggyőző eredmények esetén szükség lehet további vizsgálatokra.

Minden egyes állattal kapcsolatban rögzítik az adatokat. Ezenfelül az összes adatot táblázat formájában összegzik. Ebből a kísérleti állatok minden csoportja tekintetében kiderül: a kísérlethez felhasznált álltok száma a vizsgálat elején, a sérült állatok száma, viselkedési vagy biokémiai hatások, a sérülések, illetve hatások típusa, súlyossága és az egyes sérüléseket vagy hatásokat mutató állatok százalékos eloszlása, típus és súlyosság szerint csoportosítva.

E vizsgálat eredményeit az egyes kezelt és kontrollcsoportok tekintetében viselkedési, biokémiai és kórszövettani hatások gyakorisága, súlyossága, korrelációja, valamint bármely más megfigyelt hatás alapján értékelik ki.

A számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel értékelik ki. Az alkalmazott statisztikai módszereket a vizsgálat tervezése során választják ki.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés – amennyiben lehetséges – a következő információkat tartalmazza:

3.1. Kísérleti állatok

— a felhasznált állatok faja,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok eredete, tartási körülmények stb.,

— az egyes állatok súlya a vizsgálat kezdetekor.

▼B

3.2. Vizsgálati körülmények

— a vizsgált anyag előkészítésére, stabilitására és homogenitására vonatkozó részletek,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vizsgálati anyag beadására vonatkozó adatok,

— táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok,

— a dózis kiválasztásának indoka,

— a beadott dózisok jellemzése, beleértve a vivőanyagot, térfogatot és a beadott anyag fizikai formáját,

— a biokémiai paraméterek meghatározásra választott időpontok indoklása, ha az 24 és 48 órától eltér.

3.3. Eredmények

— testsúlyadatok,

— a toxikus reakciókra vonatkozó adatok csoportonként, beleértve az elhullást,

— nem észlelhető kedvezőtlen hatás, NOAEL,

— a megfigyelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek, vagy nem),

— a biokémiai módszerek részletes leírása és eredményei,

— boncolási eredmények,

— az összes kórszövettani lelet részletes leírása,

— az eredmények statisztikai feldolgozása, ha alkalmazható.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

Ez a módszer megfelel az OECD TG 419-nek.

▼B

B.39. NEM ÜTEMEZETT DNS-SZINTÉZIS (UDS) *IN VIVO* VIZSGÁLAT EMLŐS MÁJSEJTEKKEL

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 486-nak, emlősmáj-sejtekkel végrehajtott nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) *in vivo* vizsgálat (1997).

1.1. BEVEZETÉS

Az emlősmáj-sejtekkel végzett nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) *in vivo* vizsgálat célja azon anyagok meghatározása, amelyek DNS-reparációt váltanak ki a kezelt állatok májsejtjeiben (1) (2) (3) (4).

Ez az *in vivo* vizsgálat lehetővé teszi a kémiai anyagoknak a májban okozott genotoxikus hatásainak vizsgálatát. A vizsgált végpont következtetni enged a májsejtekben a DNS-károsodásra és az ezt követő reparációra. A máj rendszerint az abszorbeált vegyületek metabolizmusának fő helyszíne. Ebből következően megfelelő hely DNS-károsodás *in vivo* vizsgálatára.

Ha bizonyos jelek utalnak arra, hogy a vizsgált anyag nem éri el a célszövetet, akkor e vizsgálat nem megfelelő.

A nem ütemezett DNS-szintézis (UDS) végpontját a megjelölt nukleozidok felvételének meghatározásával lehet mérni azon sejtekben, amelyek nem mennek keresztül az ütemezett (S fázisú) DNS-szintézisen. A legelterjedtebben használt módszer a tríciummal megjelölt timidin (^{3}H-TdR) felvételének meghatározása autoradiográfiával. Az *in vivo* UDS-vizsgálatokban lehetőleg patkánymájat kell használni. Májszövetektől eltérő szövetek is használhatók, de ezek nem képezik e módszer tárgyát.

Az UDS-reakció észlelése a károsodás helyén a kivágott és helyettesített DNS-bázisok számától függ. Ezért tehát az UDS-vizsgálat különösen értékes az anyag által indukált hosszú szakaszú („long-patch reparáció” 20–30 bázispár) észlelésére. Ezzel ellentétben a rövid szakaszú („short-patch reparáció” 1–3 bázis) jóval kisebb érzékenységgel észlelhető. Ezenkívül mutagén hatások jöhetnek létre DNS-elváltozások helyre nem állítása, nem megfelelő helyreállítása vagy hibás replikációja miatt. Az UDS-reakció mértéke nem ad jelzést a reparációs folyamat megbízhatóságáról. Ezenkívül előfordulhat, hogy valamely mutagén reakcióba lép a DNS-sel, de nem történik meg a DNS-károsodás helyreállítása kivágásos reparáció révén (excision repair). A mutagénaktivitással kapcsolatban az UDS-vizsgálat által biztosított speciális információk hiányát e végpontnak a potenciális érzékenysége kompenzálja, mivel ennek mérése a teljes genomban történik.

Lásd még az Általános bevezetés B. részét is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Reparálódó sejtek: a vizsgálatot végző laboratórium által előre megadott értéknél magasabb nettó sejtmagi szemcseszám (net nuclear grain, NNG).

Nettó sejtmagi szemcseszám (NNG): az autoradiográfiás UDS-vizsgálatokban az UDS-aktivitás kvantitatív mértéke, amit úgy lehet megkapni, hogy a sejtmagi szemcsék számából (NG) le kell vonni a sejtmaggal azonos területű citoplazmára eső szemcsék számát(CG): NNG = NG – CG. Minden egyes sejthez ki kell számítani az NNG-számokat, majd valamennyi tenyészetre és a párhuzamos tenyészetre is.

▼B

Nem ütemezett DNS-szintézis (UDS): kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS-károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS-szintézis.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az emlősmáj-sejtekkel végrehajtott *in vivo* UDS-vizsgálat a kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS-károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS-szintézis. A vizsgálat rendszerint ^{3}H-TdR-nek a májsejtek DNS-ébe való beépítésén alapul, ahol csak kisszámú sejt található az S-fázisban. A ^{3}H-TdR felvételét rendszerint autoradiográfiásan határozzuk meg, mivel e módszer kevésbé érzékeny az S-fázisú sejtek zavaró hatására, mint például a folyadékszcintillációs módszer.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *A kísérlethez felhasznált állatok*

Rendszerint patkányokat használnak, de bármilyen megfelelő emlős használata szóba jöhet. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat használnak. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, és a nemenkénti átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet.

1.4.1.2. *Tartási és etetési körülmények*

Az Általános bevezetés B. részében ismertetett általános körülményeket kell alkalmazni, bár a páratartalom értékének 50–60 % között kell lennie.

1.4.1.3. *Az állatok előkészítése*

Az egészséges, fiatal, ivarérett állatokat véletlenszerűen kontroll- és kezelt csoportokba osztják. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisak legyenek az elhelyezés miatti esetleges hatások. Ezt követően az állatokat egyenként kell azonosítani. Az állatokat legalább öt napig szoktatják a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. *Vizsgált anyag/előkészület*

Az adagolás előtt a szilárd vizsgált anyagokat fel kell oldani vagy szuszpendálni megfelelő oldószerekben vagy vivőanyagokban, és hígítani, ha szükséges. A folyékony vizsgált anyagok közvetlenül adagolhatók vagy hígíthatók. A vizsgált anyagból mindig friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve ha az anyag tárolás során való stabilitása bizonyított.

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *Oldószer/vivőanyag*

Az oldószer nem okozhat toxikus hatásokat a kiválasztott dózisok mellett, valamint nem alkalmazható olyan anyag, amely gyaníthatóan kémiai reakcióba lép a vizsgált anyaggal. Jól ismert oldószerektől eltérő oldószerek/vivőanyagok használatakor azok felhasználását alá kell támasztani a kompatibilitásukat bizonyító adatokkal. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

▼B

1.4.2.2. *Kontrollok*

Minden kísérlethez egyidejűleg pozitív és negatív (oldószer/-vivőanyag) kontrollokat alkalmazunk. A vizsgált anyaggal való kezelés kivételével a kontrollcsoportokba beosztott állatokat azonos bánásmódban kell részesíteni a kezelt csoportokban lévő állatokkal.

A pozitív kontrollanyagoknak olyan anyagoknak kell lenniük, amelyekről ismert, hogy létrehoznak UDS-t olyan expozíciós szinten való beadáskor, amelyről várható, hogy a háttérszintet meghaladó észlelhető növekedést biztosít. Azon pozitív kontrollokat, amelyek metabolikus aktiválást igényelnek, olyan dózisban kell alkalmazni, ami mérsékelt reakciót vált ki (4). A dózisokat úgy választjuk ki, hogy a hatás egyértelmű legyen, de ne lepleződjön le azonnal a kódolt tárgylemezek identitása a leolvasásnál. A következő pozitív kontrollanyagok jöhetnek szóba:

Mintaveteli idők	Anyag	CAS-szám	EINECS-szám
Korai mintavételi idők (2–4 óra)	N-Nitrozo-dimetil-amin	62-75-9	200-249-8
Késői mintavételi idők (12–16 óra)	2-acetamido-fluorén (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Más megfelelő pozitív kontrollanyagok is használhatók. Elfogadható a pozitív kontrollanyagok vizsgált anyagtól eltérő módon való adagolása.

1.5. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.5.1. **Állatok száma és neme**

Megfelelő számú állatot kell használni, azért hogy a vizsgált anyagra adott reakció során a természetes biológiai eltérést figyelembe lehessen venni. Csoportonként legalább három elemezhető állatnak kell lennie. Ahol az eddigiek során már jelentős adatbázist gyűjtöttünk össze, csak egy vagy két kísérleti állat szükséges az egyidejűleg alkalmazott negatív és pozitív kontrollcsoportokhoz.

Ha a tanulmány végrehajtásakor rendelkezésre állnak olyan adatok azonos fajták és azonos expozíciósmód használata mellett, amelyek azt mutatják, hogy nincsenek jelentős különbségek a nemek között a toxicitás tekintetében, elegendő lesz egyetlen nemhez tartozó állatok, lehetőleg a hímek vizsgálata. Ahol az emberek esetében az expozíció nemre jellemző lehet, mint például néhány gyógyszer esetében, a vizsgálatot a megfelelő nemű állatokkal kell elvégezni.

1.5.2. **Kezelési menetrend**

A vizsgált anyagot rendszerint egyetlen adagban adjuk be.

1.5.3. **Dózisok**

Rendszerint legalább két dózist használnak. A legmagasabb adag az a dózis, ami olyan egyértelmű toxicitásjeleket vált ki, hogy annál magasabb adagok, azonos adagolás mellett, várhatóan halált okoznak. Az alacsonyabb dózis a legmagasabb dózis 25–50 %-a.

▼B

Specifikus biológiai hatású anyagok alacsony, nem toxikus adagok mellett (ilyenek például a hormonok és mutagének), adott esetben lehetséges, hogy nem felelnek meg az adagolási kritériumoknak, ezért ezeket eseti alapon kell értékelni. Ha dózisbehatároló vizsgálatot végeznek, mivel nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, ezt ugyanazon laboratóriumban, ugyanazon fajok, törzs, nem és kezelési rendszer használatával kell elvégezni, mint amelyet a fő vizsgálatban alkalmazunk.

A legnagyobb adag olyan adagként határozható meg, amely a májban a toxicitás valamilyen jelzését (például piknotikus nukleusz) váltja ki.

1.5.4. **Határérték-vizsgálat**

Ha egyetlen alkalmommal vagy ugyanazon a napon két adagban beadott, legalább 2 000 mg/kg testsúlydózis mellett végrehajtott vizsgálat semmilyen megfigyelhető toxikus hatást nem hoz létre, és ha nem várható genotoxicitás szerkezetileg rokon anyagokkal kapcsolatos adatok alapján, akkor nem szükséges a teljes vizsgálatot elvégezni. A várt expozíciós hatások az embernél a határérték-vizsgálatban valamilyen magasabb dózis használatának szükségességét jelezhetik.

1.5.5. **Adagolás**

A vizsgált anyagot rendszerint gyomorszondán át inkubációs kanül segítségével, vagy hasüregbe adott injekció segítségével adják be. Elfogadhatók egyéb expozíciós módok, amennyiben azok indokolhatók. Azonban a hasüregbe való beadás nem ajánlott, mivel ez közvetlenül teheti ki a májat a vizsgált anyag hatásának ahelyett, hogy ez a keringési rendszeren keresztül történne. A gyomorszondán át vagy injekcióval egyszerre beadható maximális folyadékmennyiség a kísérleti állat méretétől függ. A térfogata nem haladhatja meg a 2 ml/100 g testsúly mennyiséget. Ennél nagyobb mennyiségek használatát meg kell indokolni. A magasabb koncentrációértékek esetén rendszerint fokozottabb hatást kiváltó irritatív vagy maró anyagok kivételével, a koncentráció megfelelő beállításával a minimálisra kell csökkenteni a vizsgált anyag mennyiségének változásait, hogy valamennyi dózisszinten konstans mennyiséget lehessen adagolni a kísérleti állatoknak.

1.5.6. **Májsejtek preparációja**

Májsejteket rendszerint 12–16 órával az adagolás után kell venni a kezelt állatokból. Általában szükség van egy további korai mintavételre (rendszerint a kezelés után 2–4 órával), ha nem jön létre egyértelmű, pozitív reagálás a kezelés után 12–16 órával. Azonban használhatók más mintavételi idők, amikor ez indokolt a toxikokinetikai adatok alapján.

Az emlősmáj-sejtek rövid idejű (short term) tenyészeteit rendszerint úgy hozzák létre, hogy a májon *in situ* átáramoltatnak kollagenázt, és lehetővé teszik, hogy a frissen disszociált májsejtek hozzátapadjanak valamilyen alkalmas felülethez. A negatív kontrollállatokból származó májsejteknek legalább 50 %-os életképességűeknek kell lenniük (5).

1.5.7. **UDS meghatározása**

Frissen izolált emlősmáj-sejteket inkubálunk ^{3}H-TdR-t tartalmazó táptalajjal megfelelő időtartamig, például 3–8 órán át. Az inkubációs időszak végén a tápfolyadékot el kell távolítani a sejtekből, amely ekkor többlet, nem megjelölt timidint tartalmazó tápfolyadékkal inkubálható a be nem épült radioaktivitás eltávolítása érdekében („cold chase”). A sejteket ezután le kell öblíteni, fixálni és szárítani. Hosszabb inkubációs idők esetén a cold chase elmaradhat. A lemezeket autoradiografiás emulzióba kell meríteni, sötétben tárolni (például 7–14 napig hűtött helyen tartják), előhívni, megfesteni, majd meg kell számolni az exponált ezüstszemcséket. 2–3 lemezt kell preparálni minden egyes állathoz.

▼B

1.5.8. **Elemzés**

A tárgylemez-preparátumoknak elegendő normál morfológiájú sejtet kell tartalmazniuk ahhoz, hogy elvégezhető legyen az UDS (helyzetet hűen kifejező) kiértékelése. A készítményeket mikroszkóp segítségével vizsgálják meg a nyilvánvaló citotoxicitás jeleit (például piknózis, radioaktív-jelölés csökkent értékei) keresve.

A tárgylemezeket kódolni kell a szemcseszámlálás előtt. Rendszerint 100 sejtet kell kiértékelni minden egyes állat esetében legalább két tárgylemezről; indokolni kell az állatonként kevesebb mint 100 sejt értékelését. Az S-fázisú sejtmagok felett nem kell szemcséket számolni, de feljegyezhető az S-fázisú sejtek aránya.

Alkalmas módszerekkel meg kell határozni a ^{3}H-TdR beépülési arányát a morfológiailag normál sejtek sejtmagjába és citoplazmájába úgy, ahogyan azt az ezüstszemcsék lerakódása mutatja.

2. **ADATOK**

2.1. EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Meg kell adni az egyes tárgylemezekhez és állatokhoz tartozó adatokat. Ezenkívül táblázat formájában össze is kell foglalni minden adatot. Minden egyes sejthez, minden állathoz és minden adaghoz és időhöz ki kell számítani a nettó sejtmagi szemcseszámokat (NNG), amelyet a CG-számoknak az NG-számokból való kivonásával kapunk meg. Ha megszámláljuk a „helyreállított sejteket”, indokoltnak és történeti vagy párhuzamos negatív kontrolladatokon alapulónak kell lennie a „helyreállított sejtek” kifejezés meghatározása kritériumának. A számszerű eredmények statisztikai módszerekkel kiértékelhetők. Ha használunk statisztikai vizsgálatokat, azokat még a kísérlet elvégzése előtt kell kiválasztani, és azt indokolni kell.

2.2. EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

Példák a pozitív/negatív reakció meghatározásának kritériumára:

pozitív
- i. laboratóriumi történeti adatok alapján indokolt, előre beállított küszöbérték fölötti NNG-értékek vagy
- ii. az egyidejűleg elvégzett kontrollnál lényegesen nagyobb NNG-értékek;

negatív
- i. a történeti kontroll küszöbérték alatti NNG-értékek; vagy
- ii. az egyidejűleg elvégzett kontrollnál nem lényegesen nagyobb NNG-értékek.

▼B

Meg kell vizsgálni az adatok biológiai jelentőségét, azaz figyelembe kell venni az olyan paramétereket, mint például az állatok közötti eltérés, dózis-reakció viszony és citotoxicitás. Statisztikai módszerek használhatók a vizsgálati eredmények kiértékelésének elősegítésére. Azonban nem szabad, hogy a statisztikai szignifikancia legyen az egyetlen meghatározó tényező valamely pozitív reagálás megállapítására.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményeket hoz, ritka esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul az is, hogy az eredmények többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradhatnak tekintet nélkül arra, hogy hány alkalommal ismételjük meg a kísérletet.

Az emlősmáj-sejtekkel végrehajtott *in vivo* UDS-vizsgálatból kapott pozitív eredmény azt jelzi, hogy valamely vizsgált anyag olyan *in vivo* DNS-károsodást idéz elő emlősmáj-sejtekben, amely *in vitro* reparálható nem ütemezett DNS-szintézissel. A negatív eredmény azt jelzi, hogy a vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag nem idéz elő e vizsgálattal észlelhető DNS-károsodást.

Értékelni kell annak a valószínűségét, hogy a vizsgált anyag vagy annak metabolitjai eljutnak-e az általános keringési rendszerbe, illetve kifejezetten a célszövetbe (például szisztematikus toxicitás).

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés tartalmazza a következő információkat:

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

— használt fajok/törzs,

— állatok száma, kora és neme,

— az állatok származása, tartási körülmények, étrend stb.,

— az állatok súlya a vizsgálat kezdetekor, az egyes csoportok esetében a testsúlytartományt, átlagértéket és a standard eltérést is ideértve.

Vizsgálati körülmények:

— pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollanyagok,

— a dózisbehatároló vizsgálatból kapott adatok, ha történt ilyen vizsgálat,

— a dózisok kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag előkészítésére vonatkozó részletek,

— a vizsgált anyag beadására vonatkozó részletek,

— a beadási mód megindoklása,

— módszerek annak ellenőrzésére, hogy elérte-e a vizsgált anyag az általános keringési rendszert vagy cél szövetet, ha vannak ilyenek,

▼B

— átszámítás a vizsgált anyagnak a táplálékban/ivóvízben meglévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózisra (mg/kg testsúly/nap), ha ez alkalmazható,

— a táplálék és víz minőségére vonatkozó részletek,

— kezelési és mintavételi menetrendek részletes leírása,

— toxicitás mérésének módszerei,

— májsejt preparálásának és tenyésztésének módszere,

— a használt autoradiográfiás módszer,

— elkészített tárgylemezek száma és értékelt sejtek száma,

— értékelési kritériumok,

— az arra vonatkozó kritériumok, hogy mikor kell a vizsgálatokat pozitívnak, negatívnak vagy többféleképpen magyarázhatónak tekinteni.

Eredmények:

— lemezenkénti, állatonlénti és csoportonkénti sejtmagi és citoplazmai szemcseszámátlagok, nettó sejtmagi szemcseszámátlagok,

— dózis-reakció viszony, ahol lehetséges,

— statisztikai elemzések, ha vannak,

— toxicitás jelei,

— az egyidejűleg elvégzett negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrollokra vonatkozó adatok,

— történeti negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrolladatok tartományokkal, átlagértékekkel és standard eltérésekkel,

— a „helyreállított” sejtek száma, ha meghatározásra került,

— az S-fázisú sejtek száma, ha meghatározásra került,

— a sejtek életképessége.

Az eredmények tárgyalása.

Összefoglaló megállapítások

4. **SZAKIRODALOM**

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. és 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, E., 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. 123–133.

(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*, Mutation Res., 312, pp. 263–285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial 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. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo*/*In vitro* Hepalocyte DNA Repair Assay, Environ. Mutagen, 4, pp. 553–562.

▼B

B.40. *IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: TRANSZKUTÁN ELEKTROMOS REZISZTENCIA VIZSGÁLAT (TER)

1. MÓDSZER

Ez a kísérleti módszer egyenértékű az OECD TG 430 (2004) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

A bőrkorrózió egy vizsgált anyag felvitelét követően a bőrben történt irreverzibilis szövetkárosodás (a veszélyes anyagok és keverékek osztályozásának és címkézésének globális harmonizált rendszere [GHS] meghatározása szerint) (1). Ez a módszer egy olyan eljárást tesz lehetővé, amely során a vizsgálatot nem élő állatokon végzik.

A bőrkorrózió vizsgálata jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot kíván meg (2). A B.4. vizsgálati módszer felülvizsgálata során figyelembe vették az eljárással az állatoknak okozott fájdalom és szenvedés miatti aggodalmakat, és a felülvizsgált módszer már lehetővé teszi a bőrkorrózió alternatív, *in vitro*, fájdalom és szenvedés okozása nélküli módszerekkel történő meghatározását.

A szabályozási célokból végzett bőrkorrózió-vizsgálathoz használható alternatív vizsgálatok meghatározása felé az elővalidálási tanulmányok készítése jelentette az első lépést (3). Ezt követően folyt le a bőrkorrózió vizsgálatára szolgáló *in vitro* módszerek (4) (5) hivatalos hitelesítési vizsgálata (6) (7) (8). E tanulmányok és más publikált szakirodalom következtetései vezettek ahhoz a ajánláshoz, hogy az *in vivo* bőrkorrózió-vizsgálatokhoz (9) (10) (11) a következő vizsgálatok használhatók: az emberi bőrmodellen alapuló vizsgálat (lásd a B.40a vizsgálati módszert) és a transzkután elektromos rezisztenciavizsgálat (ez a módszer).

Egy validálási tanulmány és más publikált tanulmányok arról számoltak be, hogy a patkánybőr esetében a transzkután elektromos rezisztenciára (TER) vonatkozó vizsgálattal (12) (13) megbízhatóan megkülönböztethetők a bőrkorróziót okozó és bőrkorróziót nem okozó ismert anyagok (5) (9).

Az ebben a módszerben leírt vizsgálat lehetővé teszi a korrozív vegyi anyagok és keverékek meghatározását. Lehetővé teszi továbbá a nem korrozív anyagok és keverékek meghatározását, ha más létező információkon alapuló meghatározások bizonyítási súlya ezt alátámasztja (pl. pH, szerkezet-hatás kapcsolat, emberekre és/vagy állatokra vonatkozó adatok) (1) (2) (11) (14). Ez a módszer nem nyújt információt a bőrirritációra vonatkozóan, és nem teszi lehetővé a korrozív anyagoknak a Globális Harmonizált Osztályozási Rendszer (GHS) alapján megengedett alkategóriákba sorolását (1).

Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes kiértékelésére ajánlatos a B.4 vizsgálati módszer (2) függeléke szerinti és a Globális Harmonizált Rendszer (GHS) (1) által meghatározott szekvenciális vizsgálati stratégiát folytatni. E vizsgálati stratégia előírja, hogy *in vitro* bőrkorróziós (az ebben a módszerben leírtak szerint) és bőrirritációs vizsgálatokat kell lefolytatni, mielőtt az élő állatokon végzett vizsgálatokat fontolóra lehetne venni.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

***In vivo* bőrkorrózió**: a bőr irreverzibilis károsodása: nevezetesen egy vizsgálati anyag négy órán át tartó alkalmazását követően látható szövetelhalás az epidermiszen át és a dermiszben. A korrozív reakciókat jellemzik a fekélyek, vérzés, véres var és a 14 napos megfigyelés végén a bőr kifehéredése miatti elszíntelenedés, teljes területek szőrtelensége és hegek. A kérdéses károsodás értékeléséhez figyelembe kell venni a szövetkórtant.

Transzkután elektromos rezisztencia (TER): a bőr látszólagos elektromos rezisztenciájának mérése rezisztenciaértékként, kiloohmban kifejezve. A barrierfunkció vizsgálatának egy egyszerű és nagy teljesítményű módszere, amely során az ionok bőrön történő áthaladását egy Wheatstone-híd segítségével rögzítik.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

1. táblázat

Referencia-vegyszerek

Név	EINECS-szám	CAS-szám	
1,2-diaminopropán	201-155-9	78-90-0	Erősen korrozív
Akrilsav	201-177-9	79-10-7	Erősen korrozív
2-tert-butilfenol	201-807-2	88-18-6	Korrozív
Kálium-hidroxid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrozív
Kénsav (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrozív
Oktánsav (kaprilsav)	204-677-5	124-07-02	Korrozív
4-amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	Nem korrozív
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Nem korrozív
Fenetil bromid	203-130-8	103-63-9	Nem korrozív
Tetraklór-etilén	204-825-9	27-18-4	Nem korrozív
Izosztearinsav	250-178-0	30399-84-9	Nem korrozív
4-(metiltio)-benzaldehid	222-365-7	3446-89-7	Nem korrozív

A felsorolt vegyszerek többsége az ECVAM nemzetközi validálási tanulmányhoz válogatott vegyszerek listájából származik (4). Kiválasztásuk a következő ismérvek alapján történt:

i. egyenlő számú korrozív és nem korrozív anyag;

▼B

ii. kereskedelmi forgalomban kapható vegyszerek, amelyek lefedik a legtöbb vonatkozó vegyszerosztályt;

iii. erősen korrozív és a kevésbé korrozív anyagokat is tartalmaz annak érdekében, hogy lehetővé váljon a korrózióhatás szerinti megkülönböztetés;

iv. olyan vegyszerek kiválasztása, amelyek a korrózió kivételével komolyabb kockázat nélkül kezelhetők laboratóriumban.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot 24 órán át a bőrkorongok epidermális felületén alkalmazzák egy kétkamrás vizsgálati rendszerben, amelyben a bőrkorongok a két kamra elválasztására szolgálnak. A bőrkorongok kíméletes módon leölt, 28–30 napos patkányokról származnak. A korrozív anyagok azok, amelyek a normál *stratum corneum* integritásának és barrierfunkciójának elvesztését okozzák, amit a TER meghatározott határérték alá történő csökkenésével mérnek (12). A patkány TER esetében az 5 kΩ határérték került kiválasztásra a széles tartományt felölelő vegyszerek nagyszámú adataiból, ahol az értékek túlnyomó többsége vagy világosan ezen érték felett (gyakran > 10 kΩ) vagy jóval alatta (gyakran < 3 kΩ) volt (12). Általában azok az anyagok, amelyek az állatokra nézve nem korrozívak, de irritatívak vagy nem irritatívak, nem csökkentik a TER-t e határérték alá. Továbbá más bőrkészítmények vagy más berendezés használata módosíthatja a határértéket, ami további validálásokat tesz szükségessé.

A TER-ben a pozitív értékek – beleértve az 5 kΩ körülieket is – kontrollvizsgálata céljából a vizsgálati eljárás részét képezi egy festékmegkötést biztosító lépés is. A festékmegkötést biztosító lépés meghatározza, hogy az ionáteresztő képesség fokozódását a *stratum corneum* fizikai károsodása okozza-e. A patkánybőrt alkalmazó TER módszer a B.4. vizsgálati módszer (2) alapján vizsgált nyúlban előre jelezte az *in vivo* korrozivitást. Meg kell jegyezni, hogy az emberi bőrpróbával való összehasonlításban a nyúlon végzett *in vivo* vizsgálat a bőrkorrózió és a bőrirritáció tekintetében erősen konzervatív (15).

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **Állatok**

A patkányokra esett a választás, mert a bőrük vegyszerekkel szembeni érzékenysége ebben a vizsgálatban már korábban bebizonyosodott (10). A patkányok kora (a bőr begyűjtésének időpontjában) és származása különösen fontos annak biztosítására, hogy a szőrtüszők nyugvó fázisban legyenek, mielőtt a felnőtt szőr nőni kezd.

▼B

A fiatal, körülbelül 22 napos, hím vagy nőstény patkányok (Wistar vagy hasonló törzs) háton és horpaszon lévő szőrét kis nyírógéppel óvatosan eltávolítják. Azután az állatokat óvatosan törölgetve megmossák, miközben a lenyírt területet antibiotikumot tartalmazó oldatba merítik (amely a baktériumok növekedését hatékonyan gátló koncentrációban például sztreptomicint, penicillint, klóramfenikolt és amfotericint tartalmaz). Az állatokat az első mosást követő harmadik vagy negyedik napon ismételten megmossák antibiotikummal, és a második mosást követő három napon belül felhasználják őket, amikor a *stratum corneum* megerősödött a szőrtelenítés után.

1.5.2. **A bőrkorongok előkészítése**

Az állatokat 28–30 napos korukban kíméletes módon leölik; ez a kor kritikus. Ezután minden állatról eltávolítják a dorsolaterális bőrt, és a bőrtől való óvatos elválasztással lefejtik a felesleges szubkután zsírt. Egyenként körülbelül 20 mm-es átmérőjű bőrkorongokat távolítanak el. A bőrt a korongok felhasználása előtt tárolni lehet, ha kimutatható, hogy a pozitív és negatív kontrolladatok megegyeznek a friss bőrnél kapott adatokkal.

Minden bőrkorongot egy PTFE (politetrafluoroetilén) cső vége fölé helyeznek, biztosítva, hogy az epidermális felület érintkezzen a csővel. Egy „O” gumigyűrűt pontosan a cső végére illesztenek, hogy a helyén tartsa a bőrt, és hogy a felesleges szövetet levágja. A cső és az „O” gyűrű méreteit a 2. ábra mutatja. Az „O” gumigyűrűt aztán vazelinnel óvatosan tömítik a PTFE cső végéhez. A csövet egy rugós csipesz tartja, amelynek belsejében egy $MgSO_4$-oldatot (154 mM) tartalmazó (1. ábra) befogadókamra van. A bőrkorongot teljesen bele kell meríteni a $MgSO_4$-oldatba. Egyetlen patkánybőrből 10–15 bőrkorongot lehet készíteni.

A vizsgálat kezdete előtt az egyes állati bőrök minőség-ellenőrzése céljából megmérik két bőrkorong elektromos rezisztenciáját. Mindkét korongnak 10 kΩ-nál nagyobb rezisztenciaértéket kell mutatni ahhoz, hogy a többi korongot fel lehessen használni a vizsgálathoz. Ha a rezisztencia értéke kisebb mint 10 kΩ, e bőrdarabnak a többi korongját ki kell dobni.

1.5.3. **A vizsgálat alkalmazása és a kontrollanyagok**

A vizsgálati modell megfelelő elvégzése érdekében minden vizsgálathoz egyidejű pozitív és negatív kontrollértékeket kell használni. Egyetlen állatról származó bőrkorongokat kell használni. Az ajánlott pozitív és negatív anyagok: 10 M sósav, illetve desztillált víz.

A folyékony vizsgálati anyagokat (150 µl) a cső belsejében egyenletesen viszik fel az epidermális felületre. Szilárd anyagokkal történő vizsgálat esetén megfelelő mennyiségű szilárd anyagot egyenletesen visznek fel a korongra annak biztosítására, hogy az epidermisz teljes felületét beborítsa. A szilárd anyagra deionizált vizet (150 µl) öntenek, és a csövet óvatosan felrázzák. A bőrrel való maximális érintkezés elérése érdekében a szilárd anyagot 30 °C-ra lehet felmelegíteni olvadás vagy lágyítás céljából, vagy őrölni vagy porítani kell.

▼B

Minden egyes vizsgálathoz és kontrollanyaghoz három bőrkorongot használnak. A vizsgált anyagot 24 órán át alkalmazzák 20–23 °C-on. A vizsgált anyagot legfeljebb 30 °C-os csapvízsugárral addig mossák, amíg már nem lehet további anyagot eltávolítani.

1.5.4. **TER-mérések**

A bőr ellenállásának TER-ként történő mérése egy kisfeszültségű, váltakozó áramú Wheatstone-híd segítségével történik (13). A mérőeszköz általános jellemzői: 1–3 Volt üzemi feszültség, 50–1 000 Hz-es szinusz- vagy négyszöghullámú váltakozó áram és legalább 0,1–30 kΩ mérési tartomány. A validálási vizsgálatban használt mérőeszköz az induktivitást, kapacitást és rezisztenciát sorrendben 2 000 H, 2 000 μF és 2 MΩ értékekig méri 100 Hz-es vagy 1 kHz-es frekvencián, soros vagy párhuzamos értékek felhasználásával. A TER-mérések céljára a korrozivitásra vonatkozó vizsgálati méréseket elektromos ellenállásban rögzítik 100 Hz-es frekvencián és soros értékeket felhasználva. Az elektromos ellenállás mérése előtt a bőr felületi feszültségét megfelelő mennyiségű 70 %-os etil-alkohollal csökkentik, amely beborítja az epidermiszt. Néhány másodperc elteltével az etil-alkoholt eltávolítják a csőről, majd azután a szövetet 3 ml $MgSO_4$-oldat (154 mM) hozzáadásával hidratálják. Az ellenállás kΩ/bőrkorongban való méréséhez a Wheatstone-híd elektródáit ráhelyezik a bőrkorong mindkét oldalára (1. ábra). Az elektródaméreteket és a krokodilcsipesz alá helyezett elektróda hosszúságát a 2. ábra mutatja. A belső elektródához csatolt csipesz az ellenállás mérésekor a PTFE cső tetején található annak biztosítására, hogy állandó hosszúságú elektróda merüljön az $MgSO_4$-oldatba. A külső elektródát a befogadó kamra belsejébe úgy helyezik el, hogy az a kamra aljáig érjen. A rugós csipesz és a PTFE cső alja közötti távolságot állandó értéken tartják (2. ábra), mivel ez a távolság befolyásolja a kapott rezisztencia értékét. Következésképpen a belső elektróda és a bőrkorong közötti távolságnak állandónak és minimálisnak kell lenni (1–2 mm).

Ha a mért rezisztencia értéke nagyobb mint 20 kΩ, ezt valószínűleg a bőrkorong epidermális felületét borító vizsgált anyag maradványa okozhatja. Ennek a bevonatnak a további eltávolítását meg lehet próbálni például úgy, hogy a PTFE csövet kesztyűs hüvelykujjal befogják, és körülbelül 10 másodpercig rázogatják; az $MgSO_4$-oldatot eltávolítják és a rezisztenciamérést friss $MgSO_4$-gyel megismétlik.

A vizsgálati műszer jellemzői és méretei, valamint a használt vizsgálati eljárás befolyásolhatja a kapott TER-értékeket. Az 5 kΩ korróziós határértéket az ebben a módszerben leírt különleges műszerrel és eljárással kapott adatokból számolják ki. Ha a vizsgálati feltételek megváltoznak, vagy más készüléket használnak, akkor eltérő határ- és kontrollértékeket lehet alkalmazni. Ezért ajánlatos a módszert és az ellenállás határértékét a hitelesítési vizsgálatban (4) (5) használt kémiai anyagokból vagy a vizsgált kémiai anyagokhoz hasonló kémiai osztályú vegyi anyagokból kiválasztott referenciaszabványok sorozatának vizsgálatával meghatározni. A megfelelő referenciavegyszerek jegyzéke az 1. táblázatban található.

▼B

1.5.5. **Festékanyag-megkötő módszerek**

Bizonyos nem korrozív anyagoknak való expozíció eredményezheti a rezisztencia 5 kΩ határérték alá történő csökkenését, ami lehetővé teszi az ionoknak a *stratum corneumon* való áthatolását, csökkentve ezáltal az elektromos rezisztenciát (5). Például felületaktív és semleges szerves anyagok és vegyszerek (beleértve a tisztítószereket, emulgeálószereket és más hatóanyagokat) eltávolíthatják a bőrzsírt, ezáltal a barrier az ionok számára áthatolhatóbbá válik. Így ha a vizsgált anyagok TER-értékei alacsonyabbak mint 5 kΩ vagy akörül vannak, ha nincs látható károsodás, akkor a kontrollon és kezelt szöveteken festékpenetrációs vizsgálatot kell végezni annak megállapítására, hogy a kapott TER-érték a bőr fokozottabb áteresztő képességének vagy a bőrkorrózionak az eredménye-e (3) (5). Ez utóbbi esetén, amikor a *stratum corneum* szétrepedt, ha a bőrfelszínre szulforhodamin B festéket visznek fel, ez gyorsan áthatol, és megfesti az alatta lévő szövetet. Ez a különleges festékanyag a vegyszerek széles skálájának ellenáll, és nem érinti a lent leírt kivonási eljárás.

1.5.5.1. *Szulforhodamin B festékanyag alkalmazása és eltávolítása*

A TER-vizsgálatot követően a magnézium-szulfátot eltávolítják a csőből, és gondosan megvizsgálják, hogy a bőrön látható-e károsodás. Ha nincs nagyobb látható károsodás, akkor szulforhodamin B festékanyag (Acid Red 52; C.I. 45100; EINECS-szám: 222-529-8; CAS-szám: 3520-42-1), 150 µl 10 tömegszázalékos desztillált vizes hígítású oldatát alkalmazzák minden bőrkorong epidermális felületén 2 órán át. Ezeket a bőrkorongokat azután a felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében körülbelül 10 másodpercig legfeljebb szobahőmérsékletű csapvízben lemossák. Minden bőrkorongot óvatosan eltávolítanak a PTFE csőről, és egy deionizált vizet tartalmazó (8 ml) ampullába helyezik (pl. egy 20 ml üveg szcintillációs ampulla). Az ampullákat óvatosan 5 percen át rázogatják minden felesleges/meg nem tapadt festékanyag eltávolítása érdekében. Ezt az öblítési eljárást aztán megismétlik, azután a bőrkorongokat kiveszik, és desztillált vízben lévő 5 ml 30 tömegszázalékos nátrium-dodecil-szulfátot (SDS) tartalmazó ampullába helyezik, és egy éjszakán át 60 °C -on inkubálják.

Az inkubálást követően minden bőrkorongot eltávolítanak és kidobnak, és a fennmaradó oldatot 8 percen át 21 °C -on centrifugálják (relatív centrifugális erő ~175 × g). 1 ml felszínen úszó mintát felhígítanak 1:5 (v/v) [azaz 1 ml + 4 ml] arányban 30 tömegszázalékos SDS-szel desztillált vízben. Megmérik az oldat optikai sűrűségét (OD) 565 nm-nél.

1.5.5.2. *A festékanyag-tartalom kiszámítása*

A szulforhodamin B festékanyagot korongonként az OD-értékekből számítják ki (5) (szulforhodamin B festékanyag moláris extinkciós együtthatója 565 nm = $8{,}7 \times 10^4$; molekulatömeg = 580). A festékanyag-tartalmat minden egyes bőrkorong esetében megfelelő kalibrációs görbe használatával határozzák meg, és azután az ismétlésekhez átlagos festékanyag-tartalmat kalkulálnak.

2. **ADATOK**

A vizsgált anyagokra, valamint a pozitív és negatív kontrollokra vonatkozó rezisztenciaértékeket (kΩ) és átlagos festékanyag-tartalom értékeket (µg/korong) adott esetben táblázatos formában kell megadni (egyedi vizsgálati adatok és átlagok ± S.D.), beleértve a párhuzamos/megismételt kísérleteknél kapott adatokat, átlagértékeket és az egyedi értékeket.

▼B

2.1. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az átlag TER-eredmények akkor elfogadhatók, ha az egyidejű pozitív és negatív kontrollértékek a vizsgálati laboratóriumban a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt, módszertanra és készülékre vonatkozó elfogadható ellenállás-tartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

Kontroll	Anyagok	Ellenállás-tartomány (kΩ)
Pozitív	10 M sósav	0,5—1,0
Negatív	Desztillált víz	10–25

Az átlagos festékanyag-megkötési eredmények azzal a feltétellel fogadhatók el, hogy az egyidejű kontrollértékek a módszer elfogadható tartományába esnek. A fent leírt, a módszertan és a készülék esetében a kontrollanyagokra javasolt elfogadható festéktartalomtartományokat az alábbi táblázat tartalmazza:

Kontroll	Anyagok	Festéktartalom tartománya (μg/korong)
Pozitív	10 M sósav	40–100
Negatív	Desztillált víz	15–35

A vizsgált anyagnak a bőrre nincs korrozív hatása:

i. ha a vizsgált anyagra kapott átlagos TER-érték nagyobb mint 5 kΩ; vagy

ii. az átlagos TER érték kisebb mint 5 kΩ vagy azzal egyenlő; és

— a bőrkorong nem mutat látható károsodást, és

— a korong átlagos festéktartalma jóval az egyidejűleg a 10M HCl pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalom alatt van.

A vizsgált anyagnak a bőrre korrozív hatása van:

i. ha az átlagos TER-érték kisebb mint 5 kΩ vagy azzal egyenlő, és a bőrkorong láthatóan károsodott; vagy

ii. az átlagos TER érték kisebb mint 5 kΩ vagy azzal egyenlő, és

— a bőrkorong nem mutat látható károsodást, de

— a korong átlagos festéktartalma megegyezik az egyidejűleg a 10M HCl pozitív kontrollnál megállapított átlagos bőrkorong-festéktartalommal, vagy annál nagyobb.

▼B

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálati és kontrollanyagok:

— a vegyszer(ek) neve, mint IUPAC- vagy CAS-név és CAS-szám, ha ismert,

— az anyag vagy készítmény tisztasága és összetétele (tömegszázalékban) és fizikai sajátossága,

— a vizsgálat elvégzése szempontjából lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok, mint fizikai állapot, pH, szilárdság, vízben való oldhatóság,

— adott esetben a vizsgálati/kontrollanyagok kezelése a vizsgálatot megelőzően (pl. melegítés, őrlés),

— stabilitás, ha ismert.

Kísérleti állatok:

— a használt törzs és nem,

— az állatok kora, ha donorállatként használják őket,

— származás, tartási feltétel, étrend, stb.,

— a bőrpreparátumra vonatkozó részletek.

Vizsgálati feltételek:

— a vizsgálati eszközökre vonatkozó kalibrálási görbék,

— a festékanyag-megkötő vizsgálatra vonatkozó görbék,

— a TER-méréshez használt vizsgálati eljárás részletei,

— a festékanyag-megkötő vizsgálatához használt vizsgálati eljárás részletei; adott esetben,

— a vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása,

— a használt értékelési ismérvek leírása.

Eredmények:

— az egyedi állatokra és az egyedi bőrmintákra vonatkozó, TER-ből származó adatok és a festékanyag-megkötő vizsgálat adatainak táblázatba foglalása (adott esetben);

— bármilyen megfigyelt jelenség leírása.

Az eredmények értékelése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

(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., Holzhütter, 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, p. 62.

(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 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.

(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, 27th 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 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.

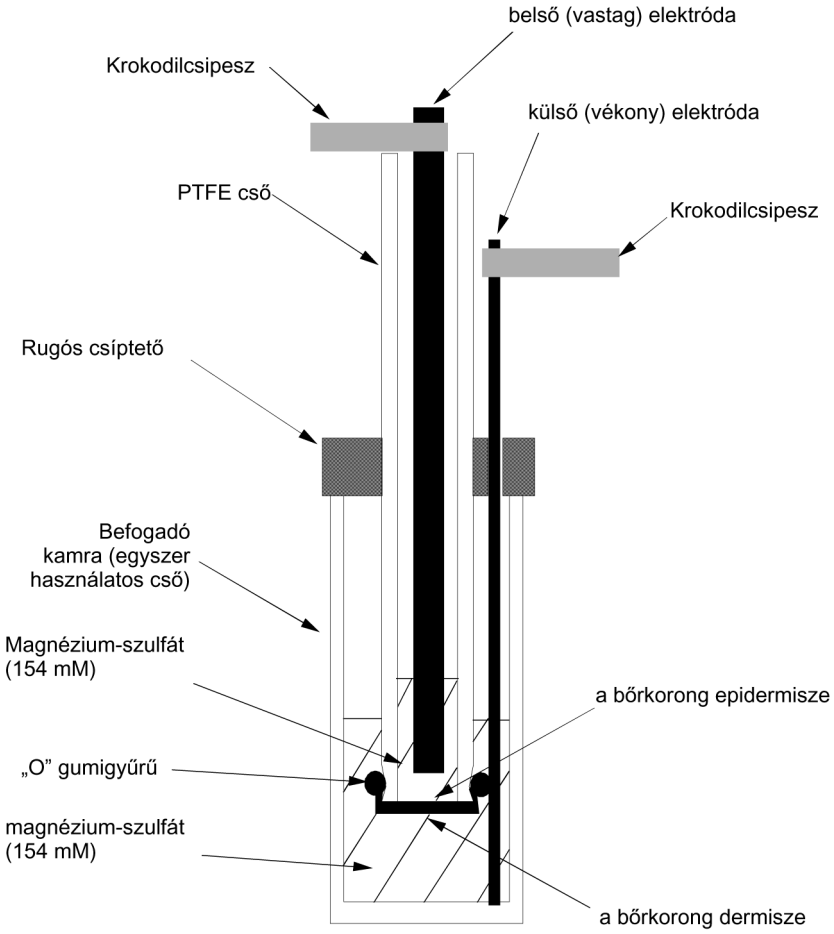
(15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845–852.

(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

1. ábra

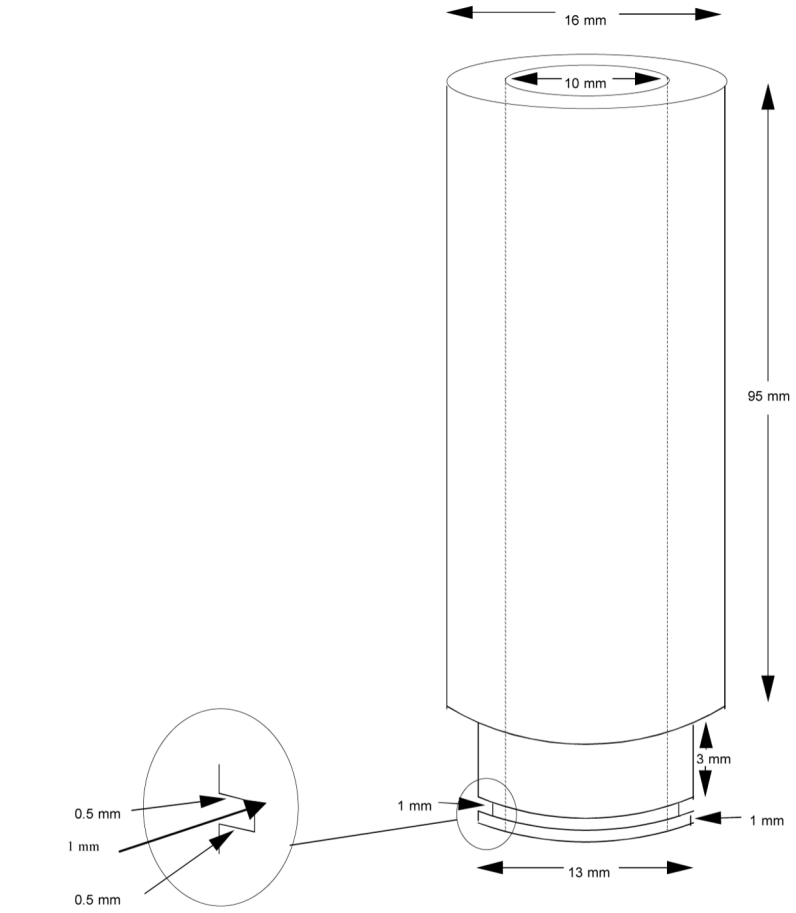
A patkánybőr TER-vizsgálatára szolgáló műszer

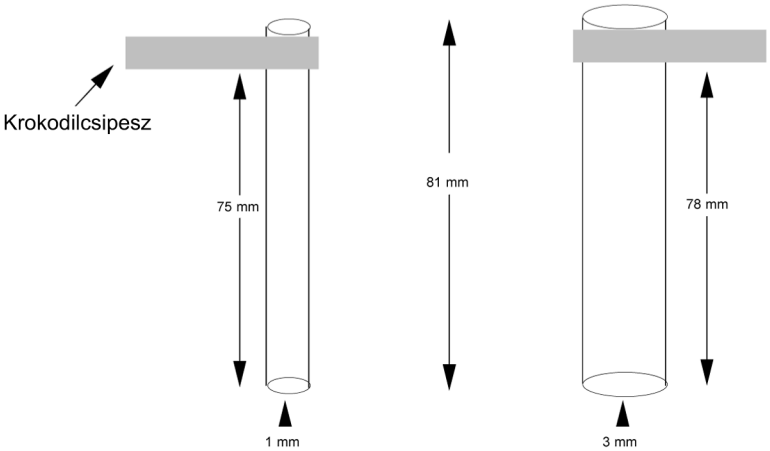


▼B

2. ábra

Az alkalmazott politetrafluoroetilén- (PTFE) és befogadó csövek, valamint az elektródák méretei





▼B

A fent ábrázolt eszközök legfontosabb elemei:

— a PTFE cső belső átmérője,

— az elektródák PTFE csőhöz és befogadó csőhöz viszonyított hosszúsága olyan legyen, hogy az elektródák ne érintkezzenek a bőrkoronggal, és hogy állandó hosszúságú elektróda legyen az $MgSO_4$-oldatban,

— az $MgSO_4$-oldat befogadó csőben lévő mennyisége a PTFE csőben lévő szinthez viszonyítva adjon egy bizonyos folyadékmélységet, ahogyan azt az 1. ábra mutatja,

— a bőrkorongot kellő erősséggel kell a PTFE csőhöz rögzíteni úgy, hogy az elektromos ellenállás a bőr tulajdonságaira vonatkozóan valós értéket adjon.

▼B

B. 40A. ***IN VITRO* BŐRKORRÓZIÓ: EMBERI BŐRMODELLEN VÉGZETT VIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

Ez a kísérleti módszer egyenértékű az OECD TG 431 (2004) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

A bőrkorrózió egy vizsgált anyag felvitelét követően a bőrben történt irreverzibilis szövetkárosodás (a veszélyes anyagok és keverékek osztályozásának és címkézésének globális harmonizált rendszere [GHS] meghatározása szerint) (1). Ez a vizsgálati módszer a bőrkorrózió értékeléséhez nem kívánja meg élő állatok vagy állati szövetek használatát.

A bőrkorrózió vizsgálata jellemzően kísérleti állatokon történő vizsgálatot foglal magában (2). A B.4. vizsgálati módszer felülvizsgálata során figyelembe vették az eljárással az állatoknak okozott fájdalom és szenvedés miatti aggodalmakat, és a felülvizsgált módszer már lehetővé teszi a bőrkorrózió alternatív, *in vitro*, fájdalom és szenvedés okozása nélküli módszerekkel történő meghatározását.

A szabályozási célokból végzett bőrkorrózió-vizsgálathoz használható alternatív vizsgálatok meghatározása felé az elővalidálási tanulmányok készítése jelentette az első lépést (3). Ezt követően zajlott le a bőrkorrózió vizsgálatára szolgáló *in vitro* módszerek (4) (5) hivatalos hitelesítési vizsgálata (6) (7) (8). E tanulmányok és más publikált szakirodalom (9) következtetései vezettek ahhoz az ajánláshoz, hogy az *in vivo* bőrkorróziós vizsgálatokhoz (10) (11) (12) (13) a következő vizsgálatok alkalmazhatók: az emberi bőrmodellen alapuló vizsgálat (e módszer) és a transzkután elektromos rezisztenciavizsgálat (lásd B.40. vizsgálati módszer).

A validálási tanulmányok szerint az emberi bőrmodelleket használó vizsgálatokkal (3) (4) (5) (9) megbízhatóan megkülönböztethetők a bőrkorróziót okozó és a bőrkorróziót nem okozó ismert anyagok. A vizsgálati jegyzőkönyv útbaigazítást adhat az erős és a kevésbé erős bőrkorróziót okozó szerek közötti különbségtételre is.

Az ebben a módszerben leírt vizsgálat lehetővé teszi a korrozív vegyi anyagok és keverékek meghatározását. Lehetővé teszi továbbá a nem korrozív anyagok és keverékek azonosítását, ha más létező információkon alapuló meghatározások bizonyítási súlya ezt alátámasztja (pl. pH, szerkezet-hatás kapcsolat, emberekre és/vagy állatokra vonatkozó adatok) (1) (2) (13) (14). Ez a módszer általában nem nyújt megfelelő információt a bőrirritációra vonatkozóan, és nem teszi lehetővé a korrozív anyagok Globális Harmonizált Osztályozási Rendszere (GHS) (1) által megengedett alkategóriákba történő sorolását.

Egyetlen bőrexpozíció után a bőrt ért helyi hatások teljes értékelésére ajánlatos a B.4. vizsgálati módszer (2) függeléke szerinti és a Globális Harmonizált Rendszer (GHS) (1) által meghatározott szekvenciális vizsgálati stratégiát folytatni. Ez a vizsgálati stratégia előírja, hogy *in vitro* bőrkorróziós (az ebben a módszerben leírtak szerint) és bőrirritációs vizsgálatokat kell lefolytatni mielőtt az élő állatokon végzett vizsgálatokat fontolóra lehetne venni.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

***In vivo* bőrkorrózió:** a bőr irreverzibilis károsodása: nevezetesen vizsgálati anyag négy órán át tartó alkalmazását követően látható szövetelhalás az epidermiszen át és a dermiszben. A korrozív reakciókat jellemzik a fekélyek, vérzés, véres var és a 14 napos megfigyelés végén a bőr kifehéredése miatti elszíntelenedés, teljes területek szőrtelensége és hegek. A kérdéses károsodás értékeléséhez figyelembe kell venni a szövetkórtant.

Sejt-életképesség: egy sejtpopuláció teljes aktivitását mérő paraméter (pl. a sejtes mitokondriális dehidrogenázok képessége az életfontosságú MTT-festékanyag csökkenésére), amely a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálat felépítésétől függően korrelál a sejtek teljes számával és/vagy az életképességükkel.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

1. táblázat

Referencia-vegyszerek

Név	EINECS-szám	CAS-szám	
1,2-diaminopropán	201-155-9	78-90-0	Erősen korrozív
Akrilsav	201-177-9	79-10-7	Erősen korrozív
2-tert-butilfenol	201-807-2	88-18-6	Korrozív
Kálium-hidroxid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	Korrozív
Kénsav (10 %)	231-639-5	7664-93-9	Korrozív
Oktánsav (kaprilsav)	204-677-5	124-07-02	Korrozív
4-amino-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	Nem korrozív
Eugenol	202-589-1	97-53-0	Nem korrozív
Fenetil bromid	203-130-8	103-63-9	Nem korrozív
Tetraklór-etilén	204-825-9	27-18-4	Nem korrozív
Izosztearinsav	250-178-0	30399-84-9	Nem korrozív
4-(Metilthio)-benzaldehid	222-365-7	3446-89-7	Nem korrozív

A felsorolt vegyszerek többsége az ECVAM nemzetközi validálási tanulmányhoz válogatott vegyszerek listájából származik (4). Kiválasztásuk a következő ismérvek alapján történt:

i. egyenlő számú korrozív és nem korrozív anyag;

ii. kereskedelmi forgalomban kapható vegyszerek, amelyek lefedik a legtöbb vonatkozó vegyszerosztályt;

iii. erősen korrozív és kevésbé korrozív anyagokat is tartalmaz annak érdekében, hogy lehetővé váljon a korrózióhatás szerinti megkülönböztetés;

▼B

iv. olyan vegyszerek kiválasztása, amelyek a korrózió kivételével komolyabb kockázat nélkül kezelhetők laboratóriumban.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot helyileg egy háromdimenziós emberi bőrmodellre viszik fel, amely tartalmaz legalább egy funkcionális *stratum corneummal* rendelkező rekonstruált epidermiszt. A korrozív anyagot azáltal azonosítják, hogy egy megadott expozíciós időtartam alatt képes-e a meghatározott határérték alá csökkenteni a sejt életképességét (amelyet például az MTT-csökkenésvizsgálat segítségével határoznak meg [15]). Az emberi bőrmodell vizsgálatának alapelve azon a feltételezésen alapul, hogy a korrozív anyagok diffúzióval vagy erózióval képesek áthatolni a *stratum corneumon*, és az alatta lévő sejtrétegekre citotoxikus hatást gyakorolnak.

1.4.1. **Az eljárás**

1.4.1.1. *Emberibőr-modell*

Emberibőr-modelleket el lehet készíteni vagy kereskedelmi forgalomban be lehet szerezni (pl. az EpiDerm™ és EPISKIN™ modellek) (16) (17) (18) (19), illetve kifejleszthetők vagy elkészíthetők vizsgálati laboratóriumban (20) (21). Természetesen az emberi bőr használata esetén figyelembe kell venni a nemzeti és nemzetközi etikai szempontokat és feltételeket. Minden új modellt hitelesíteni kell (legalább az 1.4.1.1.2 pontban leírtaknak megfelelő mértékben). Az ehhez a vizsgálathoz használt emberibőr-modelleknek a következőknek kell megfelelni:

1.4.1.1.1. A modellre vonatkozó általános feltételek:

Az epitélium felépítéséhez emberi keratinsejteket kell használni. Élő epitélsejtek több rétegének kell jelen lenni a funkcionális *stratum corneum* alatt. A bőrmodellnek lehet egy stromális összetevő rétege is. A *stratum corneumnak* többrétegűnek kell lennie, és megfelelő lipidszelvénnyel kell rendelkeznie, hogy nagy ellenállóképességgel funkcionális barriert képezzen a citotoxikus markerek gyors áthatolása ellen. A modell visszaszorító tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag áthatoljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe. A vizsgált vegyszerek *stratum corneum* körül történő áthatolása a bőr expozíciójának gyenge modellezését eredményezi. A bőrmodellnek baktériumfertőzéstől mentesnek (beleértve a mikoplazmát) és gombamentesnek kell lennie.

1.4.1.1.2. Funkcionális modellfeltételek:

Az életképesség terjedelmének mennyiségi meghatározása általában MTT segítségével, vagy más metabolikusan átalakított élő festékanyaggal történik. Ezekben az esetekben a negatív kontrollszövetből kivont (szolibilizált) festékanyag optikai sűrűségének (OD) az extrahálásra használt oldószer OD-jénél legalább 20-szor nagyobbnak kell lennie (összefoglalásként lásd [22]). A negatív kontrollszövetnek a vizsgálati expozíciós időszak alatt állandónak kell lennie a tenyészetben (hasonló életképesség-mérést nyújt). A stratum corneumnak kellően erősnek kell lennie annak érdekében, hogy bizonyos citotoxikus markervegyszerek (pl. 1 % Triton X-100) gyors áthatolásának ellenálljon. Ezt a tulajdonságot a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez (ET_{50}) szükséges expozíciós idővel lehet meghatározni (pl. az EpiDerm™ és EPISKIN™ modellek esetében ez > 2 óra). A szövetnek idővel és lehetőleg laboratóriumok között reprodukálhatónak kell lennie. Ezenkívül, ha kiválasztott vizsgálati eljárásban használjuk, akkor képesnek kell lennie arra, hogy előre jelezze a referencia-vegyszer korróziós képességét (lásd 1. táblázat).

▼B

1.4.1.2. *A vizsgálat alkalmazása és a kontrollanyagok*

Valamennyi kezeléshez (expozíciós időhöz) két szövetpéldányt kell használni, a kontrollt is beleértve. Folyékony anyagok esetén a bőr felületére egyenletesen elosztva elegendő vizsgált anyagot kell felvinni: minimum 25 µl/cm^2-t kell használni. Szilárd anyagok esetén a bőrön egyenletesen elosztva elegendő vizsgált anyagot használjunk, és deionizált vagy desztillált vízzel nedvesítsük be a bőrrel való jó érintkezés biztosítására. Ahol szükséges, a szilárd anyagok alá a felvitel előtt púdert kell tenni. A felvitel módjának meg kell felelnie a vizsgált anyagnak (lásd például az 5. referenciát). Az expozíciós idő lejártával a vizsgált anyagot megfelelő pufferrel vagy 0,9 % NaCl-dal óvatosan le kell mosni a bőrről.

A vizsgálati modell megfelelő teljesítménye érdekében minden vizsgálathoz egyidejűleg pozitív és negatív kontrollértékeket kell használni. A javasolt pozitív kontrollanyag jégecet vagy 8N KOH. A javasolt negatív kontrollok 0,9 % NaCl vagy víz.

1.4.1.3. *A sejtek életképességének mérése*

Csak kvantitatív, hitelesített módszereket lehet a sejt életképességének mérésére használni. Továbbá az életképesség mérésének egy háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal kell összeegyeztethetőnek lennie. A nem specifikus festékanyagkötés nem akadályozhatja az életképesség mérését. A fehérjekötő festékanyagok és azok, amelyek nem mennek át metabolikus átalakuláson (pl. neutrálvörös) ezért nem megfelelők. A leggyakrabban használt vizsgálat az MTT [3-(4,5-Dimetilthiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólium bromid, Tiazolil kék: EINECS-szám: 206-069-5, CAS-szám: 298-93-1)] redukció, amelyről kimutatták, hogy pontos és megismételhető eredményeket nyújt (5), de más vizsgálat is használható. A bőrmintát 3 órára egy megfelelő inkubációs hőmérsékletű, megfelelő koncentrációjú MTT–oldatba (pl. 0,3–1 mg/ml) teszik. A kicsapódott kék formazán terméket aztán oldószer (izopropanol) használatával eltávolítják, és 540 és 595 nm hullámhossz között az OD-meghatározása útján megmérik a formazán koncentrációját.

A vizsgált anyagnak az élő festékanyagra gyakorolt vegyi hatása hasonlíthat a sejtmetabolizmus-hatásra, ami az életképesség téves megállapításához vezet. Ennek bekövetkezését mutatták ki, amikor az ilyen vizsgált anyagot öblítéssel nem távolították el teljesen a bőrről (9). Ha a vizsgált anyag közvetlenül az élő festékanyagra hat, további ellenőrzéseket kell alkalmazni annak megállapítására, hogy a vizsgált anyag befolyásolja-e az életképesség mérését, illetve el kell végezni megfelelő korrekciókat (9) (23).

2. **ADATOK**

Minden egyes szövet esetében a vizsgált anyagra vonatkozó OD-értékeket és a százalékban meghatározott sejtéletképesség-értékeket, valamint a pozitív és negatív kontrollokat táblázatba foglaltan kell megadni, beleértve adott esetben a párhuzamos/megismételt kísérletek során kapott adatokat, az átlagértékeket és az egyedi adatokat.

▼B

2.1. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Minden vizsgált mintára vonatkozó OD-értéket fel lehet használni az önkényesen 100 %-nak vett negatív kontrollhoz viszonyított százalékos életképesség kiszámításához. A sejtéletképesség százalékban megállapított határértékét, amely megkülönbözteti a korrozív és nem korrozív vizsgált anyagot (vagy a korrozív osztályokat) vagy azt a statisztikai módszert (módszereket), amelyet az eredmények kiértékelésére és a korrozív anyagok azonosítására használnak, pontosan meg kell határozni, dokumentálni kell, valamint igazolni kell az értékek megfelelőségét. Általában ezeket a határértékeket a vizsgálat optimalizálása során állapítják meg, amit egy elővalidálási szakaszban tesztelnek, és egy hitelesítési vizsgálatban igazolnak. Például az EpiDerm™ modellel összefüggésben a korróziós képesség előrejelzése a következő (9):

A vizsgált anyagnak a bőrre korrozív hatása van:

i. ha az életképesség 3 perces expozíció elteltével kisebb mint 50 %, vagy

ii. ha az életképesség 3 perces expozíció elteltével 50 % vagy annál nagyobb, és az életképesség egy óra expozíció elteltével kisebb mint 15 %.

A vizsgált anyagnak a bőrre nincs korrozív hatása:

i. ha az életképesség 3 perces expozíció elteltével 50 % vagy annál nagyobb, és az életképesség egy óra expozíció elteltével nagyobb mint 15 % vagy azzal egyenlő.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált és kontrollanyag:

— a vegyszer(ek) neve, mint IUPAC- vagy CAS-név és CAS-szám, amennyiben ismert,

— az anyag vagy a készítmény tisztasága és összetétele (tömegszázalékban),

— a vizsgálat elvégzése szempontjából lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok, mint fizikai állapot, pH, stabilitás, vízben való oldhatóság,

— a vizsgálati/kontrollanyagok kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha alkalmazásra került (pl. melegítés, őrlés),

— stabilitás, ha ismert.

A használt bőrmodell és protokoll indoklása.

Vizsgálati körülmények:

— használt sejtrendszer,

— a sejt életképességének mérésére használt eszköz (pl. spektrofotométer) bemérésére vonatkozó kalibrálási információk,

▼B

— a használt specifikus bőrmodellre vonatkozó teljes háttérinformáció, beleértve annak érvényességét,

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei,

— a használt vizsgálati dózisok,

— a vizsgálati eljárás bármely módosításának leírása,

— hivatkozás a modell történeti adataira,

— a használt értékelési ismérvek leírása.

Eredmények:

— az egyedi vizsgálati minták adatainak táblázatba foglalása,

— a megfigyelt egyéb jelenségek leírása.

Az eredmények értékelése.

Következtetés.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

(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 EC VAM 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, p. 62.

(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 DX (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 human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal 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 FOTOTOXICITÁS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 432 (2004) számú vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

A fototoxicitás a bőrnek először bizonyos vegyi anyagoknak, majd ezt követően (kisebb dózisoknál látható) fénynek való expozíciója után bekövetkező, vagy hasonlóan, valamely vegyi anyag szisztematikus alkalmazása után a bőr besugárzásával előidézett vagy felerősített toxikus reagálása.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat a vizsgált anyag fénynek való expozíció következtében aktivált vegyi anyag által kiváltott fototoxikusságának meghatározására szolgál. A vizsgálat a vegyi anyagnak kitett sejtek életképességében fény jelenlétében, illetve hiányában bekövetkező relatív csökkenés által méri a fotocitotoxicitást. A vizsgálattal fototoxikusnak talált anyag valószínűleg a bőrre történő szisztematikus felvitelt és elosztást, illetve helyi alkalmazást követően, *in vivo* is fototoxikus.

Számos különböző vegyi anyagról megállapították, hogy fototoxikus hatást váltanak ki (1) (2) (3) (4). Ezek közös tulajdonsága, hogy képesek a napfénytartományon belül fényenergiát elnyelni. A fotokémia első törvénye (a Grotthaus–Draper-törvény) szerint a fotoreakcióhoz elegendő fénykvantum abszorpciójára van szükség. Ezért bármely biológiai vizsgálat elvégzése előtt az OECD 101. vizsgálati iránymutatásának megfelelően meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag UV/látható fény abszorpciós spektrumát. Egyes javaslatok szerint ha a molekuláris extinkciós/abszorpciós együttható kisebb mint 10 liter × mol^{-1} × cm^{-1}, akkor a vegyi anyag valószínűleg nem fotoreaktív. Az ilyen vegyi anyagot nem valószínű, hogy a káros fotokémiai hatások kimutatása céljából az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálattal vagy más biológiai vizsgálattal tesztelni kell (1) (5). Lásd az 1. függeléket is.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat megbízhatósága és alkalmassága nemrégiben értékelésre került (6) (7) (8) (9). Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatról kimutatták, hogy előre jelzi az állatokban és az emberben *in vivo* jelentkező akut fototoxikus hatásokat. A vizsgálat nem alkalmas egyéb olyan káros hatások kimutatására, amelyek vegyi anyagok és a fény együttes hatása alapján jelentkezhetnek, például nem mutatja ki a fotogenotoxicitást, a fotoallergiát vagy a fotokarcinogenitást, és nem alkalmas a fototoxikusság mennyiségi kifejezésére. A vizsgálatnak nem célja a fototoxicitás indirekt mechanizmusainak, a vizsgálati anyag metabolitjai által kiváltott hatásoknak vagy az elegyek hatásainak mérése sem.

Bár az anyagcserét folytató szervezetek használata általános követelmény minden genotoxikus és rákkeltő hatás előrejelzését célzó *in vitro* vizsgálat esetében, a fototoxicitás esetében mindeddig csak elenyésző számú esetben találták úgy, hogy anyagcseretranszformáció szükséges ahhoz, hogy a vegyi anyag *in vivo* vagy *in vitro* fototoxinként viselkedjen. Így nem szükséges és tudományos szempontból sem indokolt, hogy a jelen vizsgálatot anyagcsereaktív szervezettel kelljen elvégezni.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Irradiancia: valamely felületre eső ultraibolya (UV) vagy látható beeső fény intenzitása, W/m^2-ben vagy mW/cm^2-ben mérve.

Fénydózis: valamely felületre eső ultraibolya (UV) vagy látható beeső sugárzás mennyisége (= intenzitás × idő), Joule (= W × s) per felületegységben (pl. J/m^2 vagy J/cm^2) kifejezve.

UV-fény-hullámsávok: a CIE (Nemzetközi Világítástechnikai Bizottság) ajánlása szerinti jelölések: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) és UVC (100–280 nm). Más jelölések is használatosak; az UVB és UVA közötti választóvonalat gyakran 320 nm-re teszik, és az UVA felosztható UV-Al-re és UV-A2-re, ahol a határvonal körülbelül 340 nm.

A sejt életképessége: valamely sejtpopuláció teljes aktivitását mérő paraméter (pl. a vitális neutrálvörös festékanyag felvétele a sejtek lizoszómájába), amely a mérési végponttól és az alkalmazott vizsgálat felépítésétől függően korrelál a sejtek összmennyiségével és/vagy vitalitásával.

Relatív sejtéletképesség: a sejt életképessége a teljes vizsgálati eljáráson (vagy +Irr vagy –Irr) keresztülvitt, de a vizsgált vegyi anyaggal nem kezelt (negatív) kontrolloldószerekhez képest kifejezve.

PIF (fotoirritációs tényező): a vizsgált vegyi anyag nem citotoxikus UV A/látható fénnyel való besugárzás hiányában (–Irr) és annak jelenlétében (+Irr) előállított két, egyenlően hatékony citotoxikus koncentrációjának (IC_{50}) összehasonlításával meghatározott tényező.

IC_{50}: a vizsgált vegyi anyag azon koncentrációja, amelynél a sejt életképessége 50 %-ra esik vissza.

MPE (átlagos fényhatás): nem citotoxikus UV A/látható fénnyel való besugárzás hiányában (–Irr) és annak jelenlétében (+Irr) előállított koncentráció-válaszgörbék matematikai elemzéséből származtatott jellemző.

Fototoxicitás: olyan akut toxikus reakció, amelyet a bőr előbb bizonyos vegyi anyagoknak, majd azután fénynek való expozíciója idéz elő, vagy amelyet hasonlóan, valamely vegyi anyag szisztematikus alkalmazása után a bőr besugárzása idézi elő.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat egy vegyi anyagnak a szimulált napfény nem citotoxikus dózisának jelenlétében és anélkül való expozíciója során kimutatott citotoxicitásának összehasonlításán alapul. A citotoxicitást ebben a vizsgálatban a vitális neutrálvörös festékanyag felvételének koncentrációfüggő csökkenésével fejezik ki, amelyet 24 órával a vizsgálati vegyi anyaggal való kezelés és a besugárzás után mérnek (10). Az NR (neutrálvörös) egy gyengén kationos festékanyag, amely diffúzió nélkül könnyedén áthatol a sejthártyán, majd a sejten belül a lizoszómában összegyűlik. Az érzékeny lizoszómamembrán felületének módosulásai a lizoszóma törékenységéhez és egyéb elváltozásaihoz vezetnek, amelyek egyre inkább visszafordíthatatlanná válnak. Ezeknek a xenobiotikumok által előidézett változásoknak a következménye, hogy az NR felvétele és megkötése lecsökken. Így lehetőség van az életképes, a sérült vagy a halott sejtek megkülönböztetésére, ami ennek a vizsgálatnak az alapja.

▼B

Balb/c 3T3 sejteket 24 órán át tenyésztenek monorétegek képződésének céljából. Vizsgált vegyi anyagonként két 96 lyukú lemezt egy órán keresztül előinkubálnak a vizsgálati anyag nyolc különböző koncentrációjával. Ezek után a két lemez közül az egyiket a legnagyobb dózisú nem citotoxikus sugárzásnak teszik ki, miközben a másik lemezt sötétben tartják. Ezt követően mindkét lemezen a kezelési közeget tenyésztőközegre cserélik, és további 24 órás inkubációs idő elteltével meghatározzák a sejt életképességét a neutrálvörös felvétele alapján. A sejt életképességét a kezeletlen kontrolloldószer százalékában fejezik ki, és minden vizsgálati koncentrátumra vonatkozóan kiszámítják. A fototoxicitás meghatározása érdekében összehasonlítják a besugárzás jelenlétében vagy annak hiányában kapott koncentrációtól függő reakciókat, általában IC_{50} szinten, azaz a sejt életképességét 50 %-ra csökkentő koncentráció összehasonlítva a kezeletlen kontollanyaggal.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Előkészületek**

1.4.1.1. *Sejtek*

A validálási célú vizsgálat során az Amerikai Fajtakultúra Gyűjteményből (ATCC, Manassas, VA, USA), illetve az Európai Sejtkultúra Gyűjteményből (ECACC, Salisbury, Wiltshire, Egyesült Királyság) származó állandó egér fibroblaszt sejtvonal (Balb/c 3T3) 31. sz. klónját használták, ezért ajánlatos jól minősített sejtlerakatból ilyen sejteket beszerezni. Ugyanebben a vizsgálati eljárásban más sejtek vagy sejtvonalak is használhatók, de a tenyésztés feltételeit hozzá kell igazítani a sejtek egyedi igényeihez, és ki kell mutatni az egyenértékűséget.

A sejteket rendszeresen ellenőrizni kell, hogy nem történt-e mikoplazma-fertőzés, és csak azok a sejtek használhatók fel, amelyekben ilyet nem találtak (11).

Fontos, hogy az ebben a módszerben leírt minőség-ellenőrzési eljárásnak megfelelően rendszeresen ellenőrizzék a sejtek UV-érzékenységét. Mivel a sejtek UVA-érzékenysége a passzázsok számával nőhet, a lehető legkisebb, lehetőleg 100-nál kisebb passzázsszámú Balb/c 3T3 sejteket kell használni (lásd az 1.4.2.2.2. szakaszt és a 2. függeléket).

1.4.1.2. *Tenyésztőközegek és tenyésztési körülmények*

A rutinszerű szaporítás és a vizsgálati eljárás során megfelelő tenyésztőközeget és inkubálási körülményeket kell alkalmazni, például a Balb/c 3T3 sejtek esetében ez DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kiegészítve 10 % újszülöttborjú-szérummal, 4mM glutamin, penicillin (100 IU) és sztreptomicin (100 μg/ml), valamint párásított inkubálás 37 ºC-on, 5–7,5 % CO_2 a puffertől függően (lásd az 1.4.1.4. szakasz második bekezdését.). Különösen fontos, hogy a sejttenyésztés körülményei a használt sejtek vagy sejtvonalak normál sejtciklusidején belüli időtartamot biztosítsanak.

1.4.1.3. *A tenyészetek elkészítése*

Fagyasztott sejtkultúra-állományból származó sejteket megfelelő sűrűségben ráoltanak a tenyésztőközegre, és az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban történő felhasználást megelőzően legalább egyszer másodlagos tenyészetet hoznak létre.

▼B

A fototoxicitás-vizsgálathoz használt sejteket olyan sűrűségben oltják rá a tápoldatra, hogy mindaddig ne következzen be a tenyészetek konfluenciája, amíg a sejtráoltás után 48 órával meg nem határozzák a sejtek életképességét. A 96 lyukú lemezeken tenyésztett Balb/c 3T3 sejtek esetében a javasolt elhelyezési sűrűség 1×10^4 sejt/lyuk.

Minden egyes vizsgálandó vegyi anyag esetében a sejteket két darab 96 lyukú lemezre kell ráoltani, amelyeket azután párhuzamosan, a teljes vizsgálati eljárás folyamán egyforma tenyésztési feltételek között kell tartani, kivéve azt az időszakot, amikor az egyik lemezt besugározzák (+Irr), míg a másikat sötétben tartják (–Irr).

1.4.1.4. *A vizsgálandó anyag elkészítése*

A vizsgálandó anyagokat frissen, közvetlenül a felhasználás előtt kell elkészíteni, kivéve akkor, ha a tárolás során való stabilitásukat adatok igazolják. Ajánlatos minden vegyi kezelést és a sejtek kezdeti kezelését olyan fényviszonyok mellett elvégezni, hogy a besugárzást megelőzően ne következhessen be a vizsgálandó anyag fotoaktivitása vagy degradációja.

A vizsgálandó vegyi anyagokat pufferolt sóoldatban, például Earle-féle kiegyenlített sóoldatban (EBSS) vagy egyéb fiziológiailag kiegyenlített pufferoldatban fel kell oldani; az oldatok nem tartalmazhatnak fehérjekomponenseket, fény elnyelő komponenseket (pl. pH-jelző színeket és vitaminokat) annak érdekében, hogy elkerülhető legyen a besugárzás alatti interferencia. Mivel a besugárzás során a sejteket mintegy 50 percig a CO_2-inkubátoron kívül tartják, ügyelni kell arra, hogy ne következhessen be alkalizáció. Gyenge puffer, például EBSS használata esetén ez a sejtek 7,5 % CO_2-ban való inkubációjával érhető el. Ha a sejteket csak 5 % CO_2-ban inkubáljuk, akkor erősebb puffert kell választani.

A vízben kevéssé oldódó vizsgálandó vegyi anyagokat megfelelő oldószerben kell feloldani. Ha oldószert használnak, akkor annak állandó mennyiségben kell jelen lennie minden tenyészetben, azaz a negatív kontrollban (kontrolloldatban) éppúgy, mint a vizsgált vegyi anyag minden koncentrációjában, továbbá ebben a koncentrációban nem szabad citotoxikusnak lennie. A vizsgált vegyi anyag koncentrációit úgy kell megválasztani, hogy a csapadékképződés és az oldat zavarossága elkerülhető legyen.

A javasolt oldószerek a dimetil-szulfoxid (DMSO) és az etanol (ETOH). Más kis citotoxicitású oldószerek is alkalmasak lehetnek. A használat előtt az oldószereket jellegzetes tulajdonságaik szempontjából meg kell vizsgálni, például reakció a vizsgálandó vegyi anyaggal, a fototoxikus hatás elfojtása, radikális tisztítási jellemzők és/vagy kémiai stabilitás az oldószerben.

Az oldódás örvényes elegyítéssel és/vagy szonikus beavatkozással és/vagy megfelelő hőmérsékletre történő felmelegítéssel elősegíthető, kivéve akkor, ha ez a vizsgálandó vegyi anyag stabilitását befolyásolja.

▼B

1.4.1.5. *Besugárzási körülmények*

1.4.1.5.1. Fényforrás

A fototoxicitás-vizsgálat során nagyon lényeges szempont a megfelelő fényforrás és szűrők megválasztása. Az *in vivo* fototoxikus reakciók általában az UVA-fényhez és a látható tartományokhoz kapcsolódnak (3) (12), míg az UVB általában kisebb jelentőségű, de erősen citotoxikus; a citotoxicitás 1 000-szeresére nő, ha a hullámhossz 313 nm-ről 280 nm-re változik (13). A megfelelő fényforrás kiválasztása során kritériumként azt a követelményt is figyelembe kell venni, hogy a fényforrás által kibocsátott hullámhosszt a vizsgált vegyi anyagnak el kell nyelnie (abszorpciós spektrum), és a fény (ésszerű expozíciós idő alatt elérhető) dózisának elegendőnek kell lennie az ismert fotocitotoxikus vegyi anyagok kimutatásához. Ezenkívül az alkalmazott hullámhossz és dózis indokolatlanul nem károsíthatja a vizsgálati rendszert, például a hőkibocsátást (infravörös tartomány).

Optimális mesterséges fényforrásnak a napfény napfényszimulátorral történő szimulációja tekinthető. A szűrtnapfény-szimulátor spektrális energiaeloszlásának a szabadtéri nappali fény (14) szerinti spektrális energiaeloszlása közelében kell lennie. Napfényszimulátorként xenon ívfényeket és (bevont) higany-fém halogenid ívfényeket használnak (15). Ez utóbbiaknak az az előnye, hogy kevesebb hőt sugároznak és olcsóbbak, de a napfényhez nem hasonlítanak olyan tökéletesen, mint a xenon ívfények. Mivel minden napfényszimulátor jelentős mennyiségű UVB-t bocsát ki, a nagy citotoxicitású UVB-hullámhosszok csökkentése érdekében megfelelő szűrést kell alkalmazni. Mivel a sejtkultúra műanyag anyagai UV-stabilizátorokat tartalmaznak, a spektrumot ugyanolyan 96 lyukú lemezfedélen át kell mérni, mint amilyet a vizsgálat során használnak. Függetlenül attól, hogy a spektrum egyes részeit milyen módszerrel szűrjük ki, illetőleg függetlenül az alkalmazott eszközök elkerülhetetlen szűrőhatásától, a szűrők mögött regisztrált spektrum nem térhet el a szabványos szabadtéri nappali fényétől (14). A (8) és a (16) irodalomban található egy példa az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat validálási vizsgálatában használt szűrtnapfény-szimulátor spektrális irradianciaeloszlására. Lásd még a 2. függelék 1. ábráját is.

1.4.1.5.2. Dozimetria

Minden fototoxicitás-vizsgálat előtt megfelelő széles sávú UV-mérővel rendszeresen ellenőrizni kell a fény intenzitását (az irradianciát). Az intenzitást ugyanolyan 96 lyukú lemezfedélen át kell mérni, mint amilyet a vizsgálat során használnak. Az UV-mérőt a fényforráshoz kell kalibrálni. Ellenőrizni kell az UV-mérő viselkedését, erre a célra ajánlatos ugyanolyan típusú és ugyanúgy kalibrált másik UV-mérőt használni. Ideális esetben nagyobb időközönként spektroradiométerrel meg kell mérni a szűrt fényforrás spektrális irradianciáját, illetőleg ellenőrizni kell a széles sávú UV-mérő kalibrálását.

A vizsgálatok szerint az 5 J/cm^2 dózis (az UVA-tartományban mérve) a Balb/c 3T3 sejtekre nézve nem citotoxikus, és kellően hatékony ahhoz, hogy aktiválja a vegyi anyagokat a fototoxikus reakció kiváltására (6) (17), például 5 J/cm^2 50 perc alatt történő eléréséhez 1,7 mW/cm^2 irradianciát kellett beállítani. Lásd a 2. függelék 2. ábráját. Másik sejtvonal vagy másik fényforrás használata esetén előfordulhat, hogy a sugárdózist úgy kell kalibrálni, hogy olyan sugárzási dózist lehessen kiválasztani, hogy az ne károsítsa a sejteket, de elegendő legyen ahhoz, hogy szabályszerű fototoxicitást váltson ki. A fénynek való expozíció idejét a következőképpen kell kiszámítani:

▼B

$$\text{t(perc)} = \frac{\text{sugárdózis } (J \,/\, cm^2) \times 1000}{\text{irradiancia } (mW \,/\, cm^2) \times 60} \qquad (1J=1\ \text{Wsec})$$

1.4.2. **Vizsgálati körülmények**

1.4.2.1. *A vizsgált anyag koncentrációi*

A fény jelenlétében (+Irr) vagy hiányában (–Irr) vizsgált vegyi anyag koncentrációinak alkalmas tartományát dózistartomány-meghatározási kísérletek során kell meghatározni. Az oldhatóságot érdemes lehet kétszer: az első alkalom után 60 perc (vagy bármilyen más kezelési idő) elteltével másodszor is megállapítani, mivel az oldhatóság időben, illetve az expozíció során megváltozhat. A nem megfelelő tenyésztési feltételek, illetve az erősen savas vagy lúgos vegyi anyagok által kiváltott toxicitás elkerülése érdekében a vizsgált vegyi anyaggal kezelt sejtkultúrák pH-jának a 6,5–7,8 tartományban kell lennie.

A vizsgált anyag legnagyobb koncentrációjának a fiziológiai vizsgálati feltételeken belül kell lennie, például az ozmotikus és a pH-feszültséget kerülni kell. A vizsgált vegyi anyagtól függően szükséges lehet más olyan fizikai-kémiai tulajdonságokat is figyelembe venni, amelyek behatárolják a legnagyobb vizsgálati koncentrációt. A telítettségi pontnak megfelelő koncentrációig nem toxikus, viszonylagosan oldhatatlan anyagok esetében a fizikailag lehetséges legnagyobb koncentrációt kell vizsgálni. Általánosságban a vizsgált vegyi anyag kicsapódását minden vizsgálati koncentrációban kerülni kell. A vizsgált anyag maximális koncentrációja ne haladja meg a 1 000 μg/ml-t; az ozmolalitás ne haladja meg a 10 mmolart. Nyolc vizsgálati koncentrációból álló, konstans hígítási tényezőjű geometriai oldatsorozatot kell használni (lásd a 2.1. szakasz második bekezdését).

Ha a dózistartomány-meghatározási vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgálandó vegyi anyag a sötétben végzett kísérletben (–Irr) a koncentrációs határig nem citotoxikus, de besugárzás hatására (+Irr) erősen citotoxikus, az adatminőségi követelmény teljesítéséhez a (+Irr) kísérletek céljára kiválasztott koncentrációs tartományok különbözhetnek a (–Irr) kísérletekhez kiválasztottaktól.

1.4.2.2. *Ellenőrzések*

1.4.2.2.1. A sejtek sugárérzékenysége, történeti adatok előállítása

A sejteket a fényforrásra való érzékenységük tekintetében életképességük meghatározásával, növekvő dózisú besugárzás alkalmazásával rendszeresen ellenőrizni kell (körülbelül minden ötödik passzázs után). Ebben a kiértékelésben több besugárzási dózist kell alkalmazni, köztük a 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálathoz használt szintnél jóval nagyobbakat is. E dózisok nagysága a legkönnyebben a fényforrás UV-részének mérésével határozható meg. A sejteket az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban használt sűrűségben kell behelyezni, majd másnap besugárzásnak kell őket alávetni. Ezután egy nappal a neutrálvörös felvétele alapján meghatározható a sejt életképessége. Ki kell mutatni, hogy a keletkező legnagyobb nem citotoxikus dózis (pl. a validálási vizsgálatban: 5 J/cm^2 [UVA]) elegendő a referenciavegyianyagok besorolásának helyes megállapításához (1. táblázat).

▼B

1.4.2.2.2. Sugár érzékenység, az aktuális vizsgálat ellenőrzése

A vizsgálat abban az esetben felel meg a minőségi követelménynek, ha a sugárkezelt negatív/kontrolloldószerek a nem sugárkezelt negatív/oldószerrel összehasonlítva 80 %-nál nagyobb életképességet mutatnak.

1.4.2.2.3. A kontrolloldószerek életképessége

A kontrolloldószerekből kivont neutrálvörös abszolút optikai sűrűsége ($OD_{540\ NRU}$) jelzi, hogy a lyukanként elhelyezett $1x10^4$ sejt a vizsgálat két napja alatt a rendes megkettőződési időnek megfelelően fejlődött-e. A vizsgálat akkor felel meg az elfogadási kritériumnak, ha a kezeletlen kontollok $OD_{540\ NRU}$ átlaga ≥ 0,4 (azaz körülbelül hússzorosa a háttéroldószer felszívóképességének).

1.4.2.2.4. Pozitív kontroll

Minden *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálattal párhuzamosan egy ismert fototoxikus vegyi anyagot is vizsgálni kell. Ajánlatos a klórpromazin (CPZ) használata. Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban a standard protokoll szerint megvizsgált CPZ esetében a következő elfogadási kritériumok kerültek meghatározásra: sugárkezelt (+Irr) CPZ: IC_{50} = 0,1 μg/ml-től 2,0 μg/ml-ig, nem sugárkezelt (–Irr) CPZ: IC_{50} = 7,0 μg/ml-től 90,0 μg/ml-ig. A fotoirritációs tényezőnek (PIF) 6-nál nagyobbnak kell lennie. A pozitív kontroll történeti viselkedését ugyancsak vizsgálni kell.

Klórpromazin helyett párhuzamos pozitív kontrollként más, a vizsgált vegyi anyag kémiai osztályához vagy oldhatósági jellemzőihöz illő fototoxikus vegyi anyagok is használhatók.

1.4.3. **Vizsgálati eljárás (6) (7) (8) (16) (17):**

1.4.3.1. *1. nap:*

Adagoljunk 100 μl tenyésztőközeget egy 96 lyukú szövetkultúra mikrotiter lemezének periférikus lyukaiba (= üres lyukak). A fennmaradó lyukakba tegyünk 100 μl térfogatú, $1x10^5$ sejt/ml sejtet tartalmazó szuszpenziót (= $lxl0^4$ sejt/lyuk). A vizsgálandó anyag koncentrációinak minden egyes sorozatához, valamint a kontrolloldószerhez és a pozitív kontollokhoz két-két lemezt kell elkészíteni.

Inkubáljuk a sejteket 24 óráig (lásd az 1.4.1.2. szakaszt), míg félig konfluens monoréteget nem alkotnak. Ez az inkubációs idő lehetővé teszi a sejtek számára a megújulást, az adhéziót és az exponenciális növekedést.

1.4.3.2. *2. nap:*

Az inkubációt követően a sejteket távolítsuk el a tenyésztőközegből, és óvatosan mossuk meg 150 μl, az inkubációhoz használt pufferoldattal. Adjunk hozzá 100 μl olyan puffert, amely megfelelő koncentrációban tartalmazza a vizsgálandó vegyi anyagot vagy az oldószert (kontrolloldószert). A vizsgálandó vegyi anyag 8 különböző koncentrációját alkalmazzuk. A vizsgálandó anyaggal 60 percen át sötétben inkubáljuk a sejteket (lásd az 1.4.1.2. szakaszt és az 1.4.1.4. szakasz második bekezdését).

A vizsgált anyagok koncentrációinak minden egyes sorozatához és a kontrollokhoz elkészített két-két lemezből általában véletlenszerűen válasszunk ki egyet-egyet a citotoxicitás meghatározásához (–Irr) (ez lesz a kontroll-lemez), és egyet (ez lesz a kezelt lemez) a fotocitotoxicitás meghatározásához (+Irr).

▼B

A +Irr expozíció elvégzéséhez a sejtek besugárzását szobahőmérsékleten 50 percen át végezzük a 96 lyukú lemez fedelén keresztül, a legnagyobb olyan sugárdózissal, amely még nem citotoxikus (lásd a 2. függeléket is). A nem sugárkezelt lemezt (–Irr) ugyancsak tartsuk 50 percig szobahőmérsékleten egy sötét dobozban (= fényexpozíciós idő).

Szűrjük le a tesztoldatot, és óvatosan mossuk kétszer 150 µl, az inkubációhoz használt, de a vizsgált anyagot nem tartalmazó pufferoldattal. Helyettesítsük a puffert tenyésztőközeggel és inkubáljuk (lásd az 1.4.1.2. szakaszt) egy éjszakán át (18–22 h).

1.4.3.3. *3. nap:*

1.4.3.3.1. Mikroszkópos értékelés

A sejteket a növekedés, a morfológia és a monoréteg integritása tekintetében fáziskontrasztos mikroszkóppal kell megvizsgálni. A sejtek morfológiájában bekövetkezett változásokat és a sejtek növekedésében tapasztalt jelenségeket fel kell jegezni.

1.4.3.3.2. A neutrálvörös-felvétel vizsgálata

Mossuk meg a sejteket 150 µl előmelegített pufferrel. Gyenge ütögetéssel távolítsuk el a mosószert. Adjunk hozzá 100 µl 50 µg/ml neutrálvöröst (NR) (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazin-hidroklorid, EINECS-szám: 209-035-8; CAS-szám: 553-24-2; C.I.: 50040) tartalmazó szérum nélküli közeget (16), és az oldatot inkubáljuk az 1.4.1.2. bekezdésben leírtak szerint 3 órán át. Az inkubáció után távolítsuk el az NR közeget, és mossuk meg a sejteket 150 µl pufferrel. Szűrjük le, és szárítással vagy centrifugálással távolítsuk el a felesleges puffert.

Adjunk hozzá pontosan 150 µl NR deszorpciós oldatot (frissen készítve 49 rész víz + 50 rész etanol + 1 rész ecetsav).

Egy mikrotiter rázólemezen 10 percen át óvatosan rázzuk a mikrotiter lemezt, mindaddig, amíg az NR elválik a sejtektől, és homogén oldatot nem képez.

Egy spektrofotométerben 540 nm-en, az üres lapokat referenciaként használva mérjük meg az NR-kivonat optikai sűrűségét. Az adatokat további elemzés céljából megfelelő elektronikus fájlformátumban mentsük el.

2. ADATOK

2.1. AZ ADATOK MINŐSÉGE ÉS MENNYISÉGE

A vizsgálat adatainak lehetővé kell tenniük a sugárzás jelenlétében és annak hiányában kapott koncentráció-válasz adatok elemzését, és amennyiben lehetséges, a vizsgált anyag azon koncentrációjának meghatározását, amelynél a sejt életképessége 50 %-ra csökken (IC_{50}). Ha citotoxicitást találunk, a koncentrációk tartományát és az egyedi koncentrációértékeket úgy kell felvenni, hogy a vizsgálati adatokra görbe legyen fektethető.

Az egyértelműen pozitív és az egyértelműen negatív eredmények esetében is (lásd a 2.3. szakasz első bekezdését) elegendő lehet az első vizsgálat, amelyet előzetes dózistartománykereső kísérlet(ek) előz(nek) meg.

▼B

A kétes eredményeket, a határeseteket és a nem egyértelmű eredményeket további vizsgálatok során tisztázni kell (lásd még a 2.4. szakasz második bekezdését). Ilyen esetekben fontolóra kell venni a vizsgálati körülmények módosítását. Azok a vizsgálati körülmények, amelyek módosulhatnak, magukban foglalják a koncentrációk tartományát és konkrét értékeit, az előinkubációs időt és a sugárzási-expozíciós időt. Vízben instabil viselkedésű vegyi anyagok esetében rövidebb expozíciós időt érdemes alkalmazni.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az adatok értékeléséhez a fotoirritációs tényezőt (PIF) vagy az átlagos fényhatást (MPE) célszerű meghatározni.

A fotocitotoxicitás-értékek kiszámításához (lásd lent) a diszkrét koncentráció-válasz értékpárokat folyamatos koncentráció-válasz görbével (modell) kell közelíteni. A görbének az adatokra való illesztése általában valamilyen nemlineáris regressziós módszerrel történik (18). Az adatokra illesztett görbéhez képest a tényleges adatok eltéréseinek hatását „bootstrap” eljárással célszerű vizsgálni.

A fotoirritációs tényező (PIF) a következő képlet segítségével számítható ki:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Ha a fény jelenlétében vagy hiányában az IC_{50} nem számítható ki, a vizsgált anyag PIF értéke nem határozható meg. Az átlagos fényhatás (MPE) kiszámítása a teljes koncentráció-válasz görbék összehasonlításán alapul (19). Ez a mennyiség definíció szerint a fényhatás-értékek reprezentatív csoportján vett súlyozott átlagot jelenti:

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

A PE_C fényhatás bármely C koncentrációban az RE_C válaszhatás és a DE_C dózishatás szorzata: $PE_c = RE_c \times DE_c$. Az RE_c válaszhatás a fény jelenlétében és hiányában megfigyelt válaszok különbsége: $RE_c = R_c$ (–Irr) – R_c (+Irr). A dózishatást a következő összefüggés adja:

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

ahol C* az egyenérték-koncentráció, azaz az a koncentráció, amelynél C koncentráció esetén a +Irr válasz megegyezik a –Irr válasszal. Ha C* nem határozható meg, mert a +Irr görbe válaszértékei rendszeresen nagyobbak vagy kisebbek mint RC(–Irr), a dózishatást l-nek kell tekintetni. A wi súlyozó tényezőt a legnagyobb válaszérték adja, azaz w_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (–Irr) }. A C_i koncentrációértékeket úgy kell megválasztani, hogy a vizsgált koncentrációértékek által kijelölt minden egyes intervallumba ugyanannyi pont essen. Az MPE kiszámítása azon koncentrációmaximumra korlátozódik, amelynél a két görbe közül legalább az egyik még legalább 10 % válaszértéket mutat. Ha ez a koncentrációmaximum nagyobb, mint a +Irr vizsgálat során alkalmazott legnagyobb koncentráció, akkor úgy kell tekinteni, hogy a +Irr görbe maradék részén a válaszérték nulla. A vegyi anyagot attól függően tekintjük fototoxikusnak, hogy az MPE érték nagyobb-e, mint egy gondosan megválasztott kritikus érték (MPE_C = 0,15).

▼B

A PIF és az MPE kiszámításához rendelkezésre áll egy szoftvercsomag (20).

2.3. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A validálási vizsgálat alapján (8), ha a vizsgált anyagra PIF < 2 vagy MPE < 0,1, akkor „nincs fototoxicitás”. Ha PIF > 2 és < 5 vagy MPE > 0,1 és < 0,15, akkor „lehetséges a fototoxicitás”; ha PIF > 5 vagy MPE > 0,15, akkor „van fototoxicitás”.

Minden olyan laboratóriumnak, amely először végzi ezt a vizsgálatot, a fototoxicitás-vizsgálat keretében a vizsgálandó anyagok tesztelése előtt meg kell vizsgálnia az 1. táblázatban felsorolt referenciaanyagokat. A PIF és az MPE értékeknek az 1. táblázatban található értékek közelében kell lenniük.

1. táblázat

Kémiai név	EINECS-szám	CAS-szám	PIF	MPE	Felszívodás maximuma	Oldószer (1)
Amiodaron-hidroklorid	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (irányváltás)	etanol
Klórpromazin-hidroklorid	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanol
Norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitril
Antracén	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitril
Protoporfirin IX, Dinátrium	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanol
L-Hisztidin		[7006-35-1]	nincs	0,05–0,10	211 nm	víz
Hexaklorofén	200-733-8	[70-30-4]	1,1-1,7	0,00–0,05	299 nm 317nm (irányváltás)	etanol
Nátrium-lauril-szulfát	205-788-1	[151-21-3]	1,0-1,9	0,00–0,05	Nincs felszívódás	víz

(1) A felszívódás méréséhez használt oldószer.

2.4. AZ ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

Ha a fototoxikus hatás csak a legnagyobb vizsgálati koncentrációban figyelhető meg (különösen a vízben oldódó vizsgált vegyi anyagoknál), a kockázatok értékeléséhez további szempontok is szükségesek lehetnek. Ilyen szempont lehet a bőrön keresztül történő felszívódásra, valamint a bőrben való vegyianyag-felhalmozódásra vonatkozó adatok és/vagy más kísérletekből származó adatok, például a vegyi anyagnak *in vitro* állati vagy emberi bőrön, illetve bőrmodelleken történő vizsgálata.

▼B

Ha nem mutatható ki toxicitás (+Irr és –Irr) és ha a gyenge oldhatóság behatárolta a vizsgálható koncentrációk számát, akkor megkérdőjelezhető, hogy a vizsgálat alkalmas-e a kérdéses anyag tesztelésére, és meg kell fontolni ellenőrző vizsgálatok elvégzését, például másik modell használatát.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— azonosítási adatok, közhasználatú generikus név és IUPAC- és CAS-szám, ha ismert,

— fizikai tulajdonságok és tisztaság,

— a vizsgálat elvégzése szempontjából lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok,

— UV/látható fény-abszorpciós spektrum,

— szilárdság és fotostabilitás, ha ismert.

Oldószer:

— az oldószer kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált vegyi anyag oldószerben való oldhatósága,

— a kezelési közegben lévő oldószer aránya.

Sejtek:

— a sejtek típusa és eredete,

— a mikoplazma hiánya,

— a sejtpasszázsok száma, ha ismert,

— a sejtek sugárérzékenysége, amelyet az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálatban használt sugárkezelő eszközzel kell meghatározni.

Vizsgálati körülmények (1); *inkubáció a kezelés előtt és után:*

— a tenyésztőközeg típusa és összetétele,

— inkubációs körülmények (CO_2-koncentráció; hőmérséklet; páratartalom),

— az inkubáció időtartama (előkezelés; utókezelés).

Vizsgálati körülmények (2); *a vegyi anyaggal történő kezelés:*

— a sugárzás jelenléte vagy hiánya esetén használt vizsgálati vegyianyag-koncentrációk kiválasztásának magyarázata,

— a vizsgált vegyi anyag korlátozott oldhatósága és a citotoxicitás hiánya esetén: a vizsgált legnagyobb koncentráció magyarázata,

— a kezelési közeg típusa és összetétele (puffersóoldat),

— a vegyi kezelés időtartama.

Vizsgálati körülmények (3); *besugárzás:*

— a használt fényforrás kiválasztásának magyarázata,

▼B

— a fényforrás és a sugárzásmérő gyártója és típusa,

— a fényforrás spektrális irradiancia jellemzői,

— a használt szűrő(k) átviteli és abszorpciós jellemzői,

— a sugárzásmérő jellemzői és kalibrálásának részletei,

— a fényforrás távolsága a vizsgálati rendszertől,

— UVA-sugárzás ezen a távolságon, mW/cm^2-ben kifejezve,

— az UV/látható fénynek való expozíció időtartama,

— UVA-dózis (irradiancia × idő), J/cm^2-ben kifejezve,

— a sejtkultúrák besugárzás alatti, valamint az ezzel párhuzamosan sötétben tartott sejtkultúrák hőmérséklete.

Vizsgálati körülmények (4); *neutrálvörös életképességi vizsgálat:*

— a neutrálvörös kezelési közeg összetétele,

— a neutrálvörös inkubáció időtartama,

— inkubációs körülmények (CO_2-koncentráció; hőmérséklet; páratartalom),

— a neutrálvörös kivonásának körülményei (kivonó oldat; időtartam),

— a neutrálvörös optikai sűrűségének leolvasásához használt spektrofotométer hullámhossza,

— második hullámhossz (referencia), ha használják,

— a spektrofotométer üreslap-tartalma, ha használják.

Eredmények:

— a vizsgált vegyi anyag minden egyes koncentrációja esetén a sejt életképessége a párhuzamos kontrolloldószerek átlagos életképességének százalékában kifejezve,

— koncentráció-válasz görbék (a vizsgált vegyi anyag koncentrációja függvényében a relatív sejtéletképesség), amelyet párhuzamosan végzett +Irr és –Irr kísérletek során nyertek,

— a koncentráció-válasz görbék elemzése: ha lehetséges, az IC_{50} (+Irr) és IC_{50} (–Irr) kiszámítása,

— a sugárzás jelenlétében és hiányában nyert két koncentráció-válasz görbe összehasonlítása vagy a fotoirritációs tényező (PIF) vagy az átlagos fényhatás (MPE) kiszámításával,

— a vizsgálat elfogadási kritériumai; párhuzamos kontrolloldószer,

— a sugárkezelt és nem sugárkezelt sejtek abszolút életképessége (a neutrálvörös kivonat optikai sűrűsége),

— a negatív kontroll és a kontrolloldószer történeti adatai; átlagértékek és szórások,

— a vizsgálat elfogadási kritériumai; párhuzamos pozitív kontroll,

▼B

— a pozitív kontrollanyag IC_{50}(+Irr) és IC_{50}(–Irr), valamint PIF/MPE értéke,

— a pozitív kontrollanyagokra vonatkozó történeti adatok: IC_{50}(+Irr) és IC_{50}(–Irr), valamint PIF/MPE; átlagértékek és szórások.

Az eredmények értékelése.

Összefoglaló megállapítások.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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., Döring, B., Holzhütter, 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., Holzhütter, 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 *In 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 ENV7EHS, 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 photographic 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.

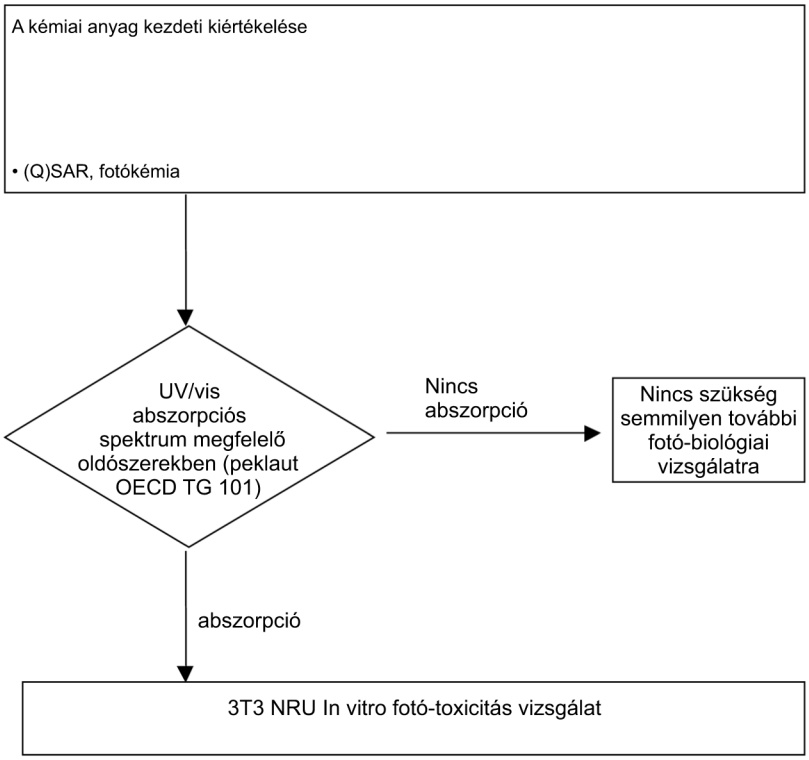
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445–462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

1. FÜGGELÉK

A 3T3 NRU PT szerepe a vegyi anyagok fototoxicitás-vizsgálatának szekvenciális megközelítésében

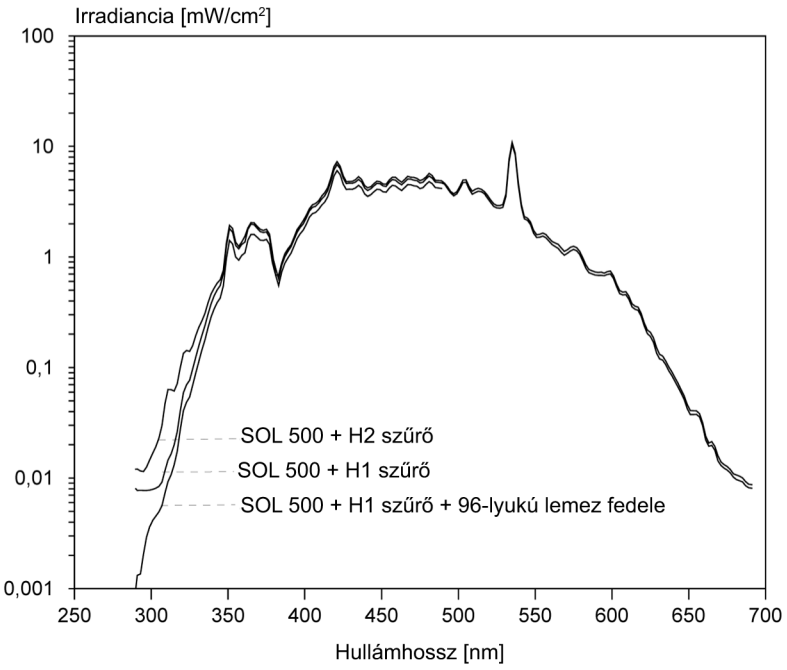


▼B

2. FÜGGELÉK

1. ábra

A szűrtnapfény-szimulátor spektrális energiaeloszlása



(lásd az 1.4.1.5. szakasz második bekezdését)

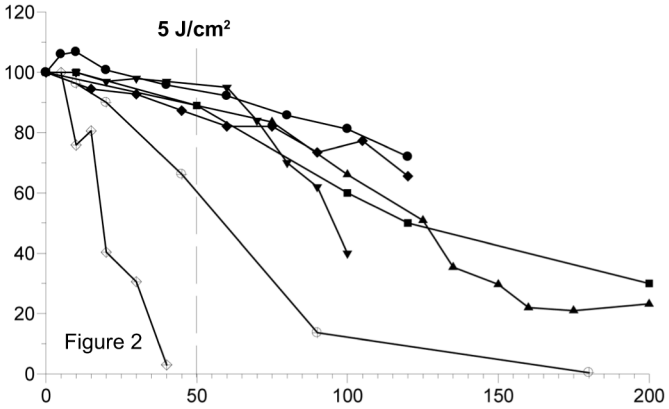
Az 1. ábrán példa található a szűrtnapfény-szimulátor elfogadható spektrális irradianciaeloszlására. A fényforrás a 3T3 NRU PT validálási vizsgálata során használt bevont fém-halogenid forrás (6) (8) (17). A görbén megfigyelhető a két különböző szűrő hatása és a 96 lyukú sejtkultúralemez fedelének további szűrőhatása. A H2 szűrőt csak olyan vizsgálati rendszerrel használták, amely nagyobb UVB-értéket is képes elviselni (bőrmodellvizsgálat és vörösvérsejt fotohemolízisének vizsgálata). A 3T3 NRU-PT-ben a H1 szűrőt használták. Az ábra azt mutatja, hogy a lemezfedél további szűrőhatását főként az UVB-tartományban figyelték meg, és ez még elég UVB-t hagyott a sugárzási spektrumban ahhoz, hogy aktiválja a jellegzetesen az UVB-tartományban abszorbeáló vegyi anyagokat, mint amilyen az amiodaron (lásd az 1. táblázatot).

▼B

2. ábra

Balb/c 3T3 sejtek sugárérzékenysége (az UVA-tartományban mérve)

Sejtéletképesség (% a sötét kontrollok neutrálvörös felvétele)



sugárzás időtartama (perc)

(10 perc = 1 joule UVA/cm²)

(lásd az 1.4.1.5.2. szakasz második bekezdését, valamint az 1.4.2.2.1. és az 1.4.2.2.2. szakaszt)

A Balb/c 3T3 sejteknek a 3T3 NRU fototoxicitás-vizsgálat validálási vizsgálatában használt napfényszimulátorral történő sugárzás hatása nyomán kialakuló érzékenysége az UVA-tartományban mérve. Az ábra a prevalidálási vizsgálat során 7 különböző laboratóriumban kapott eredményeket mutatja (1). Míg a két üres szimbólumú görbét öreg sejtekkel nyerték (nagy passzázsszám), amelyeket új sejttörzsekkel kellett helyettesíteni, addig a satírozott szimbólumú görbék olyan sejteket mutatnak, amelyeknek a sugártoleranciája elfogadható.

Ezekből az adatokból származtatták az 5 J/cm^2 legnagyobb nem citotoxikus sugárdózist (függőleges szaggatott vonal). A vízszintes szaggatott vonal emellett az 1.4.2.2. szakaszban megadott maximális elfogadható sugárhatást mutatja.

▼M3

B.42. **BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER**

BEVEZETÉS

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az ezeken alapuló uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzibilizáció egereken történő meghatározására irányuló eredeti vizsgálati módszert, a lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.42. fejezete) már korábban elfogadásra került (1). Az LLNA hitelesítésére vonatkozó információk és az ezzel kapcsolatos munka áttekintése a (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11) hivatkozásban található. Az aktualizált LLNA a tapasztalatok és tudományos adatok értékelésén alapul (12). Ez a második olyan vizsgálati módszer, amely a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizációt okozó hatásának állatokon történő vizsgálatára szolgál. A másik vizsgálati módszer (vagyis az OECD 406. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.6. fejezete) tengerimalacon végzett vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és a Bühler-vizsgálatot (13). Az állatjólét szempontjából az LLNA előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában szereplő módszereknél (13). Ez az aktualizált LLNA vizsgálati módszer több olyan teljesítményszabványt (1. függelék) foglal magában, amelyek alkalmazhatók az LLNA-hoz funkcionálisan és módszertanilag hasonló új és/vagy módosított vizsgálati módszerek hitelesítési státusának az OECD 34. iránymutatásában foglalt elvekkel összhangban történő értékeléséhez (14).

2. Az LLNA a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz vizsgálathoz alkalmazható kvantitatív adatokat szolgáltat. Megjegyzendő, hogy azok az enyhén/közepesen szenzibilizáló anyagok, amelyeket a tengerimalac-vizsgálati módszerekhez pozitív kontrollanyagként ajánlanak (vagyis B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13), az LLNA-nál is alkalmazhatók (6) (8) (15). E vizsgálati módszer esetében lehetőségként ismertetésre kerül a csökkentett LLNA (rLLNA) módszer is, amelyet akár 40 %-kal kevesebb állattal is el lehet végezni (16) (17) (18). Az rLLNA olyan esetekben alkalmazható, amikor a szabályozási előírásoknak megfelelően igazolni kell a feltételezett negatív bőrszenzibilizáló hatást, azzal a feltétellel, hogy a vizsgálati módszer e leírásában foglaltaknak megfelelően az LLNA protokolljában szereplő összes egyéb előírást betartják. A negatív eredmény feltételezésének a 4. bekezdésben leírtak szerint az összes rendelkezésre álló adaton kell alapulnia. Az rLLNA módszer alkalmazása előtt egyértelműen meg kell indokolni a módszert alkalmazását, és ismertetni kell az alkalmazását alátámasztó tudományos magyarázatot. Amennyiben az rLLNA a várakozásokkal ellentétben pozitív vagy kétes eredményt ad, az eredmény értelmezéséhez és tisztázásához további vizsgálatokra lehet szükség. Az rLLNA nem használható bőrszenzibilizáló vizsgált anyagok veszélyességének meghatározását célzó vizsgálatokhoz abban az esetben, ha dózis-válasz információra van szükség, mint például az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló 1272/2008/EK rendelet és az ENSZ vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere szerinti alkategóriákba sorolás esetében.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása a 2. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA alternatív módszert jelent a lehetséges bőrszenzibilizáló vegyi anyagok meghatározására. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy minden esetben az LLNA-t kell alkalmazni a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14) helyett, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést. A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgáló laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló összes

▼M3

adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezetileg rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy a LLNA alkalmazható-e az adott anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyianyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn az LLNA-val (lásd az (5) bekezdést), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.

5. Az LLNA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor csökkenteni lehet vele az e célra felhasznált állatok számát. Az LLNA emellett az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve jelentősen kíméletesebb (kevesebb fájdalommal és szenvedéssel jár). Az LLNA azon immunológiai történések figyelmes vizsgálatán alapul, amelyeket a vegyi anyagok a szenzibilizáció indukciós fázisában stimulálnak. A tengerimalac-vizsgálattól (B.6.; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) eltérően az LLNA-hoz nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. A tengerimalac-maximizációs vizsgálattal ellentétben nincs szükség adjuváns alkalmazására sem (13). Az LLNA alkalmazásával tehát csökkenthető az állatokat érő fájdalom és szenvedés mértéke. Az LLNA-nak a B.6. pont és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása szerinti vizsgálatokkal szembeni előnyei ellenére el kell ismerni, hogy a módszernek vannak olyan korlátai (pl. az LLNA hamis negatív eredményei egyes fémek, vagy hamis pozitív eredményei bizonyos bőrirritáló anyagok, [például bizonyos felületaktív szerek] esetében (19) (20), illetve a vizsgált anyag oldhatósága), amelyek szükségessé teszik a B.6. pont és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása szerinti vizsgálatok alkalmazását (21). Továbbá az olyan kémiai osztályok vagy funkcionális csoportot tartalmazó anyagok, amelyek lehetséges zavaró tényezőként szerepelnek (21) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. pont; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) használatát (13). Emellett a hitelesítési adatbázis hiányosságai miatt, amely elsősorban peszticid készítmények adataiból áll, az LLNA a tengerimalac-vizsgálatnál nagyobb valószínűséggel ad pozitív eredményt az ilyen típusú vizsgált anyagok esetében (22). A készítmények vizsgálatakor azonban, az LLNA megfelelő működésének bizonyításához meg lehet fontolni az ismert eredménnyel rendelkező, hasonló anyagok referenciaanyagként történő bevonását is (lásd 16. bekezdés). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA bármilyen anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek az anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA pontosságát.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. Az LLNA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaproliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokelvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dózisával és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy a vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt csoportban mért proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább $\geq$ 3-nak kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő besorolása. Az itt ismertetett eljárások *in vivo* radioaktív anyaggal történő jelölésen alapulnak, amellyel mérhető az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedése. A proliferációs sejtek számának vizsgálatára azonban más végpontok is alkalmazhatók, feltéve, hogy a PS követelmények maradéktalanul teljesülnek (1. függelék).

▼M3

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A CBA/Ca vagy CBA/J törzsbe tartozó, fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8–12 hétnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (23), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C ± 3 °C-nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálnak, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak; ezek olyan szenzibilizáló tesztanyagok, amelyek esetében a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mivel ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó

▼M3

laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd a 12. bekezdést). A pozitív kontrollnak az LLNA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 3-mal növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózisát úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (tehát SI > 20 már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 101-86-0) aceton: olívaolaj (4:1, v/v) keverékében és 5 %-os merkaptobenzotiazol (CAS-szám: 149-30-4) N,N-dimetilformamidban (lásd 1. függelék, 1. táblázat). Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.

12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az olyan, az LLNA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek a pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.

13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA vizsgálat módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, vagy a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítása a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.

14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálatai közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelőségére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetők azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (12).

15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiailag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (24). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagos kontrollt is vizsgálni kell.

16. Azokban az estekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó vizsgált anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú vizsgált anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:

— szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,

— ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,

— az LLNA módszerrel kapott alátámasztó adatok,

— egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

▼M3

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11-14. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.

18. A dózist és a vivőanyagot a (3) és (5) számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisok kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsort megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikokémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (3) (25). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd a 21-24. bekezdést).

19. A vivőanyagnak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1, v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (19), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofil vizsgált anyagokat olyan vivőanyagrendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.

20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 35. bekezdést). Emellett akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (12). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Egyes szabályozó hatóságok azonban esetleg elfogadhatónak tartják az állatokra vonatkozó összesítve gyűjtött adatokat, és ezekben az esetekben, a felhasználók eldönthetik, hogy egyedenként vagy összesítve kívánják-e gyűjteni a kísérleti állatokra vonatkozó adatokat.

Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd 23. bekezdés) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózisnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.

▼M3

22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA vizsgálathoz hasonló körülmények között kell elvégezni, eltekintve attól, hogy a nyirokcsomó proliferációt nem kell értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (6. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (25) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 6. napon. A 6. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi bőrirritációnak minősül a legalább ≥ 3-as pontszámú bőrpír és/vagy legalább ≥ 25 %-os fülvastagság-növekedés a vizsgálat bármely napján (26) (27). A fő LLNA vizsgálathoz azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentrációsorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

1. táblázat

Bőrpír (erythema) pontszámai

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (26) (27), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén is előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (30) (32) (33) (34).

24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (35) (36), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekció, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agreszszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyzörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Az értékelés során emellett figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömegcsökkenést az 1. naptól a 6. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévő, egyértelműen fájdalmat érző vagy súlyos, tartós szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (37).

▼M3

A fő vizsgálat kísérleti ütemterve

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

— *1. nap:* Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyünk fel 25 µl térfogatú, megfelelő hígítású vizsgált anyagot, valamint a vivőanyagot önmagában vagy pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.

— *2. és 3. nap:* Ismételjük meg az 1. napon elvégzett felviteli eljárást.

— *4. és 5. nap:* Nincs kezelés.

— *6. nap:* Jegyezzük fel az állatok testtömegét. Injekciózzunk 250 µl steril 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ^{3}H-metil-timidint tartalmazó sós foszfátpuffert (PBS) a kezelt és kontrollegerek farokvénájába. Használhatunk ehelyett 250 µl, steril 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jóddezoxiuridint és 10^{-5} M fluordezoxiuridint tartalmazó PBS-t is, szintén az egerek farokvénájába injektálva. Öt órával később exterminálják az állatokat. Mindegyik kísérleti csoportban az állatok füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és minden egyes állat esetében egyenként helyezzük PBS-be (egyedi állatokon alapuló megközelítés); vagy tegyük a mintákat kísérleti csoportonként egy PBS-t tartalmazó edénybe (kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítés). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrákat a (12) hivatkozásban találhatók. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár elölés utáni füldarabsúly-meghatározással).

A sejtszuszpenziók elkészítése

26. Az egyedi állatokon alapuló vagy kezelési csoporton alapuló összevont megközelítést alkalmazva, az egyes állatokból két oldalról vett nyirokcsomósejtekből (LNC) álló egysejtszuszpenziókat kell előállítani a sejtek 200 mikrométeres lyukméretű rozsdamentes acélból készült fémhálón keresztül vagy egyéb elfogadható módszerrel történő óvatos mechanikai szétválasztásával. A nyirokcsomósejteket nagy feleslegben lévő PBS-sel kétszer át kell mosni, majd a DNS-t 4 °C-on 18 órán át, 5 %-os triklórecetsavval (TCA) precipitálni (3). A pelleteket vagy 1 ml TCA-ban újra kell szuszpendálni és 10 ml szcintillációs folyadékot tartalmazó szcintillációs fiolákba (^{3}H-számlálás) áttenni, vagy közvetlenül gammaszámláló csövekbe (^{125}I-számlálás) kell átrakni.

A sejtproliferáció meghatározása (beépült radioaktivitás)

27. A ^{3}H-metil-timidin beépülését a β-szcintillációs beütésszámmal mérik, percenkénti bomlás (DPM) egységekben. A ^{125}I-jóddezoxiuridin beépülését a ^{125}I beütésszámával mérik, és ugyancsak DPM-ben fejezik ki. Az alkalmazott megközelítéstől függően a beépülést DPM/egér (egyedi állatokon alapuló megközelítés) vagy DPM/kezelési csoport (kezelési csoporton alapuló összevont megközelítés) egységben fejezik ki.

Csökkentett LLNA (rLLNA)

28. Bizonyos esetekben, amikor a szabályozási előírásoknak megfelelően igazolni kell a bőrszenzibilizáló képesség feltételezett hiányát, opcionális rLLNA protokoll alkalmazható (16) (17) (18), amelyhez kevesebb állatot kell felhasználni, azzal a feltétellel, hogy a vizsgálati módszer e leírásában foglalt, az LLNA protokolljában szereplő összes egyéb előírást betartják. Az rLLNA módszer alkalmazása előtt egyértelműen meg kell indokolni annak alkalmazását, és ismertetni kell az alkalmazást alátámasztó tudományos magyarázatot. Amennyiben a módszer pozitív vagy kétes eredményt ad, további vizsgálatokra lehet szükség az eredmény értelmezéséhez és tisztázásához.

▼M3

29. Az LLNA és az rLLNA vizsgálati módszerek protokolljai között az egyetlen különbség a dóziscsoportok kisebb száma az rLLNA esetében, ennélfogva az rLLNA módszer nem szolgáltat adatokat a dózis-válasz összefüggésre vonatkozóan. Az rLLNA módszer ezért nem alkalmazható olyan esetekben, amikor a dózis-válasz összefüggésre vonatkozó információkra van szükség. A több dózist alkalmazó LLNA módszerhez hasonlóan az rLLNA módszer során a vizsgált anyagból alkalmazott maximális koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy az ne idézzen elő az egérnél kifejezett szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt (lásd a 18. bekezdést).

MEGFIGYELÉSEK

Klinikai megfigyelések

30. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (37).

Testtömeg

31. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

32. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az egyedi állatokon alapuló megközelítés alkalmazása esetén, akkor az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos DPM-értéket el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos állatonkénti DPM-értékével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1. A kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítésének alkalmazása esetén az SI-t úgy kapják meg, hogy az egyes kezelési csoportokra eső összevont radioaktív beépülést elosztják a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra jutó összevont beépüléssel, ami megadja az átlagos SI-t.

33. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index legalább ≥ 3. Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény pozitívnak tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (4)(5)(6).

34. Ha a kapott eredmények tisztázást igényelnek, figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait, és ezen belül azt is, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e erőteljes helyi bőrirritációt egereknél, illetve hogy milyen a megfigyelt dózis-válasz összefüggés. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (7) hivatkozásban.

35. A radioaktivitási adatok egyes egerekre vonatkozó gyűjtése lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy Williams-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett „kiugró adatokkal”) és azok nélkül.

▼M3

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

36. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Az egyedi állatokon alapuló megközelítés alkalmazása esetén, ki kell mutatni az egyedi DPM-értéket, a csoport átlagos DPM/állat értékeit, az ehhez tartozó hiba értékeket (pl. SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokra vonatkozó átlagos SI értéket összevetve a megfelelő, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport értékével. A kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítésének alkalmazása esetén az egyes dóziscsoportoknál ki kell mutatni az átlagos/medián DMP és átlagos stimulációs index értékét összehasonlítva a megfelelő vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport értékével.

Vizsgálati jelentés

37. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

— azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, stabilitás, oldhatóság),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

— azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat,

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

— CBA egértörzs származása,

— az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),

— a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,

— a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

— a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,

— a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

— a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,

— a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív kontrollokra vonatkozó adatai,

▼M3

— ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

— az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és az exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,

— a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan,

— az egy egérre vonatkozó (egyedi állatokon alapuló megközelítés) és az átlagos (kezelési csoportokon alapuló összevont megközelítés) DPM-értékek és SI-értékek kezelési csoportonkénti táblázata,

— átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti DPM-értékek esetében, az egyes kezelés csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban, amennyiben az egyedi állatokon alapuló megközelítést alkalmazzuk,

— a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi, amennyiben az egyedi állatokon alapuló megközelítést alkalmazzuk,

— dózis-válasz összefüggés,

— adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

— rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: 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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: 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. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1. függelék

Teljesítményszabványok a bőrszenzibilizáció vizsgálatára javasolt hasonló vagy módosított LLNA vizsgálati módszerek értékeléséhez

BEVEZETÉS

1. A teljesítményszabványok (PS) célja annak ismertetése, hogy milyen alapon lehet egy vizsgálati módszerről – akár védett (például szerzői joggal védett, védjeggyel ellátott, bejegyzett), akár nem védett módszerről – megállapítani, hogy adott vizsgálati célokra kellő pontossággal és megbízhatósággal rendelkezik-e. Ezek a hitelesített és elfogadott vizsgálati módszereken alapuló teljesítményszabványok a hasonló tudományos elvekre és mérésre épülő, illetve azonos biológiai vagy toxikus hatást előrevetítő módszerek (köznapi elnevezéssel „me-too" vizsgálatok) megbízhatóságának és pontosságának értékelésére alkalmazhatók (14).

2. A módosított módszerek (például tervezett esetleges javítás egy jóváhagyott vizsgálati módszeren) alkalmazása előtt értékelést kell végezni annak meghatározására, hogy a tervezett változtatások milyen hatást gyakorolnak a vizsgálat teljesítményére, és milyen mértékben befolyásolják a hitelesítési folyamat egyéb összetevőiről rendelkezésre álló információkat. A tervezett változtatások számától és jellegétől, valamint a változtatásokra vonatkozóan keletkezett adatoktól és alátámasztó dokumentációtól függően, ezeket vagy az új vizsgálatokra előírtakkal megegyező hitelesítési eljárásnak, vagy – amennyiben ez lehetséges – a megállapított teljesítményszabványban foglalt korlátozott megbízhatósági és relevanciaértékelésnek kell alávetni (14).

3. Az e vizsgálati módszer alapján alkalmazásra javasolt hasonló vagy módosított eljárásokat megbízhatóságuk és pontosságuk meghatározása érdekében az LLNA-pontértékek teljes tartományát képviselő vegyi anyagok felhasználásával kell értékelni. Állatok indokolatlan felhasználásának elkerülése érdekében kifejezetten ajánlott, hogy a modell kifejlesztői, mielőtt a teljesítményszabványban és a vizsgálati módszer e leírásában adott útmutatásnak megfelelően megkezdenék a hitelesítési vizsgálatokat, egyeztessenek az illetékes hatóságokkal.

4. Ezek a teljesítményszabványok az LLNA hasonló vagy módosított változatainak értékelésére szolgáló US-ICCVAM, EC-ECVAM és Japanese-JaCVAM harmonizált teljesítményszabványokon alapulnak (12). A teljesítményszabvány tartalmazza a vizsgálati módszer alapvető összetevőit, az ajánlott referenciaanyagokat, valamint a pontosság és megbízhatóság azon szabványos értékeit, amelyet a javasolt módszernek el kell érnie, vagy meg kell haladnia.

I. **A vizsgálati módszer alapvető összetevői**

5. Annak biztosítására, hogy a hasonló vagy módosított LLNA módszer funkcionális és mechanikai szempontból megegyező legyen az LLNA-val, és ugyanazt a biológiai hatást mérje, a vizsgálati módszer protokolljában a következő összetevőknek kell szerepelniük:

— a vizsgált anyagot helyileg kell felvinni az egér mindkét fülére,

— a limfocitaproliferációt a vizsgált anyag alkalmazásának területéről elvezető nyirokcsomókban kell mérni,

— a limfocitaproliferációt a bőrszenzibilizáció indukciós fázisában kell mérni,

▼M3

— a vizsgált anyagból alkalmazott maximális koncentrációt úgy kell megválasztani, hogy az ne idézzen elő az egérnél szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt. Pozitív referenciaanyagok esetében a legmagasabb dózisnak el kell érnie legalább az adott referenciaanyag LLNA EC3 értékét (lásd az 1. táblázatot), ami még nem idéz elő az egérnél szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű helyi bőrirritációt,

— minden vizsgálat során alkalmazni kell párhuzamos negatív kontrollt, és adott esetben párhuzamos pozitív kontrollt is,

— dóziscsoportonként legalább négy állatot kell használni,

— az állatok adatai egyénileg vagy összesítve is gyűjthetők.

Amennyiben e feltételek bármelyike nem teljesül, akkor ezek a teljesítményszabványok a hasonló vagy módosított módszer hitelesítésére nem alkalmazhatók.

II. **A referenciaanyagok minimális listája**

6. Az US-ICCVAM, EC-ECVAM és a Japanese-JaCVAM harmonizált teljesítményszabvány (12) az LLNA teljesítményszabványában 18 minimálisan alkalmazandó referenciaanyagot, valamint négy opcionális referenciaanyagot azonosít (ezek például olyan anyagok, amelyek az LLNA-vizsgálatban álpozitív vagy álnegatív eredményt adtak a humán és a tengerimalacokon végzett vizsgálatokkal összehasonlítva [B.6. fejezet vagy az OECD 406. vizsgálati iránymutatása] (13), ezért lehetőséget biztosítanak az LLNA vizsgálatéval egyenértékű vagy jobb teljesítmény igazolására). E vegyi anyagok kiválasztása során a következő kritériumokat vették figyelembe:

— a referenciaanyagok listája megfelelt a bőrszenzibilizáció hatás szempontjából általában vizsgált anyagok típusainak, valamint az LLNA-val mérhető vagy előre jelezhető válaszreakciók tartományának,

— az anyagok jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkeznek,

— mindegyik anyagról rendelkezésre álltak tengerimalacokon végzett vizsgálatokból (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) és (lehetőség szerint) humán vizsgálatokból származó LLNA-adatok, valamint

— az anyagok kereskedelmi forrásból azonnal elérhetők voltak.

Az ajánlott referenciaanyagok felsorolása az 1. táblázatban található. Az ajánlott referenciaanyagok alkalmazásával végzett vizsgálatokat annál a vivőanyagnál kell értékelni, amellyel együtt az 1. táblázatban szerepelnek. Amennyiben a listában szereplő anyag esetleg nem áll rendelkezésre, akkor megfelelő indoklással az említett kiválasztási kritériumoknak megfelelő egyéb anyagok is használhatók.

▼M3

1. táblázat

Az LLNA teljesítményszabványhoz javasolt referenciaanyagok

Sorszám	Vegyi anyagok (1)	CAS-szám	Halmazál-lapot	Vivő (2)	EC3 % (3)	N (4)	0,5x – 2,0x EC3	Tényleges EC3-tarto-mány	LLNA vs. tengerimalac	LLNA vs. humán
1	5-klór-2-metil-4-izotiazolin-3-on (CMI)/2-metil-4-izotiazolin-3-on (MI) (5)	26172-55-4/ 2682-20-4	Foly.	DMF	0,009	1	0,0045-0,018	NSZ	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Szil.	AOO	0,049	15	0,025-0,099	0,02-0,094	+/+	+/+
3	4-feniléndiamin	106-50-3	Szil.	AOO	0,11	6	0,055-0,22	0,07-0,16	+/+	+/+
4	Kobalt-klorid	7646-79-9	Szil.	DMSO	0,6	2	0,3-1,2	0,4-0,8	+/+	+/+
5	Izoeugenol	97-54-1	Foly.	AOO	1,5	47	0,77-3,1	0,5-3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	Szil.	DMF	1,7	1	0,85-3,4	NSZ	+/+	+/+
7	Citrál	5392-40-5	Foly.	AOO	9,2	6	4,6-18,3	5,1-13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Foly.	AOO	9,7	21	4,8-19,5	4,4-14,7	+/+	+/+
9	Eugenol	97-53-0	Foly.	AOO	10,1	11	5,05-20,2	4,9-15	+/+	+/+
10	Fenil-benzoát	93-99-2	Szil.	AOO	13,6	3	6,8-27,2	1,2-20	+/+	+/+
11	Cinnamil-alkohol	104-54-1	Szil.	AOO	21	1	10,5-42	NSZ	+/+	+/+
12	Imidazolidinil-urea	39236-46-9	Szil.	DMF	24	1	12-48	NSZ	+/+	+/+
13	Metil-metakrilát	80-62-6	Foly.	AOO	90	1	45-100	NSZ	+/+	+/+
14	Klórbenzol	108-90-7	Foly.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15	Izopropanol	67-63-0	Foly.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Sorszám	Vegyi anyagok ([1])	CAS-szám	Halmazál-lapot	Vivő ([2])	EC3 % ([3])	N ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Tényleges EC3-tarto-mány	LLNA vs. tengerimalac	LLNA vs. humán
16	Tejsav	50-21-5	Foly.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	Metil-szalicilát	119-36-8	Foly.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	Szalicilsav	69-72-7	Szil.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Opcionális anyagok az LLNA-hoz viszonyított jobb teljesítmény igazolásához										
19	Nátrium-lauril-szulfát	151-21-3	Szil.	DMF	8,1	5	4,05-16,2	1,5-17,1	+/–	+/–
20	Etilén-glikol-dimetakrilát	97-90-5	Foly.	MEK	28	1	14-56	NSZ	+/–	+/+
21	Xilol	1330-20-7	Foly.	AOO	95,8	1	47,9-100	NSZ	+/ (**)	+/–
22	Nikkel-klorid	7718-54-9	Szil.	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Rövidítések: AOO = aceton: olívaolaj (4:1, v/v); CAS-szám = Chemical Abstracts Service szám; DMF = *N,N*-dimetilformamid; DMSO = dimetil-szulfoxid; DNCB = 2,4-dinitroklórbenzol; EC3 = 3-as stimulációs index előidézéséhez szükséges becsült koncentráció; GP = tengerimalacon végzett vizsgálat eredménye (*lásd* B. 6. vagy az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13); HCA = hexil-cinnamaldehid; Foly. = folyadék; LLNA = murin lokális nyirokcsomó-vizsgálat eredménye (*lásd* B.42. vagy az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) (2); MEK = metil-etil-keton; NA = nem alkalmazható, mivel a stimulációs index < 3; NSZ = nem került kiszámításra, mert az adatok egyetlen vizsgálatból származnak; Szil. = szilárd; Vivő, = a vizsgálathoz alkalmazott vivőanyag.

(*) Embereknél feltételezhetően nem okoz szenzibilizációt, mivel klinikai epikután (patch) teszt eredmények nem voltak fellelhetők, nem szerepel az epikután vizsgálati készletekben allergénként, továbbá humán szenzibilizációról szóló esettanulmány nem lelhető fel.

(**) Tengerimalacokra vonatkozó adatok nem állnak rendelkezésre.

([1]) A vegyi anyagokat aznap kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

([2]) A különböző vivőanyagok LLNA vizsgálat teljesítményére gyakorolt potenciális hatása miatt az egyes referenciaanyagokhoz ajánlott vivőanyagot kell használni (24) (32).

([3]) Átlagérték, ahol több EC3-érték is rendelkezésre állt. Negatív anyagoknál (3-as alatti stimulációs index) a legmagasabb vizsgált koncentráció van megadva.

([4]) Az adatok forrásául szolgáló LLNA-vizsgálatok száma.

([5]) Kereskedelemben kapható Kathon CG néven (CAS-szám: 55965-84-9), ami CMI és MI 3:1 arányú keveréke. Az egyes összetevők relatív koncentrációja a 1,1-1,25 %-os (CMI) és 0,3–0,45 %-os (MI) tartományban mozog. Inaktív összetevők a magnéziumsók (21,5–24 %) és a réz-nitrát (0,15–0,17 %), a fennmaradó rész pedig 74–77 % víz. A Kathon CG könnyen beszerezhető a Sigma-Aldrich and Rohm and Haas (jelenleg Dow Chemical Corporation) cégtől.

▼M3

III. **A megbízhatóságra és pontosságra vonatkozóan meghatározott szabványok**

7. A hasonló vagy módosított LLNA módszerek pontosságának a minimálisan alkalmazandó 18 referenciaanyaggal vizsgálva el kell érnie vagy meg kell haladnia az LLNA teljesítményszabványában meghatározott pontosságot. Az új vagy módosított módszernek „igen/nem” döntés alapján a vizsgált anyag helyes besorolását kell eredményeznie. Az új vagy módosított módszernek ugyanakkor nem feltétlenül kell az összes minimálisan alkalmazandó referenciaanyagot helyesen besorolnia. Ha például a vizsgálat a gyengén szenzibilizáló anyagok egyikét esetleg nem megfelelően sorolná be, akkor a hibás besorolás elméleti alapjait, valamint megfelelő kiegészítő adatokat (például olyan vizsgálati eredményeket, amelyek alapján a hibásan besorolt referenciaanyagéhoz hasonló fizikai, kémiai és szenzibilizáló jellemzőkkel rendelkező egyéb anyagok besorolása helyesen történt) figyelembe lehetne venni az egyenértékű teljesítmény bizonyítása érdekében. Ilyen körülmények között az új vagy módosított LLNA vizsgálati módszer hitelesítési státusának értékelése eseti alapon történne.

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság

8. A laboratóriumon belül reprodukálhatóság meghatározásához az új vagy módosított LLNA módszert az LLNA-vizsgálatban jól jellemzett szenzibilizáló anyag használatával kell értékelni. Ezért az LLNA teljesítményszabvány a hexil-cinnamaldehid (HCA) ismételt vizsgálataiból származó eredmények variabilitásán alapul. A laboratóriumon belüli megbízhatóság értékeléséhez négy külön alkalommal, a vizsgálatok között legalább egy hetes időszakot hagyva meg kell határozni a HCA-ra vonatkozó becsült koncentrációküszöb (ECt) értékeit. Akkor elfogadható a laboratóriumon belüli reprodukálhatóság, ha a laboratórium a HCA mindegyik vizsgálata során 5 % és 20 % közötti ECt-értékeket kap, amelyek a HCA-ra vonatkozóan az LLNA-vizsgálatban meghatározott átlagos EC3 (10 %) 0,5–2,0-szeresének felelnek meg (lásd az 1. táblázatot).

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság

9. Az új vagy módosított LLNA módszer laboratóriumok közötti reprodukálhatóságát az LLNA-vizsgálatban jól jellemzett két szenzibilizáló anyag használatával kell értékelni. Ezért az LLNA teljesítményszabványa a HCA és a 2,4-dinitroklórbenzol (DNCB) különböző laboratóriumokban végzett vizsgálataiból származó eredmények variabilitásán alapul. Az ECt-értékeket függetlenül, legalább három külön laboratóriumban végzett azonos vizsgálat alapján kell kiszámítani. Akkor igazolható a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, ha a HCA-ra mindegyik laboratórium 5 % és 20 % közötti, a DNCB-re pedig 0,025 % és 0,1 % közötti ECt-értékeket kap, amelyek az LLNA-vizsgálatban a HCA-ra (10 %), illetve a DNCB-re (0,05 %) vonatkozóan meghatározott átlagos EC3-koncentráció 0,5-2,0-szeresének felelnek meg (lásd az 1. táblázatot).

▼M3

2. függelék

Fogalommeghatározások

Pontosság: A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (14).

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Becsült koncentrációküszöb (ECt): Valamely vizsgált anyag ahhoz szükséges becsült koncentrációja, hogy az anyag pozitív válaszreakcióra utaló stimulációs indexet adjon.

Becsült koncentráció 3 (EC3): Valamely vizsgált anyag ahhoz szükséges becsült koncentrációja, hogy hármas stimulációs indexet adjon.

Álnegatív: Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában pozitív vagy aktív.

Álpozitív: Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában negatív vagy inaktív.

Veszély: Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyagok alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (14).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (14).

Me-too vizsgálat: Olyan vizsgálati módszerek köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy hitelesített és elfogadott referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. Az ilyen vizsgálati módszerek esetében megfelelő lehet az úgynevezett „catch-up” (rövidített) hitelesítési eljárás. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája (14).

Kiugró érték: A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

Teljesítményszabványok (PS): Hitelesített vizsgálati módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, funkcionalitás és végrehajtás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a hitelesített vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására alkalmazott vegyi anyagok közül kiválasztott referenciaanyagok minimális listája; valamint iii. a hitelesített vizsgálati módszerrel kapott eredmények alapján az a hasonló szintű pontosság és megbízhatóság, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek a referenciaanyagok minimális listájával történő értékeléskor mutatnia kell (14).

Védett vizsgálati módszer: Olyan vizsgálati módszer, amelynek esetében az előállítást és a forgalmazást szabadalmak, szerzői jogok, védjegyek stb. korlátozzák.

▼M3

Minőségbiztosítás: Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

Referenciaanyagok: A hitelesítési eljárás során történő alkalmazásra kiválasztott olyan vegyi anyagok, amelyek esetében már ismert az *in vitro* vagy *in vivo* referencia-vizsgálatirendszerben vagy vizsgált fajnál adott válaszreakció. Ezeknek a vegyi anyagoknak reprezentatívaknak kell lenniük arra az anyagcsoportra nézve, amely esetében a vizsgálati módszert várhatóan alkalmazni fogják, és képviselniük kell azon vegyi anyagokra jellemző válaszreakciók teljes tartományát – az erőstől kezdve a gyengén át a negatívig –, amelyek esetében az adott referenciaanyag alkalmazható. A hitelesítési eljárás különböző szakaszaiban, illetve a különböző vizsgálati módszerekhez és vizsgálati alkalmazásokhoz a referenciaanyagok különböző csoportjaira lehet szükség (14).

Relevancia: A vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) kell figyelembe venni (14).

Megbízhatóság: Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (14).

Bőrszenzibilizáció: Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

Stimulációs index (SI): Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag): Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

Hitelesített vizsgálati módszer: Olyan vizsgálati módszer, amely esetében az adott célra történő alkalmazás relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága hitelesítési vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a hitelesített vizsgálati módszerek nem feltétlenül nyújtanak megfelelő teljesítményt a pontosság és megbízhatóság tekintetében ahhoz, hogy egy tervezett alkalmazási célra megfelelőnek minősüljenek (14).

▼B

B.43. **NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN**

1. **MÓDSZER**

Ez a módszer egyenértékű az OECD TG 424 (1997) módszerrel.

Ennek a vizsgálati módszernek az a célja, hogy megkapjuk egy vegyület felnőtt állatokra gyakorolt neurotoxicitási potenciáljának igazolásához vagy további jellemzéséhez szükséges információkat. A vizsgálat végezhető más, az ismételt dózisú toxicitási vizsgálatokhoz alkalmazott ismert vizsgálati módszerekkel együtt vagy önálló vizsgálatként is. Az e módszeren alapuló vizsgálatok megtervezésekor ajánlatos az OECD Neurotoxicitási Vizsgálati Stratégiák és Módszerek Útmutatóját (1) is igénybe venni. Ez különösen akkor fontos, ha fontolóra vesszük a megfigyelések és vizsgálati eljárások módosítását az e módszer rutinalkalmazásához ajánlottakhoz képest. Az útmutató azzal a céllal készült, hogy elősegítse a konkrét feltételek esetén alkalmazandó egyéb vizsgálati eljárások kiválasztását.

Ez a módszer nem terjed ki a fejlődési neurotoxicitás tanulmányozására.

1.1. BEVEZETÉS

A vegyületek toxikus jellemzőinek vizsgálatakor és értékelésekor fontos figyelembe venni a neurotoxikus hatások lehetőségét. Már az ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálati módszer is magában foglal olyan megfigyeléseket, amellyel a neurotoxicitás lehetőségét szűrik. Ez a vizsgálati módszer felhasználható olyan vizsgálatok tervezésére, amelyekkel további információk szerezhetők az ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálatokban megfigyelt neurotoxikus hatásokkal kapcsolatban, vagy megerősíthetik azokat. Azonban bizonyos vegyületcsoportok potenciális neurotoxicitásának mérlegelése azt sugallhatja, hogy e módszer alkalmasabb lehet ezek vizsgálatára anélkül, hogy ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálatok az adott anyag potenciális neurotoxicitását előre jeleznék. Ilyen megfontolások például a következők:

— neurológiai tünetek vagy neuropathológiai léziók észlelése az ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálatoktól eltérő toxicitási vizsgálatokban, vagy

— szerkezeti összefüggések vagy más információk, amelyek kapcsolatba hozzák az anyagot ismert neurotoxikus anyagokkal.

Előfordulhatnak továbbá más olyan esetek is, amikor ezt a módszert érdemes alkalmazni. A további részleteket lásd az (1) hivatkozásban.

E módszert úgy dolgozták ki, hogy annak megfelelő kiigazításával egy vegyület egyedi kórszövettani és viselkedési neurotoxicitásának igazolására vonatkozó sajátos elvárásoknak is megfeleljen, és tegye lehetővé a neurotoxikus válaszok jellemzését és számszerűsítését.

▼B

A neurotoxicitást korábban azonosnak tekintették az idegbántalmakkal (neuropátia), beleértve az idegkórtani bántalmakat vagy idegműködési zavarokat, így például rohamokat, bénulást vagy remegést. Bár az idegbántalmak a neurotoxicitás fontos megnyilvánulási formáit jelentik, ma már világos, hogy az idegrendszeri toxicitásnak számos olyan jele van (pl. a mozgáskoordináció csökkenése, érzékelési zavarok, tanulási és memóriazavarok), amelyek neuropátiás vagy más típusú vizsgálatokban esetleg nem jelennek meg.

E neurotoxicitási vizsgálati módszert úgy alakították ki, hogy alkalmas legyen a jelentősebb viselkedésneurológiai és idegkórtani hatások felnőtt rágcsálókban történő kimutatására. Bár a viselkedésbeli hatások még morfológiai változások hiányában is tükrözhetik az élő szervezetekre gyakorolt káros hatásokat, nem minden viselkedésbeli változás specifikus az idegrendszerre. Így tehát minden megfigyelt változást az ezzel összefüggő kórszövettani, hematológiai vagy biokémiai adatokkal, valamint egyéb típusú szisztémás toxicitásra vonatkozó adatokkal összefüggésben kell értékelni. Az e módszerrel végzett és a neurotoxikus válaszok jellemzését, valamint számszerűsítését célzó vizsgálat specifikus kórszövettani és viselkedésvizsgálati eljárásokat is magában foglal, amelyek további elektrofiziológiai és/vagy biokémiai vizsgálatokkal is alátámaszthatók (1) (2) (3) (4).

A neurotoxikus anyagok egy sor célpontra hathatnak az idegrendszeren belül, és hatásmechanizmusuk is igen sokféle lehet. Mivel nem létezik egyetlen olyan vizsgálatsorozat sem, amelynek segítségével az összes anyag esetében meghatározható lenne a neurotoxikus potenciál, szükség lehet más, a megfigyelt vagy várt neurotoxicitás típusára specifikus *in vivo* vagy *in vitro* vizsgálatokra is.

Ez a vizsgálati módszer arra is felhasználható, hogy az OECD Neurotoxicitási Vizsgálati Stratégiák és Módszerek Útmutatójában (1) megfogalmazott iránymutatással összefüggésben olyan vizsgálatokat is lehessen általa tervezni, amelyek célja, hogy általuk tovább lehessen jellemezni vagy növelni a dózis-válasz összefüggés számszerű meghatározásának érzékenységét annak érdekében, hogy jobban meg lehessen becsülni a nem észlelhető káros hatás szintjét, vagy igazolható legyen a vegyület ismert vagy feltételezett veszélyessége. Olyan vizsgálatok is tervezhetők például, amelyek segítségével meghatározható(k) vagy értékelhető(k) a neurotoxicitási mechanizmus(ok), vagy kiegészíthetők a rendelkezésre álló, alap viselkedésneurológiai és neuropathológiai megfigyelési eljárások alkalmazásával kapott adatok. Az ilyen vizsgálatok esetében nem szükséges olyan adatok gyűjtését megismételni, amelyeket az e módszernél ajánlott standard eljárások alkalmazásával kapnának meg, ha az ilyen adatok már rendelkezésre állnak, és azokat nem tartják szükségesnek a vizsgálat eredményeinek értelmezéséhez.

Ez a neurotoxicitási vizsgálat – akár önállóan, akár más vizsgálatokhoz kapcsolódva végzik – olyan információkat szolgáltat, amelyek:

— meghatározhatják, hogy a vizsgálandó vegyület tartós vagy visszafordítható hatásokat gyakorolt-e az idegrendszerre,

— hozzájárulhatnak a kémiai vegyülettel történő expozícióval járó idegrendszeri elváltozások jellemzéséhez, illetve az ezek hátterében álló mechanizmusok megismeréséhez,

▼B

— meghatározhatják a dózis- és idő-válasz összefüggéseket a nem észlelhető káros hatás szint becsléséhez (amelyet a vegyület biztonsági kritériumainak megállapításához lehet felhasználni).

Ennél a vizsgálati módszernél a vizsgálandó anyagot orálisan adagolják. Más (pl. a dermális vagy inhalálásos) beadási módok esetenként megfelelőbbek lehetnek, amelyek használata esetén szükség lehet a javasolt eljárások módosítására is. A beadási mód kiválasztásával kapcsolatos megfontolások a humán expozíciós profiltól és a rendelkezésre álló toxikológiai és kinetikai adatoktól függenek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Káros hatás: a normálhoz viszonyított bármilyen, a kezelés okozta elváltozás, amely csökkenti az élő szervezet túlélésre, szaporodásra vagy környezethez való alkalmazkodásra való képességét.

Dózis: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist tömegegységben (g, mg), vagy a vizsgálandó anyag tömegének és a vizsgált állat tömegegységének hányadosában (pl. mg/kg), vagy a táplálékban lévő állandó koncentrációban (ppm) fejezik ki.

Adagolás: általános meghatározás, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

Neurotoxicitás: az idegrendszer szerkezetét vagy működését érintő káros elváltozás, amelyet egy kémiai, biológiai vagy fizikai ágens jelentette expozíció idéz elő.

Neurotoxikus anyag: bármilyen kémiai, biológiai vagy fizikai ágens, amely neurotoxicitást tud okozni.

NOAEL: a nem észlelhető káros hatás szintjének (no-observed-adverse effect level) rövidítése, amely azt a legmagasabb dózisszintet jelöli, amelynél nem figyelhetők meg kezeléssel összefüggő káros hatások.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálandó vegyületet egy dózistartományon belül több dózisban adagolják orálisan laboratóriumi rágcsálók több csoportjának. Általában ismételt dózisokat kell alkalmazni, és az adagolási rend lehet 28 napos, szubkrónikus (90 napos) vagy krónikus (1 éves vagy annál hosszabb). Az ebben a vizsgálati módszerben leírt eljárások akut neurotoxicitási vizsgálatokhoz is felhasználhatók. Az állatokat olyan módon vizsgálják, hogy lehetőség legyen a viselkedési és/vagy neurológiai rendellenességek észlelésére vagy jellemzésére. Minden megfigyelési időszakban egy sor olyan viselkedést vizsgálnak meg, amelyre hatással lehetnek a neurotoxikus anyagok. A vizsgálat végén az összes csoportból és mindkét nemből kiválasztanak néhány állatot, amelyeknél *in situ* perfúziót végeznek, és amelyekből agyi, gerincvelői és perifériás idegi metszeteket készítenek és vizsgálnak meg.

Ha a vizsgálatot a neurotoxikus hatások megállapítását vagy jellemzését célzó önálló vizsgálatként végzik, a csoportokba tartozó, perfúzióra és ezt követő kórszövettani vizsgálatokra (lásd 1. táblázat) fel nem használt állatokat olyan specifikus viselkedésneurológiai, neuropathológiai, neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokhoz lehet felhasználni, amelyek kiegészíthetik az e módszer szerint szükséges standard vizsgálatokkal kapott adatokat (1). E kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha empirikus megfigyelések vagy várható hatások a vegyület specifikus típusú vagy specifikus célterületre irányuló neurotoxicitását jelzik. Más esetben a fennmaradó állatok egyéb értékelések, így például a rágcsálókban végzett ismételt dózisú toxicitási vizsgálati módszerekben előírtak céljára alkalmazhatók.

▼B

Ha e vizsgálati módszer eljárásait más vizsgálati módszerek eljárásaival kombinálják, kellő számú állatra van szükség ahhoz, hogy mindkét vizsgálat megfigyelési igényei kielégíthetők legyenek.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár megfelelő indoklás esetén más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolást általában az elválasztás után a lehető leghamarabb meg kell kezdeni, lehetőleg még az állatok hathetes koráig, de mindenképpen azelőtt, hogy elérnék a kilenchetes kort. Azonban ha a vizsgálatot más vizsgálatokkal kombinálják, a korra vonatkozó követelményeket esetleg ennek megfelelően módosítani kell. A vizsgálat kezdetén az alkalmazott állatok közötti testtömegeltérés nem haladhatja meg az egyes ivarok átlagának ± 20 %-át. Ha egy hosszú távú vizsgálat előtt előzetes vizsgálatként rövid időtartamú ismételt dózisú vizsgálatot végeznek, mindkét vizsgálatban azonos törzsből és forrásból származó állatokat kell használni.

1.4.2. **Az állatok tartásának és etetésének körülményei**

A kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70 %-ot, a javasolt átlagértéknek 50 és 60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Minimálisra kell csökkenteni az időszakosan jelentkező erős zajokat. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását az is befolyásolhatja, hogy ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal adják be, akkor az megfelelően keveredjen el az élelemmel. Az állatokat tarthatjuk egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is.

1.4.3. **Az állatok előkészítése**

Az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kell beosztani a kezelt és kontrollcsoportokba. A ketreceket úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az állatokat egyedi azonosítóval kell ellátni, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt (5) napig a ketrecükben kell őket tartani, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.4. **A beadási mód és a dózisok előkészítése**

Ez a vizsgálati módszer konkrétan előírja a vizsgálandó anyag orális alkalmazását, amely történhet szondán keresztül, táplálék vagy ivóvíz útján vagy kapszulák beadásával. Más beadási módok (pl. dermális vagy inhalálásos) is használhatók, de emiatt esetleg módosítani kell az ajánlott eljárásokat. A beadási mód megválasztása függ a humán expozíciós profiltól és a rendelkezésre álló toxikológiai vagy kinetikai információktól. A beadási mód megválasztását meg kell indokolni, továbbá meg kell jelölni az ebben a vizsgálati módszerben előírt eljárások emiatt szükségessé vált módosításait is.

▼B

Ha szükséges, a vizsgálandó anyagot megfelelő vivőanyagban fel lehet oldani vagy szuszpendálni. Elsősorban vizes oldatot/-szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy szuszpenziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot vagy szuszpenziót. Ismerni kell a vivőanyag toxikus jellemzőit. Emellett a vivőanyag következő jellemzőit kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára és visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

1.5. ELJÁRÁSOK

1.5.1. **Az állatok száma és ivara**

Ha a vizsgálatot önálló vizsgálatként végzik, legalább 20 állatot (10 nőstényt és 10 hímet) kell alkalmazni minden egyes dózis- és kontrollcsoportban a részletes klinikai és funkcionális megfigyelések értékeléséhez. A 10 hím és 10 nőstény közül a vizsgálat végén legalább öt hímet és öt nőstényt kell kiválasztani az *in situ* perfúzióhoz és a részletes ideg-kórszövettani vizsgálatokhoz. Ha az adott dóziscsoportban csak korlátozott számú állatnál lehet megfigyelni neurotoxikus hatásokat, fontolóra kell venni ezeknek az állatoknak is a perfúzióra kijelöltek közé való felvételét. Ha a vizsgálatot egy ismételt dózisú toxicitási vizsgálattal egybekötve végzik, kellő számú állatot kell felhasználni ahhoz, hogy mindkét vizsgálat célkitűzéseit meg tudják valósítani. A vizsgálatok különböző kombinációi esetén szükséges minimális csoportméreteket az 1. táblázat tartalmazza. Ha időközi exterminációkat vagy a toxikus hatások visszafordíthatóságának, tartósságának vagy kezelés utáni késleltetett megjelenésének megfigyelésére gyógyulási csoportokat vagy kiegészítő megfigyeléseket is terveznek, a kísérleti állatok számát úgy kell növelni, hogy elegendő számú állatot biztosíthassanak a megfigyelésekhez és kórszövettani vizsgálatokhoz.

1.5.2. **A kezelt és kontrollcsoportok**

Általában legalább három dóziscsoportot és egy kontrollcsoportot kell alkalmazni, de ha más adatok áttekintése alapján 1 000 mg/testtömeg-kg/nap ismételt dózis alkalmazásakor sem várhatók hatások, akkor lehet határérték-vizsgálatot is végezni. Ha nincs megfelelő adat erre nézve, akkor tartománybehatároló vizsgálat is végezhető az alkalmazandó dózisok meghatározásának elősegítésére. Attól eltekintve, hogy a vizsgálandó anyagot nem alkalmazzák, a kontrollcsoportokban lévő állatokat ugyanúgy kell kezelni, mint a kezelt csoportokban lévőket. Ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a legnagyobb alkalmazott térfogatban kell beadni a vivőanyagot.

1.5.3. **A megbízhatóság ellenőrzése**

A vizsgálatot végző laboratóriumnak adatokkal kell igazolnia, hogy el tudja végezni a vizsgálatot, illetve hogy az alkalmazott eljárások megfelelő érzékenységűek. Az ilyen adatoknak bizonyítékkal kell szolgálniuk a megfigyelésre javasolt különféle végpontok, így például az autonóm tünetek, a szenzoros reaktivitás, a végtagok fogóereje, valamint a motoros aktivitás változásainak detektálására és adott esetben számszerűsítésére való képességet. A különböző típusú neurotoxicitási válaszokat kiváltó és pozitív kontrollként alkalmazható vegyületekkel kapcsolatos információk a (2) és a (9) hivatkozásban találhatók. Ha a kísérleti eljárások lényeges vonásai nem változnak, akkor korábbi adatok is felhasználhatók. Javasolt a korábbi adatok időszakos felfrissítése. Az eljárások érzékenységének fennmaradását igazoló új adatokra akkor van szükség, ha a vizsgálat vagy az eljárások valamely lényegi elemét a vizsgálatot végző laboratórium megváltoztatta.

▼B

1.5.4. **A dózisok kiválasztása**

A dózisszinteket a vizsgálandó vegyülettel vagy rokon anyagokkal kapcsolatban esetlegesen rendelkezésre álló korábbi toxicitási és kinetikai adatok figyelembevételével kell meghatározni. A legnagyobb dózist azt a célt szem előtt tartva kell megválasztani, hogy a neurotoxikus hatásokat vagy egyértelmű szisztémás toxikus hatásokat váltson ki. Ezt követően úgy kell csökkenő sorrendben kiválasztani a kisebb dózisokat, hogy meg lehessen határozni a dózissal összefüggő válaszokat, illetve a legkisebb dózisnál a nem észlelhető káros hatás szintjét (NOAEL). A dózisszinteket elvben úgy kell beállítani, hogy meg lehessen különböztetni az idegrendszerre gyakorolt elsődleges toxikus hatásokat a szisztémás toxicitással összefüggő hatásoktól. Gyakran optimális a két-három intervallum alkalmazása, és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. Ha létezik a humán expozícióra vonatkozóan elfogadható becslés, akkor ezt is figyelembe kell venni.

1.5.5. **Határérték-vizsgálat**

Ha egy egyetlen, legalább 1 000 mg/testtömeg-kg/nap dózis alkalmazásával történő, az itt ismertetett eljárások szerint elvégzett vizsgálat nem idéz elő észlelhető neurotoxicitást, és ha a szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás, a három dózisszint alkalmazásával történő teljes vizsgálatot esetenként szükségtelen elvégezni. A várható humán expozíció nagyobb orális dózis alkalmazását teszi esetenként szükségessé a határérték-vizsgálatban. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikaikémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik a lehetséges expozíciós szint maximumát. Akut orális vizsgálat elvégzéséhez a határérték-vizsgálat során alkalmazott dózisnak legalább 2 000 mg/kg-nak kell lennie.

1.5.6. **A dózisok beadása**

A vizsgálandó anyag dózisait legalább 28 napon át naponta, azaz heti hét napon át kell adagolni az állatoknak; ötnapos adagolási rend vagy rövidebb expozíciós időszak alkalmazását megfelelően indokolni kell. Ha a vizsgálandó anyagot szondán át adagolják, a dózist lehetőleg egyszerre kell egy gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni az állatnak. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadék adható be, a kísérleti állatok méretétől függ. A térfogat nem lehet 1 ml/100 g testtömegaránynál nagyobb. Vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömegarány is alkalmazható. Az irritáló vagy korróziós hatású anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk általában súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációt kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani.

A táplálékkal vagy ivóvízzel bejuttatott anyagok esetében fontos, hogy a vizsgálandó anyag mennyisége ne zavarja a normál táplálkozást vagy vízháztartást. Ha a vizsgálandó anyagot a táplálékkal juttatják be, vagy a táplálékbeli koncentrációt (ppm), vagy pedig az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát alkalmazzák. A szondával bejuttatott anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és szükség szerint újra és újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani. Ha egy hosszú távú vizsgálat előtt előzetes vizsgálatként ismételt dózisú vizsgálatot végeznek, mindkét vizsgálatban hasonló takarmányt kell alkalmazni. Akut vizsgálatok esetén, ha a dózist nem lehet egyszerre bejuttatni, akkor egy legfeljebb 24 órás időtartam alatt részletekben is beadható.

▼B

1.6. MEGFIGYELÉSEK

1.6.1. **A megfigyelések és vizsgálatok gyakorisága**

Ismételt dózisú vizsgálatok esetében a megfigyelési időszaknak az egész kezelési időszakot le kell fednie. Akut vizsgálatok esetében a kezelés után 14 napig kell még megfigyeléseket végezni. A mellékcsoportokba tartozó és a kezelés utáni időszakban expozíció nélkül tartott állatok esetében a megfigyeléseknek ezt az időszakot is le kell fedniük.

A megfigyeléseket kellő gyakorisággal kell végezni, hogy az esetleges viselkedési és/vagy neurológiai rendellenességek észlelésének valószínűsége a lehető legnagyobb legyen. A megfigyeléseket lehetőleg mindig a nap azonos szakában kell végezni, és ehhez figyelembe kell venni azt is, hogy a várt hatások a dózis beadása után mikor érik el a maximumukat. A klinikai megfigyelések és funkcionális vizsgálatok gyakoriságát a 2. táblázatban foglaltuk össze. Ha a kinetikai adatok vagy más, korábbi vizsgálatokban kapott adatok szerint más időpontokat kellene alkalmazni a megfigyelésekhez, vizsgálatokhoz vagy megfigyelések utáni időszakokhoz, alternatív kísérleti programot kell követni a kinyerhető információk maximalizálása érdekében. A kísérleti program ilyen jellegű módosításait meg is kell indokolni.

1.6.1.1. *Az általános egészségi állapot és a megbetegedések/elhullások megfigyelése*

Az állatok egészségi állapotát legalább naponta egyszer, a megbetegedéseket és elhullásokat pedig naponta kétszer gondosan meg kell figyelni.

1.6.1.2. *Részletes klinikai megfigyelések*

Az első expozíciót megelőzően egy alkalommal (az egyeden belüli összehasonlításokhoz), majd ezt követően a vizsgálat teljes időtartamától függően különböző időközönként (lásd 2. táblázat) részletes klinikai megfigyeléseket kell végezni az erre a célra kiválasztott összes állaton (lásd 1. táblázat). A gyógyulási mellékcsoportok részletes klinikai megfigyeléseit a gyógyulási időszak végén kell elvégezni. A részletes klinikai megfigyeléseket a ketrecen kívül, egy standard porondon kell végezni. Az észleléseket egy olyan pontozási rendszer segítségével kell gondosan felvenni, amely a megfigyelés során végzett minden egyes mérés esetében kritériumokat vagy pontozási skálákat is magában foglal. A vizsgálólaboratóriumnak világosan meg kell határoznia az alkalmazott kritériumokat vagy skálákat. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti (a kezeléssel szisztematikusan nem összefüggő) eltérések, és hogy a megfigyeléseket az aktuális kezelést nem ismerő, képzett megfigyelők végezzék.

A megfigyeléseket ajánlatos megtervezetten végezni, amelynek során minden állatra vonatkozóan és minden megfigyelési időpontban világosan meghatározott (a „normál tartomány” meghatározását is magában foglaló) kritériumokat kell szisztematikusan alkalmazni. A „normál tartományt” megfelelően dokumentálni kell. Minden megfigyelt tünetet fel kell jegyezni. Ha megoldható, a megfigyelt tünetek erősségét is fel kell jegyezni. A klinikai megfigyelések többek között a bőr, a szőrzet, a szemek, a nyálkahártyák változásaira, szekrétumok és exkrétumok, valamint az autonóm aktivitás megjelenésére (pl. könnyezés, szőrmeredezés, pupillaméret, szokatlan légzési mintázat és/vagy szájon át történő légzés, szokatlan vizelés vagy székletürítés és elszíneződött vizelet) irányulnak.

▼B

Rögzíteni kell továbbá a testhelyzettel, aktivitási szinttel (pl. a standard porond csökkent vagy fokozott felderítése) és a mozgáskoordinációval kapcsolatos összes szokatlan választ is. A járás (pl. kacsázás, ataxia), a testtartás (pl. púpos tartás) és a megfogás, elhelyezés vagy más környezeti ingerekkel szembeni reaktivitás megváltozását, valamint a rángásos vagy görcsös mozgásokat, görcsös vonaglásokat vagy remegéseket, sztereotípiákat (pl. túlzott tisztálkodást, szokatlan fejmozgásokat, ismétlődő körbejárást) vagy bizarr viselkedést (pl. harapást vagy túlzott nyalogatást, öncsonkítást, hátrafelé menést, hangadást) vagy agressziót is fel kell jegyezni.

1.6.1.3. *Funkcionális vizsgálatok*

A részletes klinikai megfigyelésekhez hasonlóan az expozíció előtt, majd azt követően rendszeres időközönként funkcionális vizsgálatokat is kell végezni az erre kiválasztott összes állaton (lásd 1. táblázat). A funkcionális vizsgálatok gyakorisága is a teljes vizsgálat időtartamától függ (lásd 2. táblázat). A 2. táblázatban megadott megfigyelési időszakok mellett az exterminációhoz a lehető legközelebbi időpontban a gyógyulási mellékcsoportokban is funkcionális vizsgálatokat kell végezni. A funkcionális vizsgálatok során meg kell figyelni a különféle [pl. hallási, látási és proprioceptív (5) (6) (7)] ingerekre adott szenzoros reaktivitást, és el kell végezni a végtagok fogóerejének (8), valamint a motoros aktivitásnak a vizsgálatát (9). A motoros aktivitást olyan automata berendezéssel kell mérni, amely az aktivitás csökkenés és az aktivitásnövekedés kimutatására is képes. Ha egy másik meghatározott rendszert alkalmaznak, akkor annak kvantitatívnak kell lennie, és igazolni kell annak érzékenységét és megbízhatóságát is. Minden berendezés esetében ellenőrizni kell, hogy időben megbízhatóan, illetve az egyes berendezések egymáshoz képest konzisztensen működnek-e. A követendő eljárásokkal kapcsolatban a további részletek a vonatkozó hivatkozásokban találhatók. Ha nincsenek olyan adatok (pl. szerkezetaktivitási, epidemiológiai adatok vagy más toxikológiai vizsgálati adatok), amelyek potenciális neurotoxikus hatásokat jeleznének, fontolóra kell venni specializáltabb vizsgálatok végzését a szenzoros és motoros működés vagy a tanulás és a memória tanulmányozására, e lehetséges hatások részletesebb vizsgálata érdekében. A specializáltabb vizsgálatokkal és alkalmazásukkal kapcsolatban további információk az (1) hivatkozásban találhatók.

Kivételes esetben ki lehet hagyni a funkcionális vizsgálatból azokat az állatokat, amelyeknél a toxicitás jelei olyan mérvűek, hogy már zavarják az adott vizsgálatot. Meg kell indokolni, amennyiben az ilyen állatokat kizárják valamely funkcionális vizsgálatból.

1.6.2. **Testtömeg és táplálék/vízfogyasztás**

A legfeljebb 90 napig tartó vizsgálatok esetében minden állat testtömegét legalább hetente egyszer meg kell mérni, továbbá legalább hetente a táplálékfogyasztást is ellenőrizni kell (illetve ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adják be, akkor annak fogyasztását is). A hosszú távú vizsgálatok esetében az állatok testtömegét az első 13 hét során legalább hetente egyszer, majd azt követően legalább négyhetente meg kell mérni. Az első 13 hét során a táplálékfogyasztást (illetve ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adjuk be, akkor annak fogyasztását is) legalább hetente, majd azt követően körülbelül háromhavonta kell megmérni, kivéve ha az egészségi állapot változásai vagy testtömegváltozások azt másképp szabják meg.

▼B

1.6.3. **Szemészeti vizsgálatok**

A 28 napnál hosszabb vizsgálatok esetében lehetőleg minden állaton, de legalább a nagy dózissal kezelt és a kontrollcsoportokba tartozó állatokon a vizsgálandó anyag adagolásának megkezdése előtt, illetve a vizsgálat legvégén szemtükör vagy ezzel egyenértékű és megfelelő eszköz alkalmazásával szemészeti vizsgálatokat kell végezni. Ha szemelváltozást tapasztalnak, vagy ha a klinikai tünetek alapján ez szükségesnek látszik, minden állatot meg kell vizsgálni. A hosszú távú vizsgálatok esetében a 13. héten is szemészeti vizsgálatot kell végezni. Nem kell szemészeti vizsgálatot végezni, ha ilyen adatok más, hasonló időtartamú és hasonló dózisszintek mellett történő vizsgálatokból már rendelkezésre állnak.

1.6.4. **Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok**

Ha a neurotoxicitási vizsgálatot ismételt dózisú szisztémás toxicitási vizsgálattal kombinálva végzik, a szisztémás toxicitási vizsgálat vonatkozó módszerében előírtaknak megfelelően hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatokat is végezni kell. A mintavételt úgy kell végrehajtani, hogy minimális legyen a potenciális viselkedésneurológiai hatások kockázata.

1.6.5. **Kórszövettani vizsgálatok**

A neuropathológiai (idegkórtani) vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy egészítse ki és bővítse a vizsgálat *in vivo* fázisában tett megfigyeléseket. Ivaronként és csoportonként legalább 5 állatból (1ásd az 1. táblázatot és a következő bekezdést) szövetmintát kell venni, amelyet azután általánosan elfogadott perfúziós és fixálási technikák alkalmazásával *in situ* fixálni kell (lásd a (3) hivatkozás 5. fejezetét és a (4) hivatkozás 50. fejezetét). Minden makroszkóposan megfigyelhető változást fel kell jegyezni. Amennyiben a vizsgálatot önálló vizsgálatként végzik el a neurotoxicitás szűrése vagy a neurotoxikus hatások jellemzése céljából, a többi állat vagy specifikus viselkedésneurológiai (10) (11), neuropathológiai (10) (11) (12) (13), neurokémiai (10) (11) (14) (15) vagy elektrofiziológiai (10) (11) (16) (17) eljárásokhoz használható fel, amelyek kiegészíthetik az itt ismertetett eljárásokat és vizsgálatokat, vagy növelhetik a kórszövettani vizsgálatok alanyainak számát. E kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha empirikus megfigyelések vagy a várható hatások specifikus típusú vagy specifikus célterületre irányuló neurotoxicitást jeleznek (2) (3). Más esetben a fennmaradó állatok az ismételt dózisú toxicitási vizsgálati módszerben leírt rutin patológiai értékelésekhez is felhasználhatók.

A paraffinba ágyazott mintákat megszokott festési eljárással, például hematoxilin-eozin festékkel (H&E) kell megfesteni, és mikroszkópos vizsgálatokat kell végezni. Perifériás neuropátiák megfigyelése vagy gyanúja esetén műanyagba ágyazott perifériás idegszövetmintákat is vizsgálni kell. Egyes klinikai tünetek további helyek vizsgálatát vagy speciális festési eljárások alkalmazását tehetik szükségessé. A további vizsgálati helyekkel kapcsolatban útmutatás a (3) és (4) hivatkozásban található. Hasznos lehet továbbá, ha speciális festéseket alkalmaznak konkrét patológiai változások kimutatásához (18).

▼B

A központi és a perifériás idegrendszerből származó reprezentatív metszeteket szövettani vizsgálatoknak kell alávetni (lásd a (3) hivatkozás 5. fejezetét és a (4) hivatkozás 50. fejezetét). A vizsgált területek általában a következők: az előagy, a nagyagy központi része, ezen belül a hippokampuszt keresztmetszet, a középagy, a kisagy, a híd, a nyúltvelő, a szem a látóideggel és a retinával együtt, a gerincvelő a nyaki és ágyéki duzzanatnál, a dorzális ideggyökér-ganglionok, a dorzális és ventrális ideggyökérrostok, a proximális ülőideg, a proximális sípcsonti ideg (a térdnél) és a sípcsonti ideg lábikraizomágai. A gerincvelőből és a perifériás idegekből készített metszeteknek mind keresztirányú vagy haránt-, mind hosszanti metszeteket tartalmazniuk kel. Figyelmet kell szentelni az idegrendszer érhálózatának is. Meg kell vizsgálni egy vázizommintát is, különösen a lábikraizomét. Különös figyelmet kell fordítani a központi és perifériás idegrendszernek azokra a sejtes és rostos struktúrájú és mintázatú területeire, amelyekre különösen hatást gyakorolnak a neurotoxikus anyagok.

A toxikus anyag által tipikusan előidézett neuropathológiai elváltozásokkal kapcsolatban a (3) és a (4) hivatkozásban található útmutatás. Ajánlatos a szövetmintákat lépcsőzetesen megvizsgálni, ami azt jelenti, hogy először a nagy dózissal kezelt csoportokból származó metszeteket hasonlítjuk össze a kontrollcsoportból származókkal. Ha az ezekből a csoportokból származó mintákban nem láthatók neuropathológiai elváltozások, nincs szükség további vizsgálatra. Ha azonban neuropathológiai elváltozásokat észlelnek a nagy dózissal kezelt csoportokban, a köztes és kis dózisú csoportokból származó, potenciálisan érintett szövetekből készített mintákat is kóddal kell ellátni, majd egymás után meg kell vizsgálni őket.

Ha a kvalitatív vizsgálatok során bizonyítékot találnak valamilyen neuropathológiai elváltozásra, akkor az ilyen elváltozást mutató idegrendszeri területeken egy második vizsgálatot is el kell végezni. Az összes dóziscsoportban minden potenciálisan érintett területről metszeteket kell készíteni, amelyeket véletlenszerűen kódokkal kell ellátni, és a kód ismeretének hiányában ugyancsak véletlenszerűen kell őket megvizsgálni. Minden lézió esetében fel kell jegyezni azok gyakoriságát és súlyosságát. Miután minden dóziscsoportban kiértékelték az összes területet, vissza lehet fejteni a kódot, és a dózis-válasz összefüggések megállapítása érdekében statisztikai elemzést lehet végezni. Ismertetni kell az egyes léziók súlyosságának fokozatait.

A neuropathológiai leleteket a viselkedési megfigyelésekkel és mérésekkel, továbbá a korábbi és párhuzamosan végzett szisztémás toxicitási vizsgálatokból származó adatokkal összefüggésben kell értékelni.

2. ADATOK

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden kezelt és kontrollcsoport esetében mutassa az állatok számát a vizsgálat kezdetén, valamint azoknak a számát, amelyek a vizsgálat során elhullottak vagy humánus módon exterminálásra kerültek, illetve az elhullások és humánus okokból végzett exterminálás időpontját, a toxicitásra utaló tüneteket mutató állatok számát, a megfigyelt toxikus hatások leírását, ezen belül megjelenésük időpontját, valamint ezek időbeli lefolyását, típusát és súlyosságát, és végül a léziókat mutató állatok számát és ezen belül a lézió(k) típusát és súlyosságát.

▼B

2.2. ÉRTÉKELÉS ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A vizsgálat eredményeit a viselkedésneurológiai és neuropathológiai hatások (ha kiegészítő vizsgálatok is történtek, akkor emellett a neurokémiai vagy elektrofiziológiás hatások) és bármely más megfigyelt káros hatás előfordulása, súlyossága és viszonylagossága alapján kell értékelni. Ahol lehet, a számszerű eredményeket megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— fizikai megjelenés (ezen belül izomerizáció, tisztaság és fizikai-kémiai tulajdonságok),

— azonosító adatok.

Vivőanyag (ha szükséges):

— a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

— az alkalmazott faj/törzs,

— az állatok száma, életkora és ivara,

— származás, tartási körülmények, akklimatizálódás, takarmány stb.,

— az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

— a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos adatok,

— a beadott dózisok, ezen belül a vivőanyagra, valamint a beadott anyag térfogatára és fizikai formájára vonatkozó adatok részletes leírása,

— a vizsgálandó anyag adagolására vonatkozó adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása,

— az expozíciós út és időtartam megválasztásának indoklása,

— adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap),

— a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos adatok.

Megfigyelések és vizsgálati eljárások:

— az egyes csoportokba tartozó állatoknak a perfúziós alcsoportokba való besorolásával kapcsolatos adatok,

— a pontozási rendszerrel kapcsolatos adatok, beleértve a részletes klinikai megfigyelések során alkalmazott kritériumokat és az egyes méréseknél használt pontozási skálát,

▼B

— a különféle (pl. hallási, látási és proprioceptív) ingerekre adott szenzoros reaktivitáshoz, a végtag-fogó erő értékeléséhez, a motoros aktivitás értékeléséhez (ezen belül az aktivitás detektálására alkalmazott automatikus berendezésekkel kapcsolatos adatok) alkalmazott funkcionális vizsgálatokkal és más alkalmazott eljárásokkal kapcsolatos adatok,

— a szemészeti vizsgálatokkal, valamint adott esetben a hematológiai vizsgálatokkal és klinikai biokémiai vizsgálatokkal kapcsolatos adatok, ideértve a vonatkozó alapértékeket is,

— a különleges viselkedésneurológiai, neuropathológiai és neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokra vonatkozó adatok.

Eredmények:

— testtömeg/testtömegváltozások, ezen belül az exterminálásкor mért testtömeg,

— adott esetben a táplálék- és vízfogyasztás,

— toxikus reakciók adatai ivaronként és dózisonként, ezen belül a toxicitás tünetei vagy az elhullás,

— a részletes klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (megjelenése és időbeli lefolyása) (valamint hogy visszafordíthatók-e),

— minden funkcionális vizsgálat eredményének részletes ismertetése,

— boncolási eredmények,

— adott esetben az összes viselkedésneurológiai, neuropathológiai és neurokémiai vagy elektrofiziológiai eredmény részletes ismertetése,

— adott esetben a felszívódással és metabolizmussal kapcsolatos adatok,

— adott esetben az eredmények statisztikai elemzése.

Az eredmények diszkussziója;

— dózis-válasz adatok,

— bármely más toxikus hatás és a vizsgálandó vegyület neurotoxicitási potenciáljával kapcsolatban levont következtetések kapcsolata,

— nem észlelt káros hatás szintje.

Következtetések:

— javasolt a vizsgálandó vegyület teljes neurotoxicitásának konkrét megállapítása.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guideline 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, Baltimore/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) 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) 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, CL. 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, CL. 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

1. táblázat

A csoportonként szükséges állatok minimális száma, ha a neurotoxicitási vizsgálatot külön, illetve más vizsgálatokkal együtt végzik

	A NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSÉNEK MÓDJA			
	Külön vizsgálat	A 28 napos vizsgálattal együtt végzett vizsgálat	A 90 napos vizsgálattal együtt végzett vizsgálat	A krónikus toxicitási vizsgálattal együtt végzett vizsgálat
Az állatok összlétszáma az egyes csoportokban	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	15 hím és 15 nőstény	25 hím és 25 nőstény
A funkcionális vizsgálatokhoz, ezen belül részletes klinikai megfigyelésekhez kiválasztott állatok száma	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény
Az *in situ* perfúzióhoz és az ideg-kórszövettani vizsgálatokhoz kiválasztott állatok száma	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény
Az ismételt dózisú/szubkrónikus/krónikus toxicitási megfigyelésekhez, hematológiai vizsgálatokhoz, klinikai biokémiai vizsgálatokhoz, kórszövettani vizsgálatokhoz stb. (ahogyan az a megfelelő útmutatókban szerepel) kiválasztott állatok száma		5 hím és 5 nőstény	10 hím † és 10 nőstény †	20 hím † és 20 nőstény †
Adott esetben kiegészítő megfigyelések	5 hím és 5 nőstény			

† Magában foglalja a neurotoxicitási vizsgálat keretében végzendő funkcionális vizsgálatokhoz és részletes klinikai megfigyelésekhez kiválasztott öt állatot is.

▼B

2. táblázat

A klinikai megfigyelések és funkcionális vizsgálatok gyakorisága

A megfigyelések típusai		A vizsgálat időtartama			
		Akut	28 napos	90 napos	Krónikus
Minden állatban	Általános egészségi állapot	naponta	naponta	naponta	naponta
	Elhullás/megbetegedés	naponta kétszer	naponta kétszer	naponta kétszer	naponta kétszer
A funkcionális megfigyelésekhez kiválasztott állatokban	Részletes klinikai megfigyelések	— az első expozíció előtt — az adagolást követően 8 órán belül a hatás csúcsának becsült időpontjában — az adagolás után 7 és 14 nappal	— az első expozíció előtt — ezt követően hetente egyszer	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első vagy második hetében — ezt követően havonta	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első hónapjának végén — ezt követően háromhavonta
	Funkcionális vizsgálatok	— az első expozíció előtt — az adagolást követően 8 órán belül a hatás csúcsának becsült időpontjában — az adagolás után 7 és 14 nappal	— az első expozíció előtt — a kezelés negyedik hetében, a lehető legközelebb az expozíció végéhez	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első vagy második hetében — ezt követően havonta	— az első expozíció előtt — egy alkalommal az expozíció első hónapjának végén — ezt követően háromhavonta

▼B

B.44. BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VIVO* MÓDSZER

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 427 (2004) vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

Számos vegyszer esetén az expozíció főként a bőrön keresztül történik, miközben a kísérleti állatokon végzett toxikológiai vizsgálatok nagy részét orális úton történő bevitellel végzik. Az ebben az útmutatóban leírt, a bőrön át történő felszívódást tanulmányozó *in vivo* vizsgálat meghatározza azt a kapcsolatot, amely lehetővé teszi, hogy az orális vizsgálatokból extrapoláljuk a bőr expozíciójához kapcsolódó biztonsági szintet.

Az anyagnak nagyszámú sejtrétegen kell áthaladnia, mielőtt eléri a vérkeringést. A legtöbb anyag esetén a felszívódás sebességét a *stratum corneum* határozza meg, amely elhalt sejtekből áll. A bőrön keresztüli áteresztőképesség függ a vegyszer lipofilicitásától és az epidermisz külső rétegének vastagságától, valamint olyan tényezőktől, mint az anyag molekulatömege és koncentrációja. Általában a patkányok és a nyulak bőre nagyobb áteresztőképességgel rendelkezik, mint az emberé, míg a tengerimalac és a majom bőrének áteresztőképessége közelebb áll az emberéhez.

A bőrön át történő felszívódás vizsgálati módszereit két csoportba lehet sorolni: az *in vivo* és az *in vitro* módszerek csoportjába. Az *in vivo* módszer különféle kísérleti fajok esetében megbízható információt nyújt a bőrön át történő felszívódásra vonatkozóan. Az utóbbi időben dolgozták ki az *in vitro* módszereket. Ezek a teljes vagy részleges vastagságú állati vagy emberi bőrön át egy folyadéktartály felé történő anyagszállítás mérésén alapulnak. Az *in vitro* módszert egy külön vizsgálati módszer (1) ismerteti. Adott feltételek esetén a legmegfelelőbb módszer kiválasztásához ajánlatos tanulmányozni az OECD által a bőrön át történő felszívódási vizsgálatok lefolytatásáról kiadott útmutató dokumentumot (2), amely az *in vivo* és az *in vitro* módszerek alkalmasságára vonatkozóan több részletettel szolgál.

Az ebben a módszerben leírt *in vivo* módszer lehetővé teszi, hogy meghatározzuk, hogyan jut be a kísérleti anyag a bőrön át a szervi rekeszbe. Az eljárást évek óta széles körben használják (3) (4) (5) (6) (7). Bár a bőrön át történő felszívódásra vonatkozó *in vitro* vizsgálatok számos esetben megfelelők lehetnek, elképzelhetők olyan helyzetek, amelyekben csak az *in vivo* vizsgálat nyújthatja a szükséges adatokat.

Az *in vivo* módszer előnye, hogy fiziológiailag és az anyagcsere szempontjából sértetlen szervezetet használ, a vizsgálatot a toxikológiai vizsgálatokban rutinszerűen használt fajon végzik, ugyanakkor más fajok esetén módosítható. Hátránya, hogy élő állatokat használ, a megbízhatóbb eredmények érdekében radioaktívan jelzett anyagokra van szükség, nehézkes a korai felszívódási fázis meghatározása, és az előnyben részesített faj (patkány) bőrének áteresztőképessége eltér az emberétől. Az állati bőrnek általában nagyobb az áteresztőképessége, ezért az emberi bőrön át történő felszívódást a vizsgálat túlbecsülheti (6) (8) (9). Égető/maró anyagokat nem szabad élő állatokon kipróbálni.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Fel nem szívott dózis: az a dózis, amelyet az expozíció után a bőr felületéről lemosnak, továbbá amely a nem záró fedőrétegen található, beleértve azt a dózist is, amelyről kimutatható, hogy az expozíció alatt a bőrről elpárolgott.

Felszívott dózis (in vivo): az a dózis, amely a vizeletben, a ketrec mosóoldatában, az ürülékben, a kilélegzett levegőben (ha mérik), a vérben, a szövetekben (ha gyűjtik) és a kísérleti preparátummal érintett bőrterület eltávolítása után fennmaradó tetemben jelen van.

Felszívható dózis: az a dózis, amely a lemosás után a bőrön vagy a bőrben található.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A lehetőleg radioaktívan jelzett kísérleti anyagot egy vagy több megfelelő dózisszinten, szokásosan használt preparátum formájában felviszik az állat lenyírt bőrére. A kísérleti preparátum egy meghatározott időtartamig marad kapcsolatban a bőrrel, megfelelő (nem záró, félig záró vagy záró) védőtakaró alatt, amely megakadályozza a kísérleti preparátum lenyelését. Az expozíció időtartamának lejártával a védőtakarót eltávolítják, a bőrt megfelelő tisztítószerrel megtisztítják, a védőtakarót és a tisztítóanyagokat elemzésre félreteszik, és új védőtakarót tesznek fel. Az állatokat az expozíciós időszak előtt, alatt és után egyedi anyagcsereketrecekben tartják, és a salakanyagokat, valamint a kilélegzett levegőt ezen időszak alatt elemzés céljából összegyűjtik. A kilélegzett levegő összegyűjtése elhagyható, ha megfelelő információ áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy nem, vagy csak kis mennyiségben keletkezik illó radioaktív metabolit. A vizsgálatok során általában több állatcsoporton alkalmazzák a kísérleti preparátumot. Az egyik csoportot az expozíciós időszak elteltével elpusztítják. Más csoportokat ezután bizonyos meghatározott időközönként pusztítanak el (2). A mintavételi időszak végén elpusztítják a megmaradó állatokat, a vért elemzés céljából összegyűjtik, az alkalmazás helyét elemzés céljából eltávolítják, és a tetemet megvizsgálják az esetleges nem kiválasztott anyagok szempontjából. A mintákat megfelelő eszközökkel elemzik, és meghatározzák a bőrön át történő felszívódás mértékét (6) (8) (9).

1.4. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Az állatfaj kiválasztása**

Leggyakrabban patkányt alkalmaznak, de az emberéhez közelebb álló bőrön át történő felszívódási sebességgel rendelkező, szőr nélküli fajták és fajok is használhatók (3) (6) (7) (8) (9). A kísérleti állatok legyenek egyneműek (alapesetben hímneműek), fiatalok, felnőttek és egészségesek. A vizsgálat elején a használt állatok súlya ± 20 %-nál nagyobb mértékben nem térhet el az átlagos súlytól. Például a hímnemű patkányoknál a 200–250 g testtömeg, de inkább ennek a tartománynak a felső része kívánatos.

▼B

1.4.2. **Az állatok száma és neme**

Minden kísérleti preparátum esetében és minden ütemezett befejezési idő tekintetében egy-egy legalább négy egynemű egyedből álló csoportot kell kialakítani. Minden egyes időintervallum elteltével, például az expozíciós időszak (jellemzően 6 vagy 24 óra) végén és az ezt követő alkalmakkor (pl. 48 és 72 óra) elpusztítanak egy-egy állatcsoportot. Ha van olyan adat, amely a hímek és a nőstények között fennálló alapvető különbségekre utal a dermális toxicitás tekintetében, akkor az érzékenyebb nemet kell kiválasztani. Ha nincs ilyen adat, akkor bármelyik nem alkalmazható.

1.4.3. **Tartási és etetési feltételek**

Az állatkísérleti teremben a hőmérséklet 22 °C (± 3 °C) legyen. Bár a relatív páratartalomnak legalább 30 %-nak kell lennie, és lehetőleg nem haladhatja meg a 70 %-ot, kivéve a terem takarításának idejét, 50–60 %-os érték beállítására kell törekedni. A világítás legyen mesterséges, váltakozva 12 óra világosság és 12 óra sötétség. Az etetésnél a szokásos laboratóriumi étrend alkalmazható; az élelem és az ivóvíz mennyisége legyen korlátlan. A vizsgálat idején, és lehetőleg az akklimatizálódás idején is, az állatokat egyedi anyagcsereketrecekben kell tartani. Mivel a táplálék és a víz kiömlése befolyásolhatja az eredményeket, ennek lehetőségét a minimumra kell szorítani.

1.4.4. **Az állatok előkészítése**

Az állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a laboratóriumi feltételekhez való akklimatizálódás érdekében öt nappal a vizsgálat megkezdését megelőzően egyedi ketrecükben tartják őket.

Az akklimatizálódás időszakát követően és körülbelül a kezelés megkezdését 24 órával megelőzően minden állatnak a váll- és hátrészén egy bőrterületet megnyírnak. A sérült bőr felszívási jellemzői eltérnek az ép bőrétől, ezért vigyázni kell, nehogy felhorzsolódjon a bőr. A nyírást követően és körülbelül 24 órával azelőtt, hogy a kísérleti anyag a bőrre kerül (lásd az 1.4.7. szakaszt), a faggyú eltávolításához a bőr felületét acetonnal le kell törölni. A szappannal és vízzel történő lemosás nem ajánlott, mivel az esetleges szappanmaradvány fokozhatja a kísérleti anyag felszívódását. A terület megfelelő nagyságú, lehetőleg legalább 10 cm^2 legyen, hogy a kísérleti vegyszer felszívódásának a bőr cm^2-ére jutó mennyiségét megbízhatóan lehessen számítani. Ez a terület a 200–250 g testtömegű patkányok esetén biztosított. Az előkészítés után az állatok visszakerülnek az anyagcsereketrecekbe.

1.4.5. **Kísérleti anyag**

A kísérleti anyag az az anyag, amelynek penetrációs jellemzőit vizsgáljuk. Ideális esetben a kísérleti anyag radioaktívan jelzett.

1.4.6. **Kísérleti preparátum**

A kísérletianyag-preparátumnak (a kísérleti anyagot tartalmazó, tiszta, hígított vagy formulázott anyag, amelyet felvisznek a bőrre) meg kell egyeznie azzal az anyaggal (vagy reális helyettesítőjének kell lennie annak az anyagnak), amelynek az ember vagy más lehetséges célfajok ki lehetnek téve. A „szokásosan használt” preparátumtól való bárminemű eltérésre csak indokolt esetben van lehetőség. Ha szükséges, akkor a vizsgált anyagot fel kell oldani vagy szuszpendálni kell valamilyen alkalmas vivőanyagban. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a felszívódási jellemzőket és a kísérleti anyaggal történő esetleges kölcsönhatást.

▼B

1.4.7. **A bőrre történő felvitel**

A bőr felszínének egy bizonyos felületén kijelölik a felvitel helyét. Ezután erre a helyre egyenletesen elosztva ismert mennyiségű kísérleti preparátumot visznek fel. Ez a mennyiség általában az emberi expozícióhoz hasonló, szokásos esetben szilárd anyag esetében 1–5 mg/cm^2, folyadék esetében pedig akár 10 μl/cm^2 lehet. Az ettől eltérő mennyiséget a várható használati feltételeknek, a vizsgálat célkitűzéseinek vagy a kísérleti preparátum fizikai jellemzőinek kell indokolnia. Az alkalmazást követően a kezelt területet védeni kell a vakarás ellen. Az eszköz jellemző kialakítására mutat példát az 1. ábra. A felvitel helyét általában nem záró védőtakaróval (pl. áteresztő nejlon géztakaróval) védeni kell. Ugyanakkor végtelen dózis esetén a felvitel helyét le kell zárni. Ha a félig illékony kísérleti anyag párolgása következtében a kísérleti anyag visszanyerési aránya elfogadhatatlan mértékig csökken (lásd az 1.4.10. szakasz első bekezdését is), akkor az elpárolgó anyagot célszerű az adagolóeszközt takaró szénszűrőben felfogni (lásd 1. ábra). Fontos, hogy semmilyen eszköz sem sértheti fel a bőrt, nem szívhatja fel a kísérleti anyagot és nem léphet azzal reakcióba. Az állatokat a salakanyagok gyűjtése érdekében vissza kell vinni az egyedi anyagcsereketrecekbe.

1.4.8. **Az expozíció időtartama és a mintavétel**

Az expozíció időtartama az az időintervallum, amely a kísérleti anyag felvitele és a bőr lemosásával történő eltávolítása között telik el. A várható emberi expozíciós időtartamnak megfelelően kellő expozíciós időtartamot (jellemzően 6 vagy 24 órát) kell alkalmazni. Az expozíciós időszak elteltével az állatokat az ütemezett elpusztításig az anyagcsereketrecekben tartják. Az állatokat a vizsgálat teljes ideje alatt, rendszeres időközönként, a toxicitás/-rendellenes reakciók jeleinek kimutatása végett meg kell figyelni. Az expozíciós időszak elteltével az irritáció látható jeleinek kimutatása végett a kezelt bőrt szemrevételezni kell.

Az anyagcsereketrecek tegyék lehetővé a vizsgálat teljes időtartama alatt a vizelet és az ürülék külön gyűjtését. Tegyék lehetővé továbbá a ^{14}C-szén-dioxid és az illó ^{14}C-szénvegyületek gyűjtését, amelyeket elemezni kell, ha nagyobb mennyiségben (> 5 %) termelődnek. A vizeletet, az ürüléket és a csapdafolyadékokat (pl. a ^{14}C-szén-dioxidot és az illó ^{14}C-szénvegyületeket) csoportonként és mintavételi időpontonként egyedileg kell gyűjteni. Ha kellő információ áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy nem képződik vagy csak kis mennyiségben képződik illó radioaktív metabolikum, akkor nyitott ketrecek is használhatók.

A salakanyagok gyűjtésére az expozíciós időszakban, a bőrrel történő első érintkezést követően 24 óráig, majd a kísérlet végéig naponta kerül sor. Bár általában három ürülékgyűjtési időszak elegendő, a kísérleti preparátum előirányzott célja vagy a rendelkezésre álló kinetikai adatok függvényében alkalmasabb, vagy további vizsgálati időpontok kijelölésére is szükség lehet.

Az expozíciós időszak végén a védőeszközt minden állatról leveszik, és elemzésre külön félreteszik. Az állatok kezelt bőrét megfelelő törlőkendő használatával legalább háromszor tisztítószerrel le kell mosni. Vigyázni kell, hogy a test más része ne szennyeződjön be. A tisztítószer feleljen meg a szokásos higiéniai gyakorlatnak, például lehet vizes szappanoldat. Végül a bőrt meg kell szárítani. A törlőkendőket és a lemosott oldatot elemzésre félre kell tenni. A későbbre ütemezett csoportba tartozó állatokon, mielőtt egyedi ketreceikbe visszatérnek, a kezelt terület védelmére friss védőtakarót kell alkalmazni.

▼B

1.4.9. **Befejező eljárások**

Minden csoport esetében az egyes állatokat az ütemezés szerint kell elpusztítani, és a vért elemzés céljából össze kell gyűjteni. A védőeszközt vagy a védőtakarót az elemzés céljából el kell távolítani. A kezelt bőrfelületet és egy ahhoz hasonló, nem kezelt lenyírt bőrfelületet minden állatról külön elemzés céljából el kell távolítani. Az alkalmazás területe a *stratum corneumnak* az alatta lévő epidermisztől történő leválasztásával feloszthető annak érdekében, hogy a kísérleti vegyszer eloszlására vonatkozóan több információt lehessen összegyűjteni. Ennek az eloszlásnak az expozíciós időszak után egy bizonyos idő elteltével történő meghatározása utalhat arra, hogy milyen sorsra jutott a *stratum corneumban* maradó esetleges kísérleti vegyszer. A bőr felosztásának megkönnyítése érdekében (a végső bőrlemosást és az állat elpusztítását követően) el kell távolítani a védőtakarót. A kezelt bőrfelületet a körülötte lévő bőrgyűrűvel együtt lenyúzzák a patkányról és egy táblára szegezik. Egy ragasztószalagcsíkot gyengéden a bőrfelületetre nyomnak, majd a *stratum corneum* egy részével együtt eltávolítják. További ragasztószalagcsíkokat alkalmaznak mindaddig, amíg a szalag már nem ragad a bőrfelülethez, azaz már a teljes *stratum corneumot* eltávolították. Minden egyes állat valamennyi ragasztószalagcsíkja egyetlen konténerbe gyűjthető össze, amelybe szövetoldószert adagolnak a *stratum corneum* feloldására. Mielőtt a tetemet a felszívott dózis szempontjából elemzésnek vetnék alá, az esetleges külön vizsgálat céljára szolgáló célszövetek eltávolíthatók. Az egyes állatok tetemét elemzésre félre kell tenni. Rendszerint elegendő elemezni a teljes tartalmat. Külön vizsgálat céljából a megfelelő célszervek eltávolíthatók (ha ezt más vizsgálatok igénylik). Az ütemezett elpusztításkor a húgyhólyagban lévő vizeletet hozzá kell adni a korábban összegyűjtött vizelethez. Az ütemezett elpusztításkor az ürülék kigyűjtése után az anyagcsereketreceket és a csapdáikat megfelelő oldószerrel el kell mosni. Az egyéb, esetleg szennyezett eszközöket ugyancsak meg kell vizsgálni.

1.4.10. **Elemzés**

Valamennyi vizsgálat során megfelelő visszanyerést kell elérni (azaz a radioaktivitás átlagosan 100 ± 10 %-át). Az ezen a tartományon kívüli visszanyerést indokolni kell. Az alkalmazott dózis mennyiségét minden mintában megfelelően hitelesített eljárással kell megvizsgálni.

Statisztikai szempontból célszerű lehet megállapítani az egyes dózisokhoz tartozó eredmények szórását.

2. **ADATOK**

A kísérleti vegyszer és a metabolikum tekintetében egyedenként és mintavételi időpontonként a következő méréseket kell elvégezni. Az egyedi adatokon kívül a mintavételi időpontokhoz tartozó adatok átlagát is meg kell adni.

— A védőeszközökhöz rendelt mennyiség,

— a bőrről eltávolítható mennyiség,

— a bőrben/bőrön található le nem mosható mennyiség,

▼B

— a vizsgált vérben lévő mennyiség,

— az ürülékben és (ha szükséges) a kilélegzett levegőben lévő mennyiség,

— a tetemben és a külön vizsgálatok céljából kiemelt szervekben maradó mennyiség.

Az ürülékben, a kilélegzett levegőben, a vérben és a tetemben lévő kísérleti anyag és/vagy metabolikum mennyisége lehetővé teszi a teljes felszívott mennyiség minden egyes időpontban történő meghatározását. Ugyancsak meghatározható az expozíciós időszakban a kísérleti anyagnak a bőr cm^2-ére jutó felszívott mennyisége.

3. **JEGYZŐKÖNYV**

3.1. A KÍSÉRLETI JEGYZŐKÖNYV

A kísérleti jegyzőkönyv tartalmazza a kísérlet leírásában meghatározott követelményeket, beleértve a használt vizsgálati rendszer indoklását, valamint a következőket:

Kísérleti anyag:

— azonosítási adatok (pl. CAS-szám, ha rendelkezésre áll; származás; tisztaság [radiokémiai tisztaság]; ismert szennyeződések; tételszám),

— fizikai természet, fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. pH, illékonyság, oldhatóság, stabilitás, molekulatömeg és log P_{ow}).

Kísérleti preparátum:

— formuláció és megválasztásának indoklása,

— a preparátum részletes adatai, a felvitt mennyiség, az elért koncentráció, vivőanyag, stabilitás és homogenitás.

Kísérleti állatok:

— használt faj/fajta,

— az egyedek száma, kora és neme,

— az egyedek származása, tartási körülményei, étrendje stb.,

— az egyedek súlya a kísérlet megkezdésekor.

Kísérleti körülmények:

— a kísérleti preparátum adagolásának részletei (a felvitel helye, a mennyiségi elemzés módszerei, elzárás/nem elzárás, térfogat, kinyerés, kimutathatóság),

— a táplálék és az itatóvíz minőségére vonatkozó adatok.

Eredmények:

— a toxicitás bármilyen jele,

— táblázatba foglalt felszívódási adatok (arányszámban, abszolút mennyiségben vagy százalékban kifejezve),

▼B

— a teljes visszanyerés a kísérlet során,

— az eredmények értelmezése, hasonló, a kísérleti vegyület bőrön át történő felszívódására vonatkozó korábbi kísérletek hozzáférhető adataival való összehasonlítás.

Az eredmények szöveges értékelése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(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.

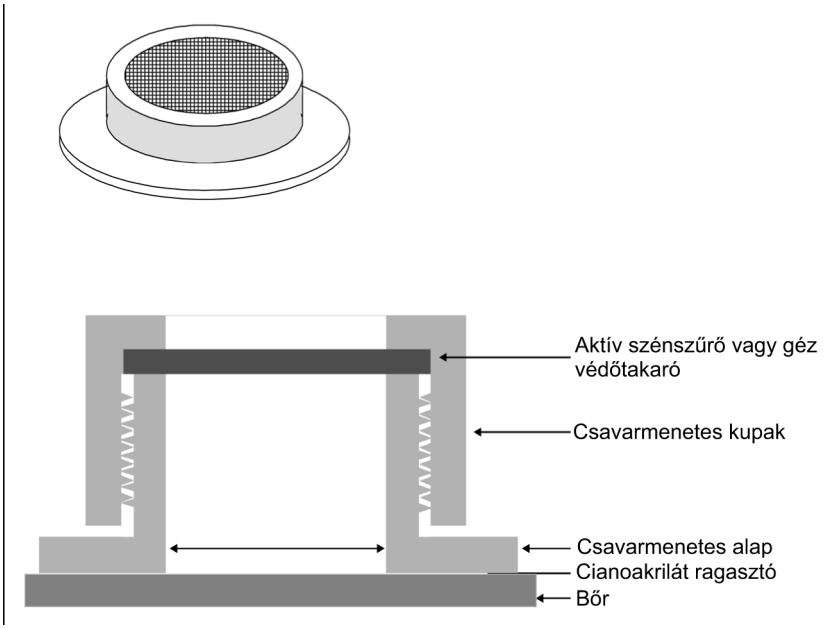
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990). *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970). Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

1. ábra

Példa a bőrön át történő felszívódásra vonatkozó *in vivo* kísérletek során a bőrre történő felvitel helyének meghatározására és védelmére szolgáló jellemző eszközre



▼B

B.45. BŐRÖN ÁT TÖRTÉNŐ FELSZÍVÓDÁS: *IN VITRO* MÓDSZER

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 428 (2004) vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

A módszer célja, hogy adatokat szolgáltasson a kísérleti anyag bőrből kimetszett mintán keresztül történő felszívódására vonatkozóan. A módszer összekapcsolható a bőrön át történő felszívódás *in vivo* módszerével (1), de különállóan is lefolytatható. A módszeren alapuló vizsgálatok tervezéséhez ajánlatos az OECD által a bőrön át történő felszívódási vizsgálatok lefolytatásáról kiadott útmutató dokumentum (2) tanulmányozása. Az útmutató dokumentum azért készült, hogy konkrét körülmények között történő használat esetén megkönnyítse a megfelelő *in vitro* eljárások kiválasztását annak érdekében, hogy az ezen módszerrel nyert eredmények kellő megbízhatóságúak legyenek.

A bőrön át történő felszívódásra és a bőr szállítóképességére vonatkozó mérési módszereket két csoportba lehet sorolni: az *in vivo* és az *in vitro* módszerek csoportjába. A bőrön át történő felszívódás *in vivo* módszere gyakran alkalmazott eljárás, és számos állatfajra vonatkozóan nyújt farmakokinetikai információkat. Egy *in vivo* módszert ismertet egy másik vizsgálati módszer (1). Az *in vitro* módszereket is évek óta használják a bőrön át történő felszívódás mérésére. Bár az itt leírt *in vitro* módszer formális validálását még nem végezték el, az OECD szakértői 1999-ben megállapították, hogy elegendő kiértékelt adat áll rendelkezésre az *in vitro* módszer alátámasztására (3). Az útmutató dokumentum (2) további, e döntést igazoló részleteket tartalmaz, többek között nagyszámú példát az *in vitro* és az *in vivo* módszerek közvetlen összehasonlítására. A témát számos monográfia tekinti át, amelyek részletes háttéranyagot nyújtanak az *in vitro* módszerek használatára vonatkozóan (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Az *in vitro* módszerek a vegyszereknek a bőrbe és a bőrön át, egy folyadéktartály felé történő diffúzióját vizsgálják, és használhatnak élettelen bőrt is kizárólag a diffúzió vizsgálatához, vagy friss, az anyagcsere szempontjából aktív bőrt annak érdekében, hogy egyszerre vizsgálják a diffúziót és a bőr anyagcseréjét. Az ilyen módszereket különösen annak összehasonlítására használják, hogy hogyan zajlik le a különféle vegyszerkészítményeknek a bőrbe és a bőrön át történő bejutása, valamint hasznos modellként szolgálhatnak az emberi bőrön át történő felszívódás értékelésére is.

Az *in vitro* módszer nem minden helyzetben és nem minden vegyszerfajtával alkalmazható. Egyes esetekben az *in vitro* módszerek kiindulásképpen, a bőrbe való behatolás kvalitatív értékelésére használhatók. Bizonyos esetekben szükség lehet arra, hogy az így nyert eredményeket *in vivo* adatokkal egészítsük ki. Az útmutató dokumentum (2) részletesebben is ismerteti azokat a körülményeket, amikor érdemes az *in vitro* módszerekhez folyamodni. A döntés alátámasztására szolgáló további részletes információk a (3) hivatkozásban találhatók.

Ez a módszer egy kísérleti anyagnak a bőrön át történő felszívódására és továbbítására vonatkozó vizsgálatának általános elveit mutatja be bőrből kimetszett minta esetében. Számos emlősfaj bőre használható, beleértve az emberét is. A bőr áteresztőképességi jellemzői a testből való kimetszés után is változatlanok maradnak, mivel a diffúzió fő gátja az élettelen *stratum corneum;* vegyszereknek bőrön át történő aktív továbbítását nem állapították meg. Kimutatták, hogy a bőrön át történő felszívódás során a bőr képes metabolizálni bizonyos vegyszereket (6), de ez a folyamat nem korlátozza az adott dózis felszívódási sebességét, bár hatással lehet a véráramba bekerülő anyag természetére.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Fel nem szívott dózis: az a dózis, amelyet az expozíció után a bőr felületéről lemosnak, továbbá amely a nem záró fedőrétegen található, beleértve azt a dózist is, amelyről kimutatható, hogy az expozíció alatt a bőrről elpárolgott.

Felszívott dózis *(in vitro):* a kísérleti anyagnak az a tömege, amely egy meghatározott időtartam alatt elérte a receptorfolyadékot vagy a szisztémás keringést.

Felszívható dózis *(in vitro):* *az a* dózis, amely a lemosás után a bőrön vagy a bőrben található.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A kísérleti anyagot, amely radioaktívan jelzett is lehet, felviszik egy, a diffúziós cella két kamráját elválasztó bőrminta felületére. A vegyszer meghatározott ideig, meghatározott feltételek között a bőrön marad, majd megfelelő tisztító eljárással eltávolítják. A receptorfolyadékból a kísérlet során bizonyos időközönként mintát vesznek, és elemzik a kísérleti vegyszer és/vagy a metabolikum tekintetében.

Anyagcsere szempontjából aktív szervezet használata esetén megfelelő módszerrel elemezni lehet a kísérleti vegyszer metabolikáját. A kísérlet végén, ha szükséges, megmérik a kísérleti vegyszer eloszlását és metabolikumát.

Az ebben a módszerben és az útmutató dokumentumban (2) leírt megfelelő feltételek megléte esetén az egy bizonyos időtartam alatt felszívódott kísérleti anyag mennyiségét a receptorfolyadék és a kezelt bőr elemzésével vizsgálják. A bőrben maradó kísérleti anyagot felszívottnak kell tekinteni, kivéve akkor, ha kimutatható, hogy a felszívódás kizárólag a receptorfolyadék alapján is meghatározható. A többi összetevő elemzése (a bőrről lemosott és a bőr rétegeiben megmaradt anyagok) lehetővé teszi a további adatértékelést, beleértve a kísérleti anyag teljes eloszlása és a visszanyerési arány elemzését is.

A kísérletet végző laboratórium vizsgálati rendszere alkalmasságának és megbízhatóságának kimutatása érdekében rendelkezésre kell állniuk a vonatkozó referencia-vegyszerekre vonatkozó eredményeknek, amelyeknek összhangban kell lenniük a használt módszerre vonatkozó publikált szakirodalommal. Ez a követelmény egy alkalmas (lehetőleg a kísérleti anyaghoz közeli lipofilicitású) referencia-vegyszerrel és párhuzamosan a kísérleti anyaggal végzett kísérlettel, vagy pedig megfelelő korábbi, több, különféle lipofilicitású referenciaanyagra (pl. koffein, benzoesav és tesztoszteron) vonatkozó adattal teljesíthető.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.4.1. **Diffúziós cella**

A diffúziós cella donorkamrából és receptorkamrából áll, amelyek közé elhelyezik a bőrt (egy tipikus elrendezés található az 1. ábrán). A cellának jól kell záródnia a bőr körül, biztosítania kell a bőr alsó felületével érintkező receptorfolyadék jó keveredését és a receptorfolyadékból való könnyű mintavételt, és alkalmasnak kell lennie a cella és tartalma hőmérsékletének szabályozására. A statikus és az átfolyásos diffúziós cellák egyaránt elfogadhatók. A kísérleti preparátum véges dózisú expozíciója esetén a donorkamrákat általában nem zárják le. Ugyanakkor végtelen dózis és bizonyos véges dózisok használata esetén a donorkamrák lezárhatók.

▼B

1.4.2. **Receptorfolyadék**

Előnyben kell részesíteni a fiziológiailag vezető receptorfolyadékokat, bár indokolt esetben más folyadék is használható. Meg kell határozni a receptorfolyadék pontos összetételét. Ki kell mutatni, hogy a kísérleti anyag a receptorfolyadékban megfelelő mértékben oldható, ami ahhoz szükséges, hogy ne gátolja a felszívódást. Továbbá, a receptorfolyadék nem károsíthatja a bőrpreparátum épségét. Az átfolyásos rendszerben az átfolyás sebessége nem gátolhatja a kísérleti anyagnak a receptorfolyadékban történő diffúzióját. Statikus cellarendszer esetén a folyadékot folyamatosan keverni kell, és rendszeresen mintát kell belőle venni. Ha az anyagcserét is vizsgáljuk, akkor a receptorfolyadéknak a kísérlet folyamán támogatnia kell a bőr életképességét.

1.4.3. **Bőrpreparátumok**

Emberi és állati eredetű bőr egyaránt felhasználható. Tudatában kell lenni annak, hogy az emberi bőr felhasználását nemzeti és nemzetközi etikai szempontok és feltételek szabályozzák. Bár előnyben részesítendő az élő bőr, élettelen bőrt is szabad használni, feltéve hogy kimutatható a bőr épsége. Epidermiszmembrán (enzimmel, hővel vagy kémiailag leválasztva), illetőleg dermatomával készített, hasított vastagságú bőr (jellemzően 200–400 μm vastagsággal) egyaránt felhasználható. Teljes vastagságú bőr is használható, de kerülni kell a túl vastag bőr (kb. > 1 mm) használatát, kivéve akkor, ha a kísérleti vegyszernek a bőr rétegeiben történő kimutatásához erre kifejezetten szükség van. A faj, az anatómiai helyzet és a preparátumkészítési eljárás megválasztásának indokoltnak kell lennie. Kísérleti preparátumonként minimum négy, elfogadható adatokat szolgáltató vizsgálatot kell elvégezni.

1.4.4. **A bőrpreparátum épsége**

Alapvető fontosságú, hogy a bőrt gondosan előkészítsük. A nem megfelelő kezelés következtében sérülhet a *stratum corneum*, ezért ellenőrizni kell az előkészített bőr épségét. Ha a bőr anyagcseréjét vizsgáljuk, a frissen kimetszett bőrt a lehető leggyorsabban kell felhasználni olyan feltételek között, amelyekről ismert, hogy támogatják az anyagcsere-aktivitást. Általános útmutatásként azt mondhatjuk, hogy a frissen kimetszett bőrt 24 órán belül fel kell használni, de az elfogadható tárolási időszak a metabolizációban használt enzimrendszertől és a tárolási hőmérséklettől függően változhat (13). Ha a bőrpreparátumot a használat előtt tárolták, bizonyítani kell, hogy a gátfunkció fennmaradt.

1.4.5. **Kísérleti anyag**

A kísérleti anyag az az anyag, amelynek penetrációs jellemzőit vizsgáljuk. Ideális esetben a kísérleti anyag radioaktívan jelzett.

1.4.6. **Kísérleti preparátum**

A kísérletianyag-preparátumnak (a kísérleti anyagot tartalmazó, tiszta, hígított vagy formulázott anyag, amelyet felvisznek a bőrre) meg kell egyeznie azzal az anyaggal (vagy reális helyettesítőjének kell lennie annak az anyagnak), amelynek az ember vagy más lehetséges célfajok ki lehetnek téve. A „szokásosan használt” preparátumtól való bárminemű eltérésre csak indokolt esetben van lehetőség.

▼B

1.4.7. **A kísérleti anyagok koncentrációja és összetétele**

A vizsgálatot általában a kísérleti anyag több koncentrációjával is elvégzik oly módon, hogy az egyes koncentrációk átfogják a lehetséges emberi expozíció felső határát. Ugyanígy meg kell fontolni a jellemzően előforduló formulációk mindegyikének vizsgálatát.

1.4.8. **A bőrre történő felvitel**

A szokásos feltételek között az ember vegyszereknek való expozíciója során véges dózisokkal találkozunk. Ezért az emberi expozíciót modellező alkalmazás során szokásos esetben szilárd anyag esetében a bőrön 1–5 mg/cm^2 mennyiséget, folyadék esetében pedig 10 µl/cm^2-ig terjedő mennyiséget kell használni. A mennyiséget a várható használati feltételek, a vizsgálat célkitűzései vagy a kísérleti preparátum fizikai jellemzői függvényében kell meghatározni. Például az egységnyi felületre működő nagy mennyiség modellezhető azáltal, ha a bőr felületén végtelen dózist alkalmazunk.

1.4.9. **Hőmérséklet**

A vegyszerek passzív diffúzióját (és ezért a bőrön át történő felszívódást is) befolyásolja a hőmérséklet. A diffúziós kamrát és a bőrt állandó, a normál bőr hőmérsékletéhez közeli, 32 ± 1 °C-os hőmérsékleten kell tartani. Különféle cellafelépítések különféle vízfürdőt vagy fűtöttblokk-hőmérsékletet kívánnak annak érdekében, hogy biztosítva legyen, hogy a receptor/bőr fiziológiai normaértékén legyen. A páratartalom lehetőleg 30 és 70 % között legyen.

1.4.10. **Az expozíció időtartama és a mintavétel**

A bőr kísérleti preparátumnak való expozíciója történhet a kísérlet teljes időtartama alatt vagy rövidebb időtartamok során (az emberi expozíció valamely sajátos típusának modellezéseként). A bőrről megfelelő tisztítószerrel le kell mosni a felesleges kísérleti preparátumot, és a lemosott folyadékot elemzés céljából össze kell gyűjteni. A kísérleti preparátum eltávolítására vonatkozó eljárás a várható használati feltételektől függ, és indokoltnak kell lennie. A felszívódási jellemzők megfelelő megállapításához általában 24 órás mintavételi időszak szükséges. Mivel a bőr épsége 24 óra elteltével romlásnak indulhat, a mintavételi idő rendszerint nem haladhatja meg a 24 órát. Azoknak a kísérleti anyagoknak az esetében, amelyek gyorsan behatolnak a bőrbe, ez nem feltétlenül szükséges, de a lassan behatoló kísérleti anyagok esetében hosszabb időre lehet szükség. A receptorfolyadékból történő mintavétel gyakoriságának olyannak kell lennie, amely lehetővé teszi a kísérleti anyag felszívódási folyamatának grafikus megjelenítését.

1.4.11. **Befejező eljárások**

A kísérleti rendszer minden összetevőjét elemezni kell, és meg kell határozni a visszanyerést. Ez magában foglalja a donorkamrát, a bőr felületéről lemosott folyadékot, a bőrpreparátumot és a receptorfolyadékot/kamrát. Bizonyos esetekben, külön elemzések céljából a bőrt részekre oszthatjuk: a bőr expozíciónak kitett részeire és a cella pereme alatti bőrterületre, illetőleg a *stratum corneum*ra, az epidermiszre és a dermiszre.

1.4.12. **Elemzés**

Valamennyi vizsgálat során megfelelő visszanyerést kell elérni (a radioaktivitás átlagosan 100 ± 10 %-ára kell törekedni, az esetleges eltérést indokolni kell). A receptorfolyadékban, a bőrpreparátumban, valamint a bőrfelületről és a műszerekről lemosott öblítőfolyadékban lévő kísérleti anyag mennyiségét megfelelő módszer alkalmazásával elemezni kell.

▼B

2. **ADATOK**

Be kell mutatni a receptorfolyadék elemzését, a vizsgálati rendszerben a kísérleti vegyszer eloszlását és a felszívódás jellemzőinek időbeli alakulását. Ha az expozíció során véges dózist alkalmazunk, akkor meg kell határozni a bőrről lemosott mennyiséget, a bőrrel (és ha vizsgáljuk, a különböző bőrrétegekkel) összefüggésbe hozható mennyiséget és a receptorfolyadékban jelen levő mennyiséget (sebességben, abszolút mennyiségben vagy százalékban kifejezve). A bőrön át történő felszívódás néha kizárólag a receptorfolyadékra vonatkozó adatok alapján is kifejezhető. Ugyanakkor ha a kísérleti anyag a vizsgálat végén a bőrben marad, szükség lehet a teljes felszívódott mennyiségbe való beszámítására (lásd a (3) hivatkozás 66. bekezdését). Ha az expozíció során végtelen dózist alkalmazunk, akkor az adatok lehetővé tehetik az áteresztőképességi állandó (Kp) kiszámítását. Ez utóbbi esetben a felszívódott anyag aránya nem lényeges.

3. **JEGYZŐKÖNYV**

3.1. A KÍSÉRLETI JEGYZŐKÖNYV

A kísérleti jegyzőkönyv tartalmazza a kísérlet leírásában meghatározott követelményeket, beleértve a használt vizsgálati rendszer indoklását, valamint a következőket:

Kísérleti anyag:

— fizikai természete, fizikai-kémiai tulajdonságai (legalább a molekulatömeg és a log P_{ow}), tisztasága (radiokémiai tisztaság),

— azonosítási adatok (pl. tételszám),

— oldhatóság a receptorfolyadékban.

Kísérleti preparátum:

— formuláció és megválasztásának indoklása,

— homogenitás.

Kísérleti körülmények:

— a bőr eredete és helyzete, az előkészítés módszere, a felhasználást megelőző tárolás körülményei, az esetleges előkezelés (tisztítás, antibiotikumos kezelés stb.), a bőr épségére vonatkozó vizsgálatok, anyagcsere-állapot, a megválasztás indoklása,

— a cella felépítése, a receptorfolyadék összetétele, a receptorfolyadék áramlási sebessége vagy a mintavételi időpontok és eljárások,

— a kísérleti preparátum adagolása és az alkalmazott dózis mennyiségi meghatározása,

— az expozíció időtartama,

— a kísérleti preparátum bőrről történő eltávolításának részletei, pl. a bőr öblítése,

— a bőr elemzésére vonatkozó adatok és a bőrön belüli eloszlás leírása céljából végzett részekre osztás részletei,

▼B

— cella- és műszermosási eljárások,

— a mennyiségi elemzés módszerei, kinyerési eljárások, kimutathatósági határok és az értékelési módszer hitelesítése.

Eredmények:

— a teljes visszanyerés a kísérlet során (alkalmazott dózis ≡ bőrmosás + bőr + receptorfolyadék + cellamosás),

— minden egyes rekeszben az egyes cellavisszanyerések táblázatos összefoglalása,

— felszívódási profil,

— táblázatba foglalt felszívódási adatok (sebességben, abszolút mennyiségben vagy százalékban kifejezve).

Az eredmények szöveges értékelése.

Következtetések.

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

(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 BW and Reifenrath WG. (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 Application*s, 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 Application*s. 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 Chem Tox, 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 a*l. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

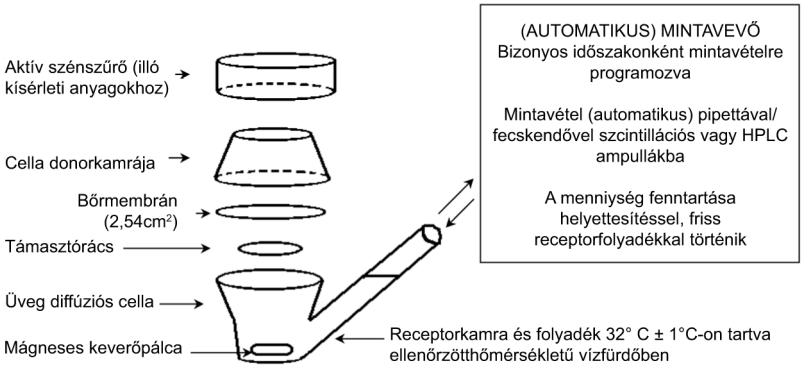
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene *in vitro*. Arch Toxicol 74: 356–365.

1. ábra

Példa a statikus diffúziós cella felépítésére a bőrön át történő felszívódás *in vitro* vizsgálatához



▼M3

B.46. *IN VITRO* BŐRIRRITÁCIÓ: REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMON VÉGZETT VIZSGÁLATI MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. A bőrirritáció a vizsgált vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás (az Egyesült Nemzetek Szervezete [ENSZ] által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerében [GHS], valamint az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról szóló, 2008. december 16-i 1272/2008/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletében [EU CLP] meghatározottak szerint (1)(3)). Ez a vizsgálati módszer olyan *in vitro* eljárást biztosít, amely lehetővé teszi az ENSZ által kidolgozott GHS és az EU CLP szerinti 2-es kategóriának megfelelő, irritációt okozó anyagok (anyagok és keverékek) jelentette veszély meghatározását (1) (2) (3). Az EU-ban, valamint azokban a régiókban, ahol nem vették át az ENSZ GHS opcionális 3. kategóriáját (enyhén irritáló hatású anyagok), ez a vizsgálati módszer a besorolással nem rendelkező vegyi anyagok, vagyis az ENSZ GHS és az EU CLP szerinti „kategória nélküli" anyagok meghatározására is alkalmazható (1)(3). Ez a vizsgálati módszer a vegyi anyagok bőrirritációt okozó hatásának lépcsőzetes vizsgálati stratégiáján belül az *in vivo* vizsgálatot önállóan helyettesítő vizsgálatként (e melléklet 4. és B.4. fejezete) alkalmazható.

2. A bőrirritáció vizsgálata jellemzően állatkísérletek végzésével jár (az OECD 404. vizsgálati iránymutatása; e melléklet B.4. fejezete) (4). 2004-ben a B.4. fejezet állatjólléti szempontokat figyelembe véve átdolgozásra került, lehetővé téve a bőrkorrózió/bőrirritáció lépcsőzetes vizsgálati stratégia részét képező hitelesített *in vitro* és *ex vivo* vizsgálati módszerek alkalmazásával történő meghatározását, megkímélve ezzel az állatokat a fájdalomtól és szenvedéstől. Három hitelesített *in vitro* vizsgálati módszert fogadtak el és foglaltak bele az OECD 430., 431. és 435. vizsgálati iránymutatásaiba (5) (6) (7), ezek közül két vizsgálati módszert – amelyek e melléklet B.40. és B.40 A. fejezetében szerepelnek – a B.4. fejezet, illetve az OECD 404. vizsgálati iránymutatása lépcsőzetes vizsgálati stratégiájának korrozív hatást vizsgáló részében kell alkalmazni (4).

3. Ez a vizsgálati módszer a bőrirritációval mint az emberi egészség károsodásának egyik végpontjával foglalkozik. Rekonstruált emberi felhám-(epidermisz)modellen alapul, amely általános felépítését tekintve (sejtforrásként humán eredetű, nem transzformált epidermális keratinsejtek alkalmazása, valamint reprezentatív szövet- és citoarchitektúra) élethűen utánozza az emberi bőr felső rétegének, vagyis a felhámnak (epidermisznek) a biokémiai és fiziológiai tulajdonságait. Ez a vizsgálati módszer több teljesítményszabványt (2. függelék) is magában foglal az EC-ECVAM (8) által kidolgozott hasonló és módosított rekonstruált emberi epidermiszalapú vizsgálati módszereknek az OECD 34. iránymutatásában szereplő elveknek megfelelő értékeléséhez (9).

4. Három olyan módszer van, amelyet e vizsgálati módszer alapján hitelesítettek. Előhitelesítési, optimalizálási és hitelesítési vizsgálatokat végeztek egy emberi felhámmodellt alkalmazó *in vitro* módszerhez (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), amely kereskedelmi forgalomban EpiSkin™ (hitelesített referencia-módszer – VRM) néven kapható. A teljesítményszabvány szerinti hitelesítés alapján két másik, szintén kereskedelmi forgalomban kapható, *in vitro* rekonstruált emberi felhámmodellen végzett bőrirritáció-vizsgálati módszer adott a referencia-módszerhez hasonló eredményeket (21): az EpiDerm™ SIT (EPI-200) és a SkinEthic™ RHE módszerek (22).

▼M3

5. Ahhoz, hogy az *in vitro* rekonstruált emberi felhámmodellen végzett módszerhez hasonló vagy annak egyik változatát képező, de a hitelesített referencia-módszertől, az EpiDerm™ SIT (EPI-200) vagy a SkinEthic™ RHE módszertől eltérő javasolt vizsgálatot szabályozási célokra lehessen alkalmazni, a javasolt alkalmazás tekintetében meg kell határozni annak megbízhatóságát, relevanciáját (pontosságát) és korlátait, hogy a vizsgálatot az e vizsgálati módszerben előírt teljesítményszabványban foglalt követelményeknek megfelelően (2. függelék) az 1. referencia-módszerhez hasonlónak lehessen minősíteni. Továbbá az *in vitro* rekonstruált emberi felhámmodellen alapuló hasonló vagy módosított módszer hatósági engedélyezés céljából történő kidolgozása és hitelesítése előtt javasolt tanulmányozni az OECD által a bőrirritáció *in vitro* vizsgálatára vonatkozóan kiadott magyarázó háttérdokumentumot (23).

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

7. Amint azt a hitelesítési vizsgálat kimutatta (16), a vizsgálati módszer egyik korlátja az, hogy nem teszi lehetővé a vegyi anyagok ENSZ GHS szerinti 3. kategóriába történő besorolását (enyhe bőrirritáló hatású anyag) (1). Részleges helyettesítő vizsgálatként alkalmazva *in vivo* kontrollteszt válhat szükségessé a bőrirritáló hatás teljes jellemzéséhez (e melléklet 4. és B.4. fejezete). Elfogadott tény, hogy az emberi bőr használatára nemzeti és nemzetközi etikai megfontolások és feltételek vonatkoznak.

8. Ez a vizsgálati módszer a B.4. fejezetben szereplő (az OECD 404. vizsgálati iránymutatása), bőrkorrózióra/bőrirritációra irányuló lépcsőzetes vizsgálati stratégia *in vitro* bőrirritációs részével foglalkozik (4). Bár ez a vizsgálati módszer nem nyújt megfelelő információt a bőrkorrózióról, megjegyzendő, hogy a bőrkorrózió vizsgálatára irányuló B.40 A. módszer (az OECD 431. vizsgálati iránymutatása) ugyanezen a rekonstruált emberi felhámmodelles vizsgálati rendszeren alapul, noha más protokollt alkalmaz (B.40 A. fejezet). Ez a módszer az emberi keratinsejteket tartalmazó rekonstruált emberi felhámmodelleken alapul, tehát a vizsgált faj célszervének *in vitro* vizsgálatáról van szó. Továbbá közvetlenül lefedi az irritáció során *in vivo* zajló gyulladásos kaszkád/hatásmechanizmus kezdeti lépését (körülírt sérülést eredményező sejt- és szövetkárosodás). E vizsgálati módszer hitelesítési eljárása során a vegyi anyagok széles körét vizsgálták, és a hitelesítési vizsgálat empirikus adatbázisa összesen 58 vegyi anyagra terjedt ki (16)(18)(23). Ezek között szilárd, folyékony és félszilárd anyagok, valamint viaszok is előfordulhatnak. A folyadékok lehetnek vizes vagy nem vizes alapúak, a szilárd anyagok pedig vízben oldódóak vagy vízben nem oldhatóak. Amennyiben lehetséges, a szilárd anyagokat alkalmazásuk előtt finom porrá kell törni, a minta egyéb előkezelése nem szükséges. Gázokat és aeroszolokat hitelesítési vizsgálat keretében még nem vizsgáltak (24). Bár elképzelhető, hogy ezek is vizsgálhatók a rekonstruált emberi felhámmodelles technikával, a jelenlegi vizsgálatimódszer-leírás nem engedi meg gázok és aeroszolok vizsgálatát. Szintén megjegyzendő, hogy az erős színű vegyi anyagok befolyásolhatják a sejt életképességének méréseit, és a korrekció érdekében adaptált kontrollok alkalmazását teszik szükségessé (lásd a 24–26. bekezdéseket).

9. Ha a besorolás egyértelmű, akkor három szövetpéldány vizsgálatából álló egyszeri vizsgálatmenetnek elegendőnek kell lennie az adott vizsgált vegyi anyag esetében. Határértéken lévő eredmények esetében azonban, ha például az egyes szövetpéldányok eredményei nem egyeznek és/vagy az átlagos százalékos életképesség 50 ± 5 %, megfontolandó egy második vizsgálatmenet lefolytatása, és ha az első és a második vizsgálatmenet eredményei különbözőek, akkor egy harmadiké is.

▼M3

A VIZSGÁLAT ELVE

10. A vizsgált vegyi anyagot egy olyan nem transzformált emberi epidermális keratinsejteket tartalmazó, háromdimenziós emberi felhámmodellre viszik fel helyileg, amelyeket úgy tenyésztettek ki, hogy többrétegű, erősen differenciált emberi felhámot (*epidermist*) alkossanak. Ez szervezett bazális, spinózus és granuláris sejtrétegekből, valamint intercelluláris lamelláris lipidrétegeket tartalmazó többrétegű szarurétegből (*stratum corneum*) áll, amely az *in vivo* megtalálható lipidcsoportokhoz hasonló fő lipidcsoportokat tartalmazza.

11. Az irritatív hatású anyagok okozta, bőrpír és ödéma formájában megnyilvánuló bőrirritáció olyan eseménysorozat eredménye, amely az irritatív hatású anyagok *stratum corneum* történő penetrációjával és az alatta fekvő keratinsejtrétegek roncsolódásával kezdődik. A pusztuló keratinsejtek mediátoranyagokat bocsátanak ki, amelyek a *dermisz* sejtjeire – főként a strómális és endoteliális sejtekre – ható gyulladásos kaszkádot indítanak el. A megfigyelt bőrpírt és ödémát az endoteliális sejtek dilatációja és fokozott permeabilitása idézi elő (24). A rekonstruált emberi felhámmodellen alapuló módszerek a kaszkád kezdeti eseményeit mérik.

12. A rekonstruált emberi felhámmodellben a sejtek életképességét a MTT [3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék; CAS-szám: 298–93–1)] vitális festék enzimatikus úton kék formazán sóvá történő átalakulása alapján mérik, amelyet a szövetekből történő kivonás után mennyiségileg meghatároznak (25). Az irritatív hatású anyagokat azon képességük alapján azonosítják, hogy a sejtek életképességét meghatározott határérték alá (azaz az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriájú anyagok esetében ≤ 50 % alá) csökkentik. Azoktól a jogszabályi keretektől függően, amelyekben a vizsgálati módszer eredményeit fel fogják használni, a határérték feletti sejtéletképességet eredményező anyagok irritáló hatással nem rendelkezőnek tekinthetők (azaz 50 % felett nincsenek kategóriába sorolva).

A JÁRTASSÁG BIZONYÍTÁSA

13. Az e vizsgálati módszer alapján hitelesített három módszer bármelyikének rutinszerű alkalmazását megelőzően a laboratóriumoknak igazolniuk kell technikai jártasságukat az 1. táblázatban felsorolt tíz referenciaanyag felhasználásával. Az e vizsgálati módszer alapján kifejlesztett hasonló módszerek vagy a három hitelesített módszer bármelyikének módosításai esetén, a módszer hatósági vizsgálatokra történő használata előtt teljesíteni kell a vizsgálati módszer 2. függelékében ismertetett teljesítményszabvány előírásait.

14. A jártasság igazolásának részeként ajánlott, hogy a felhasználó a rekonstruált emberi felhámmodell gyártója által meghatározottak szerint, átvétel után ellenőrizze a szövetek barrierjellemzőit. Ez különösen fontos, ha a szöveteket nagy távolságra/hosszú ideig szállították. Ha egy módszert már sikeresen igazoltak, és az alkalmazásában való jártasságot bizonyították, akkor ilyen jellegű ellenőrzéseket nem szükséges rutinszerűen végezni. Ha azonban egy módszert rutinszerűen alkalmaznak, akkor a barrierjellemzőket javasolt továbbra is rendszeres időközönként ellenőrizni.

1. táblázat

Referenciaanyagok ([1])

Vegyi anyag	CAS-szám	*In vivo* eredmény ([2])	Halmazállapot	ENSZ GHS/EU CLP szerinti kategória
naftalin-ecetsav	86-87-3	0	szilárd	kategória nélküli
izopropanol	67-63-0	0,3	folyadék	kategória nélküli

▼M3

Vegyi anyag	CAS-szám	*In vivo* eredmény ([2])	Halmazállapot	ENSZ GHS/EU CLP szerinti kategória
metil-sztearát	112-61-8	1	szilárd	kategória nélküli
heptil-butirát	5870-93-9	1,7	folyadék	kategória nélküli *(opcionális 3. kategória)* ([3]), ([4])
hexil-szalicilát	6259-76-3	2	folyadék	kategória nélküli *(opcionális 3. kategória)* ([3]), ([4])
ciklámen-aldehid	103-95-7	2,3	folyadék	2. kat.
1-brómhexán	111-25-1	2,7	folyadék	2. kat.
kálium-hidroxid (5 %-os vizes oldat)	1310-58-3	3	folyadék	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	3,3	szilárd	2. kat.
Heptanal	111-71-7	3,4	folyadék	2. kat.

([1]) Ezek a referenciaanyagok a hitelesítési vizsgálat során alkalmazott referenciaanyagok alcsoportját képezik.
([2]) *In vivo* eredmény a B.4. fejezet és az OECD 404. vizsgálati iránymutatása szerint (4).
([3]) E vizsgálati módszer alapján az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába tartozó anyagok (enyhe irritáló hatású anyagok) (1) „kategória nélküli" anyagoknak minősülnek.
([4]) Az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategória az EU CLP rendszerben nem alkalmazható.

ELJÁRÁS

15. Az alábbiakban a rekonstruált emberi felhámmodellen végzett bőrirritációs vizsgálat összetevőinek és eljárásainak leírása található. Rekonstruált emberi felhámmodellt kell felépíteni; a modell elkészíthető házon belül vagy beszerezhető kereskedelmi forgalomból. Az EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) és SkinEthic™ RHE módszerekhez szabványműveleti előírások (SOP) állnak rendelkezésre (26)(27)(28). A vizsgálatot az alábbiak szerint kell végrehajtani:

A rekonstruált emberi felhámmodellel végzett módszer összetevői

Általános feltételek

16. Az epitélium felépítéséhez nem transzformált emberi keratinsejteket kell használni. Élő epitélsejtek több rétegének (bazális réteg, *stratum spinosum, stratum granulosum*) kell jelen lennie a funkcionális *stratum corneum* alatt. A *stratum corneum*nak többrétegűnek kell lennie, és tartalmaznia kell az elengedhetetlenül szükséges lipidprofilt, hogy nagy ellenálló képességgel rendelkező funkcionális barriert képezzen a citotoxikus markeranyagok, pl. a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolása ellen. A barrierfunkciót bizonyítani kell, ennek értékelése vagy a markeranyag azon koncentrációjának meghatározásával történik, amely a szövetek életképességét meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal csökkenti (IC_{50}), vagy a markeranyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazásakor a sejtek életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő (ET_{50}) meghatározásával. A rekonstruált emberi felhámmodell folyadékzáró tulajdonságainak meg kell akadályozni, hogy az anyag áthatoljon a *stratum corneum* körül az élő szövetbe, amely a bőr expozíciójának rossz modellezését eredményezné. A rekonstruált emberi felhámmodellnek baktérium-, vírus-, mikoplazma- és gombafertőzéstől mentesnek kell lennie.

▼M3

Funkcionális feltételek

Életképesség

17. Az életképesség nagyságrendjének meghatározásához az MTT-vizsgálatot alkalmazzák (25). A rekonstruált emberi felhámmodell (RhE) felhasználóinak biztosítaniuk kell, hogy az alkalmazott RhE minden egyes tétele megfeleljen a negatív kontrollra (NC) vonatkozóan meghatározott kritériumoknak. Az extraháló oldószer optikai sűrűségének (OD) eléggé alacsonynak, azaz 0,1 alattinak kell lennie. A RhE modell gyártója/forgalmazója (a bőrirritáció meghatározására irányuló vizsgálati módszer feltételeiben) a negatív kontroll OD-értékeire vonatkozóan elfogadási tartományt (felső és alsó határérték) ad meg; a három hitelesített módszerre vonatkozó elfogadási tartományok a 2. táblázatban vannak feltüntetve. Dokumentálni kell, hogy a negatív kontrollal kezelt szövetek stabil tenyészetben vannak (hasonló életképességi értékeket adnak) a vizsgálat során alkalmazott expozíció időtartama alatt.

2. táblázat

A negatív kontrollok OD-értékeinek elfogadási tartományai

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Barrierfunkció

18. A *stratum corneum*nak és lipidprofiljának az IC_{50} vagy ET_{50} alapján végzett becslések szerint (3. táblázat) megfelelő ellenálló képességgel kell rendelkeznie a citotoxikus markeranyagok, például a nátrium-dodecil-szulfát (SDS) vagy a Triton X-100 gyors áthatolásának megakadályozására.

Morfológia

19. A rekonstruált emberi felhámmodellen szövettani vizsgálatot kell végezni, amely igazolja a humán *epidermisz*szerű szerkezetet (beleértve a többrétegű *stratum corneum*ot is).

Reprodukálhatóság

20. A módszer során vizsgált pozitív kontrollanyagok (PC) és negatív kontrollanyagok (NC) eredményeinek a későbbiekben reprodukálhatóknak kell lenniük.

Minőség-ellenőrzés (QC)

21. A rekonstruált emberi felhámmodell előállítójának/forgalmazójának gondoskodnia kell arról, és igazolnia kell azt, hogy az alkalmazott RhE modell minden egyes tétele megfelel a gyártás utáni felszabadításra vonatkozóan meghatározott feltételeknek, amelyek közül az *életképességre* (17. bekezdés), a *barrierfunkcióra* (18. bekezdés) és a *morfológiára* (19. bekezdés) vonatkozó kritériumok a leglényegesebbek. Ezeket az adatokat a módszer felhasználóinak rendelkezésére kell bocsátani, hogy ezeket az információkat fel tudják tüntetni a vizsgálati jelentésben. Az RhE-modell kifejlesztőjének/forgalmazójának (illetve házon belüli modell használata estén a vizsgálatot végző személynek) az IC_{50} és az ET_{50}-értékekre vonatkozóan elfogadási tartományt (felső és alsó határértéket) kell megállapítania. Az irritáló hatás besorolásának megbízható előrejelzéseként kizárólag minősített szöveteken végzett vizsgálatok eredményei fogadhatók el. A 3. táblázatban például a három hitelesített módszerhez alkalmazott elfogadási tartományok láthatók.

▼M3

3. táblázat

Példák a minőség-ellenőrzésre szolgáló tételeknél alkalmazott felszabadítási kritériumokra

	Alsó elfogadási határ	Felső elfogadási határ
EpiSkin™ (SM) (18 órás kezelés nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % Triton X-100)(27)	ET_{50} = 4,8 óra	ET_{50} = 8,7 óra
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100)(28)	ET_{50} = 4,0 óra	ET_{50} = 9,0 óra

A vizsgált anyagok és kontrollanyagok alkalmazása

22. Minden vizsgálatmenetben valamennyi vizsgált vegyi anyaghoz és kontrollhoz legalább három szövetpéldányt kell használni. Folyékony és szilárd anyagok esetében egyaránt megfelelő mennyiségű vizsgált vegyi anyagot kell alkalmazni, hogy az egyenletesen fedje az *epidermisz* felszínét, azaz minimum 25 µl/cm^2 vagy 25 mg/cm^2-ot, ugyanakkor el kell kerülni végtelen dózis alkalmazását. Szilárd anyagok alkalmazása előtt az *epidermisz* felületét ionmentesített vagy desztillált vízzel be kell nedvesíteni, hogy jobb legyen az érintkezés a vizsgált vegyi anyag és az *epidermisz* felszíne között. Amennyiben lehetséges, a szilárd anyagokat finom por formájában kell vizsgálni Az expozíciós idő lejárával a vizsgált vegyi anyagot vizes alapú pufferrel vagy 0,9 %-os NaCl-dal óvatosan le kell mosni az *epidermisz* felületéről. Attól függően, hogy a három hitelesített RhE-módszer közül melyiket alkalmazzák, az expozíciós idő 15–60 perc között, az inkubációs hőmérséklet pedig 20–37 °C között változhat. Ezeket az expozíciós időket és hőmérsékleteket a módszerek természetéből adódó jellemzők figyelembevételével mindegyik RhE-módszerre optimalizálták; ennek részleteit lásd a módszerek szabványműveleti előírásaiban (SOP) (26)(27)(28).

23. Minden vizsgálatmenet során párhuzamos negatív (NC) és pozitív (PC) kontrollt is alkalmazni kell annak bizonyítására, hogy a szövetek (negatív kontrollal bizonyított) életképessége, barrierfunkciója és a (pozitív kontrollal bizonyított) kapott szövetérzékenység a korábbi adatok alapján meghatározott elfogadási tartományon belül van. A javasolt pozitív kontrollanyag nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldata. A javasolt negatív kontrollanyag a víz vagy a foszfátpuffert tartalmazó sóoldat (PBS).

A sejtek életképességének mérése

24. A vizsgálati eljárás legfontosabb eleme, hogy az életképesség mérését ne közvetlenül a vizsgált vegyi anyaggal végzett expozíció után végezzük, hanem friss tápközeggel történt átöblítés után, megfelelő hosszúságú kezelés utáni inkubációs időszakot követően. Ez az időszak egyaránt lehetővé teszi az enyhe irritatív hatás utáni felépülést, valamint az egyértelmű citotoxikus hatások megjelenését. A vizsgálat optimalizálási szakasza (11) (12) (13) (14) (15) azt mutatta, hogy 42 órás kezelés utáni inkubációs időszak az optimális.

25. Az MTT vizsgálat egy olyan kvantitatív hitelesített módszer, amelyet e vizsgálati módszer során a sejtek életképességének méréséhez kell alkalmazni. A vizsgálat kompatibilis a háromdimenziós szövetkonstrukcióban történő használattal. A szövetmintát 3 órára megfelelő koncentrációjú (például 0,3–1 mg/ml) MTT-oldatba kell helyezni. A kicsapódott kék formazán terméket ezután oldószer (például izopropanol, savas izopropanol) használatával ki kell vonni a szövetből, és a formazán koncentrációját az OD 570 nm-en történő mérésével, egy maximum ± 30 nm sávszűrő alkalmazásával meg kell határozni.

▼M3

26. A vizsgált vegyi anyag optikai tulajdonságai vagy az MTT-re gyakorolt kémiai hatása megzavarhatja a vizsgálatot, ami az életképesség téves megállapításához vezet (mivel a vizsgált anyag akadályozhatja, visszafordíthatja vagy akár elő is idézheti az elszíneződést). Ez akkor következhet be, amikor egy adott vizsgált vegyi anyagot öblítéssel nem távolítottak el teljesen a szövetből, vagy amikor az anyag áthatol az *epidermis*zen. Ha a vizsgált vegyi anyag közvetlen hatást gyakorol az MTT-re (MTT-redukáló), természetes állapotában is színes, vagy a szövetkezelés során elszíneződik, akkor további kontrollokat kell alkalmazni annak kimutatására és korrigálására, hogy a vizsgált vegyi anyag befolyásolja az életképesség mérésének módját. A három hitelesített módszer szabványműveleti előírásaiban megtalálható annak részletes leírása, hogyan kell korrigálni a közvetlen MTT-redukáló hatást és a színezőanyagok okozta zavaró hatást (26)(27)(28).

Elfogadhatósági kritériumok

27. Minden olyan módszer esetében, melynek során érvényes RhE-modell tételeket alkalmaznak (lásd a 21. bekezdést), a negatív kontrollal kezelt szöveteknek olyan OD-t kell mutatniuk, amely tükrözi a szöveteknek a szállítást és az átvételi lépéseket, valamint az összes protokollfolyamatot követő minőségét. A kontrollok OD-értékei nem lehetnek alacsonyabbak a korábbi adatok alapján megállapított határértékeknél. Hasonlóképpen a pozitív kontrollal, vagyis nátrium-dodecil-szulfát (SDS) 5 %-os vizes oldatával kezelt szöveteknek tükrözniük kell, hogy azok a vizsgálati módszer körülményei között képesek válaszreakciót adni az irritáló hatású anyagokra (26) (27) (28). A szövetpéldányok közötti variabilitás kapcsolódó, megfelelő mutatóit meg kell határozni (ha például a szórást (SD) alkalmazzák, ennek a régebbi adatok alapján számolt egyoldalú 95 %-os toleranciaintervallumon belül kell lennie; a hitelesített referencia-módszer esetében a szórásnak 18 % alatt kell lennie).

Az eredmények értelmezése és az előrejelzési modell

28. Az egyes vizsgált vegyi anyagokra vonatkozóan kapott OD-értékek felhasználhatók a negatív kontrollra normalizált életképesség százalékos arányának kiszámításához, amely 100 %-ra van beállítva. Az irritáló anyagokat a kategória nélküli vizsgált vegyi anyagoktól megkülönböztető százalékos sejtéletképesség határértékét, valamint az eredmények értékeléséhez és az irritáló hatású vegyi anyagok meghatározásához alkalmazott statisztikai eljárás(oka)t egyértelműen meg kell határozni, dokumentálni kell, és megfelelőségüket igazolni kell. Az irritáló hatás előrejelzésére alkalmazott határértékek az alábbiak:

— A vizsgált vegyi anyag az ENSZ GHS/EU CLP 2. kategóriájába tartozó bőrirritáló hatásúnak anyagnak tekintendő, amennyiben az expozíció és a kezelést követő inkubáció után a szövet életképessége (≤) 50 % vagy ennél kevesebb.

— Azoktól a jogszabályi keretektől függően, amelyekben a vizsgálati módszer eredményeit fel fogják használni, a vizsgált vegyi anyag az ENSZ GHS/EU CLP szerint kategóriába nem sorolt, bőrirritáló hatással nem rendelkező anyagnak tekintendő, amennyiben az expozíció és a kezelést követő inkubáció után a szövet életképessége (>) 50 %-nál nagyobb.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

29. Mindegyik vizsgálatmenetre vonatkozóan táblázatos jelentést kell készíteni az egyes szövetpéldányok adatairól (például OD-értékek és számított százalékos sejt-életképességi adatok az egyes vizsgált vegyi anyagok esetében, a besorolást is beleértve), amelyben szerepelnie kell a megismételt kísérletek adatainak is, ha voltak ilyenek. Továbbá mindegyik vizsgálatmenet esetében meg kell adni az átlagot ± szórást. Az MTT reagenssel és a színes vizsgált vegyi anyagokkal megfigyelt kölcsönhatásokat a jelentésben minden vizsgált vegyi anyag esetében fel kell tüntetni.

▼**M3**

Vizsgálati jelentés

30. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

— a vegyi anyag(ok) neve, például a CAS-név és -szám, EU-név és -szám, ha ismert,

— a vegyi anyag tisztasága és összetétele (tömegszázalékban),

— a vizsgálat elvégzése szempontjából lényeges fizikai/kémiai tulajdonságok (pl. halmazállapot, stabilitás, illékonyság, pH és vízoldékonyság, ha ismert,

— a vizsgált vegyi anyagok/kontrollanyagok vizsgálatot megelőző kezelése, ha történt ilyen (például melegítés, porítás),

— tárolási feltételek.

Az alkalmazott rekonstruált emberi felhámmodell és protokoll indoklása

Vizsgálati körülmények:

— a felhasznált sejtrendszer,

— az alkalmazott specifikus RhE-modellre vonatkozó teljes körű alátámasztó adatok, köztük a modell teljesítménye. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

  i. életképesség;

  ii. barrierfunkció;

  iii. morfológia;

  iv. reprodukálhatóság és prediktív érték;

  v. a modell minőség-ellenőrzése (QC),

— az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei,

— az alkalmazott vizsgálati dózisok, az expozíció időtartama és a kezelés utáni inkubációs időszak hossza,

— a vizsgálati eljáráson végzett bármilyen változtatás leírása,

— hivatkozás a modellel kapott korábbi adatokra. Ennek többek között az alábbiakat kell magában foglalnia:

  i. a minőség-ellenőrzési adatok elfogadhatósága tekintettel a tételre vonatkozó korábbi adatokra;

  ii. a pozitív és negatív kontrollértékek elfogadhatósága tekintettel a pozitív és negatív kontrollok átlagértékeire és tartományaira;

— az alkalmazott értékelési kritériumok leírása, beleértve az előrejelző modellhez választott határérték(ek) indoklását,

— hivatkozás a régebbi kontrolladatokra,

▼**M3**

Eredmények:

— az egyes vizsgált vegyi anyagok adatainak táblázatos bemutatása mindegyik vizsgálatmenet és mindegyik szövetpéldány esetében,

— a közvetlen MTT-redukáló hatással rendelkező és/vagy színváltozást okozó vegyi anyagokhoz alkalmazott kontrollok feltüntetése,

— a megfigyelt egyéb jelenségek leírása.

Az eredmények tárgyalása

Következtetés

SZAKIRODALOM

(1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Elektronikus formátumban: [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" ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 2009. április 9. Elektronikus formátumban: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(3) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

(4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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)? Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu]

(21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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). Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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) A Bizottság 2001/59/EK irányelve (2001. augusztus 6.) a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő huszonnyolcadik hozzáigazításáról, HL L 225., 2001.8.21., 1. o.

(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

1. függelék

Fogalommeghatározások

Pontosság: A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (9).

Sejtek életképessége: A sejtpopulációk teljes aktivitását mérő paraméter (például a celluláris mitokondriális dehidrogenázoknak az MTT ([3–(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid, tiazolil kék] vitális festéket redukáló képessége), amely – a mért végponttól és az alkalmazott vizsgálati tervtől függően – korrelációt mutat az élő sejtek teljes számával és/vagy életképességével.

Egyezés: A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. A kifejezést a pontosság szinonimájaként használják, és a vizsgált vegyi anyagok közül az adott módszerrel helyesen a pozitív vagy negatív eredményt adók közé besorolható vegyi anyagok arányát fejezi ki (9).

ET_{50}: A marker vegyi anyag meghatározott, állandó koncentrációban történő alkalmazása esetén a sejt életképességének 50 %-kal való csökkentéséhez szükséges expozíciós idő meghatározásával becsülhető meg, lásd még az IC_{50}-et.

EU CLP (Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról): Az ENSZ által kidolgozott, vegyi anyagok (anyagok és keverékek) osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszerét (GHS) az Európai Unióban (EU) végrehajtó rendelet (3).

GHS (az ENSZ által kidolgozott, vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): Anyagoknak és keverékeknek a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkaadók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse az anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (1).

IC_{50}: Annak a koncentrációnak a meghatározásával becsülhető meg, amelynél egy adott markeranyag egy meghatározott expozíciós idő elteltével 50 %-kal (IC_{50}) csökkenti a szövetek életképességét; lásd még az ET_{50}-et.

Végtelen dózis: Az *epidermiszen* alkalmazott vizsgált vegyi anyag azon mennyisége, amely meghaladja az *epidermisz* felszínének teljes és egyenletes befedéséhez szükséges mennyiséget.

Me-too vizsgálat: Olyan vizsgálati módszerek köznapi elnevezése, amelyek strukturálisan és funkcionálisan hasonlóak egy hitelesített és elfogadott referenciaként szolgáló vizsgálati módszerhez. Az ilyen vizsgálati módszerek esetében megfelelő lehet az úgynevezett „catch-up” (rövidített) hitelesítési eljárás. A hasonló vizsgálati módszer szinonimája (9).

Teljesítményszabványok: Hitelesített referencia-módszeren alapuló szabványok, amelyek a javasolt, végrehajtás és funkcionalitás szempontjából hasonló vizsgálati módszer összehasonlíthatósági értékelésének alapjául szolgálnak. Ide tartoznak: i. a vizsgálati módszer alapvető összetevői; ii. a hitelesített vizsgálati módszer elfogadható teljesítményének igazolására alkalmazott vegyi anyagok közül kiválasztott referenciaanyagok minimális listája; valamint iii. a hitelesített vizsgálati módszerrel kapott eredmények alapján az az összehasonlítható szintű pontosság és megbízhatóság, amelyet a javasolt vizsgálati módszernek a referenciaanyagok minimális listájával történő értékeléskor mutatnia kell (9).

▼M3

Referenciaanyagok: A hitelesítési eljárás során történő alkalmazásra kiválasztott olyan vegyi anyagok, amelyek esetében már ismert az *in vitro* vagy *in vivo* referencia-vizsgálatirendszerben vagy vizsgált fajnál adott válaszreakció. Ezeknek a vegyi anyagoknak reprezentatívaknak kell lenniük arra az anyagcsoportra nézve, amely esetében a vizsgálati módszert várhatóan alkalmazni fogják, és képviselniük kell azon vegyi anyagokra jellemző válaszreakciók teljes tartományát – az erőstől kezdve a gyengén át a negatívig –, amelyek esetében az adott referenciaanyag alkalmazható. A hitelesítési eljárás különböző szakaszaiban, illetve a különböző vizsgálati módszerekhez és vizsgálati alkalmazásokhoz a referenciaanyagok különböző csoportjaira lehet szükség (9).

Relevancia: A vizsgálat és a vizsgált hatás kapcsolatát adja meg, valamint azt, hogy van-e a vizsgálatnak az adott cél szempontjából értelme és haszna. Azt tükrözi, hogy a vizsgálat mennyire pontosan méri vagy jelzi előre a vizsgált biológiai hatást. A relevancia meghatározása során a vizsgálati módszer pontosságát (az eredmények egyezését) kell figyelembe venni (9).

Megbízhatóság: Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (9).

Helyettesítő vizsgálat: Olyan vizsgálat, amelynek célja, hogy a veszélyek azonosítására és/vagy kockázatértékelésre rutinszerűen alkalmazott és elfogadott vizsgálatot helyettesítse, és amelyről megállapították, hogy az elfogadott vizsgálattal összehasonlítva, az összes lehetséges vizsgálati helyzetben és vegyi anyag esetében a humán vagy állati egészség egyenértékű vagy jobb védelmét biztosítja (9).

Érzékenység: A vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes pozitív/aktív vizsgált vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Bőrirritáció: A vizsgált vegyi anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás. A bőrirritáció helyileg jelentkező, nem immunogén reakció, amely röviddel a stimuláció után megjelenik (29). Fő jellemzője, hogy gyulladásos reakciókkal és gyulladásos folyamat által okozott irritáció klinikailag jellemző jeleinek többségével (bőrpír, ödéma, viszketés és fájdalom) kísért, visszafordítható folyamat.

Specificitás: A vizsgálat elvégzésével helyesen besorolt összes negatív/inaktív vizsgált vegyi anyag aránya. A kategorikus eredményt adó vizsgálati módszerek pontosságának mutatója, valamint fontos szempont a vizsgálati módszerek relevanciájának megítélésében (9).

Többszintű vizsgálati stratégia: Egymás után következő vizsgálati módszereket alkalmazó vizsgálat; az egyes egymást követő szinteken választandó vizsgálati módszerekről a vizsgálat előző szintjén kapott eredmények alapján kell dönteni (9).

Vizsgált vegyi anyag (más néven vizsgált anyag): Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

▼M3

2. függelék

Teljesítményszabványok a javasolt hasonló vagy módosított, *IN VITRO* rekonstruált emberi felhámmodellen végzett bőrirritációs vizsgálatok értékeléséhez

BEVEZETÉS

1. A teljesítményszabványok (PS) célja annak ismertetése, hogy milyen alapon lehet egy új vizsgálati módszerről – akár védett (például szerzői joggal védett, védjeggyel ellátott, bejegyzett), akár nem védett módszerről – megállapítani, hogy adott vizsgálati célokra kellő pontossággal és megbízhatósággal rendelkezik. Ezek a hitelesített és elfogadott vizsgálati módszereken alapuló teljesítményszabványok a hasonló tudományos elvekre és mérésre épülő, illetve azonos biológiai vagy toxikus hatást előrevetítő módszerek (köznapi elnevezéssel „mee-too” vizsgálatok) megbízhatóságának és pontosságának értékelésére alkalmazhatók (9).

2. A módosított módszerek (például tervezett esetleges javítás egy jóváhagyott módszeren) alkalmazása előtt értékelést kell végezni annak meghatározására, hogy a tervezett változtatások milyen hatást gyakorolnak a vizsgálat teljesítményére, és milyen mértékben befolyásolják a hitelesítési folyamat egyéb összetevőiről rendelkezésre álló információkat. A tervezett változtatások számától és jellegétől, valamint a változtatásokra vonatkozóan keletkezett adatoktól és alátámasztó dokumentációtól függően ezeket vagy az új vizsgálatokra előírtakkal megegyező hitelesítési eljárásnak, vagy – amennyiben ez lehetséges – a megállapított teljesítményszabványban foglalt korlátozott megbízhatósági és relevanciaértékelésnek kell alávetni (9).

3. A három hitelesített módszer (EpiSkin™ [hitelesített referencia-módszer – VRM], EpiDerm™ SIT [EPI-200] és SkinEthic™ RHE) bármelyikének hasonló („me-too”) vagy módosított, e vizsgálati módszerben alkalmazásra javasolt változatát a megbízhatóság és pontosság meghatározása érdekében a Draize-féle irritációs pontértékek teljes tartományát képviselő anyagok felhasználásával kell értékelni. A teljesítményszabvány húsz javasolt referenciaanyagának (1. táblázat) felhasználásával történő értékelés során a javasolt hasonló vagy módosított eljárás által elért megbízhatósági és pontossági értékeknek hasonlónak kell vagy jobbnak kell lenniük a hitelesített referencia-módszer (VRM) ugyanezen értékeinél (2. táblázat) (2) (16). Az elérendő pontossági és megbízhatósági értékek a függelék 8–12. bekezdésében találhatók. A függelékben különféle kémiai osztályokat képviselő besorolás nélküli (az ENSZ GHS/EU CLP szerint kategória nélküli) és besorolással rendelkező (az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriába tartozó) (1) kémiai anyagokat tüntettek fel, hogy a javasolt vizsgálati módszer és a hitelesített referencia-módszer megbízhatóságát és pontosságát (érzékenység, specificitás és összesített pontosság) össze lehessen hasonlítani. Új vegyi anyagok vizsgálatára történő alkalmazását megelőzően a vizsgálati módszer megbízhatóságát, valamint az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriába tartozó irritatív hatású anyagok, illetve – az adatszolgáltatást igénylő szabályozási kerettől függően – az ENSZ GHS/EU CLP szerinti kategória nélküli anyagok helyes azonosítására való képességét is bizonyítani kell.

4. Ezek a teljesítményszabványok az EC-ECVAM teljesítményszabványon alapulnak (8), és ezeket az osztályozásra és címkézésre vonatkozó ENSZ GHS és EU CLP rendszer szerint aktualizálták (1) (3). Az eredeti teljesítményszabványt a hitelesítési vizsgálat (21) elvégzése után határozták meg, a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő huszonnyolcadik hozzáigazításáról szóló, 2001. augusztus 6-i 2001/59/EK bizottsági irányelvben ([1]) rögzített uniós osztályozási rendszer alapján. Mivel a hitelesítési vizsgálat befejezése és az e vizsgálati módszer elkészítése közötti

([1]) HL L 225., 2001.8.21., 1. o.

▼M3

időszakban az EU átvette (EU CLP) az ENSZ osztályozásra és címkézésre vonatkozó GHS rendszerét (3), a teljesítményszabványt aktualizálták (8). Ez az aktualizálás főként i. a teljesítményszabványban foglalt referenciaanyagok körét, valamint ii.a meghatározott megbízhatósági és pontossági értékeket érintő változásokat jelent (2) (23).

REKONSTRUÁLT EMBERI FELHÁMMODELLEN VÉGZETT IN VITRO BŐRIRRITÁCIÓS VIZSGÁLATOK TELJESÍTMÉNYSZABVÁNYA

5. A teljesítményszabvány a következő három elemet foglalja magában (9):

I. A vizsgálati módszer alapvető összetevői

II. A referenciaanyagok minimális listája

III. A megbízhatóság és a pontosság meghatározott értékei

I. **A vizsgálati módszer alapvető összetevői**

6. Ezek egy adott hitelesített módszer azon elengedhetetlen szerkezeti, funkcionális és procedurális elemeit jelentik, amelyeket a javasolt, technikailag és funkcionálisan hasonló vagy módosított módszer protokolljának tartalmaznia kell. Ezen összetevők közé tartoznak a módszer egyedi jellemzői, döntő fontosságú procedurális részletei, valamint a minőség-ellenőrzési lépések. A vizsgálati módszer alapvető elemeinek betartása elősegíti annak biztosítását, hogy a javasolt hasonló vagy módosított módszer ugyanazokon az elveken alapuljon, mint a vonatkozó hitelesített referencia-módszer (9). A vizsgálati módszer alapvető összetevőinek részletes ismertetése a vizsgálati módszer leírásának 16–21. bekezdésében található, és a vizsgálatot a következők szerint kell végezni:

— Általános feltételek (16. bekezdés)

— Funkcionális feltételek, többek között:

— életképesség (17. bekezdés),

— barrierfunkció (18. bekezdés),

— morfológia (19. bekezdés),

— reprodukálhatóság (20. bekezdés), valamint

— minőség-ellenőrzés (21. bekezdés).

II. **A referenciaanyagok minimális listája**

7. Referenciaanyagokat kell alkalmazni annak megállapítására, hogy a hitelesített referencia-módszerekhez szerkezetileg és funkcionálisan igazoltan hasonló, vagy a három hitelesített módszer egyikének kisebb módosítását képviselő javasolt módszer megbízhatósága és pontossága hasonló vagy jobb eredményeket mutat, mint a hitelesített referencia-módszeré (2) (8) (16) (23). Az 1. táblázatban felsorolt 20 ajánlott referenciaanyag között különböző kémiai osztályokat képviselő anyagok (vagyis a funkcionális csoportok alapján meghatározott kémiai osztályok) találhatók, amelyek a Draize-féle irritációs pontértékek teljes tartományát lefedik (a nem irritálótól az erősen irritálóig). A listán szereplő vegyi anyagok közül 10 tartozik az ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategóriába, 10 anyag pedig nincs kategóriába sorolva, amelyek közül 3 az ENSZ GHS szerinti opcionális 3. kategóriába tartozik. E vizsgálati módszer szerint az opcionális 3. kategóriába tartozó anyagok „kategória nélkülinek” minősülnek.

▼M3

Az 1. táblázatban felsorolt vegyi anyagokat a hitelesített referencia-módszer előhitelesítést követő optimalizációs fázisában és hitelesítési vizsgálata során alkalmazott anyagok közül választott ák ki, figyelembe véve a kémiai funkciót és a halmazállapotot (14) (18). Ezek a referenciaanyagok képezik azon anyagok minimális számát, amelyeket egy javasolt hasonló vagy módosított módszer pontosságának és megbízhatóságának értékeléséhez fel kell használni, új módszerek kifejlesztéséhez azonban nem szabad alkalmazni. Olyan esetekben, amikor a listában szereplő anyagok egyike nem hozzáférhető, alkalmazható más olyan anyag, amelyre vonatkozóan megfelelő *in vivo* referenciaadatok állnak rendelkezésre, és amelyet elsősorban a hitelesített referencia-módszer előhitelesítését követő optimalizációs szakaszban vagy a hitelesítési vizsgálat során alkalmazott anyagok közül kell kiválasztani. Szükség esetén a javasolt vizsgálati módszer pontosságának további értékeléséhez a referenciaanyagok minimális listája kiegészíthető más kémiai osztályba tartozó és megfelelő *in vivo* referenciaadatokkal rendelkező további anyagokkal.

1. táblázat

A hasonló vagy módosított, rekonstruált emberi felhámon (epidermisz) végzett bőrirritációs vizsgálati módszerek pontossági és megbízhatósági értékeinek meghatározásához alkalmazandó referenciaanyagok minimális listája [1]

Vegyi anyag	CAS-szám	Halmazállapot	*In vivo* eredmény	VRM *in vitro* kategória	ENSZ GHS/EU CLP *in vivo* kategória
1-bróm-4-klórbután	6940-78-9	folyadék	0	2. kat.	kategória nélküli
dietilftalát	84-66-2	folyadék	0	kategória nélküli	kategória nélküli
naftalin-ecetsav	86-87-3	szilárd	0	kategória nélküli	kategória nélküli
allil-fenoxi-acetát	7493-74-5	folyadék	0,3	kategória nélküli	kategória nélküli
izopropanol	67-63-0	folyadék	0,3	kategória nélküli	kategória nélküli
4-metil-tio-benzaldehid	3446-89-7	folyadék	1	2. kat.	kategória nélküli
metil-sztearát	112-61-8	szilárd	1	kategória nélküli	kategória nélküli
heptil-butirát	5870-93-9	folyadék	1,7	kategória nélküli	kategória nélküli
hexil-szalicilát	6259-76-3	folyadék	2	kategória nélküli	kategória nélküli
Cinnamaldehid	104-55-2	folyadék	2	2. kat. 2	kategória nélküli *(opcionális 3. kategória)* [3]
1-dekanol [2]	*112-30-1*	*folyadék*	*2,3*	*2. kat.*	*2. kat.*
ciklámen-aldehid	103-95-7	folyadék	2,3	2. kat.	2. kat.
1-brómhexán	111-25-1	folyadék	2,7	2. kat.	2. kat.
2-klórmetil-3,5-dimetil-4-metoxipiridin-hidroklorid	86604-75-3	szilárd	2,7	2. kat. 2	2. kat.2
di-n-propil-diszulfid [2]	*629-19-6*	*folyadék*	*3*	*kategória nélküli*	*2. kat.*
kálium-hidroxid (5 %-os vizes oldat)	1310-58-3	folyadék	3	2. kat.	2. kat.
benzoltiol, 5-(1,1-dimetil-etil)-2-metil	7340-90-1	folyadék	3,3	2. kat.	2. kat.
1-metil-3-fenil-1-piperazin	5271-27-2	szilárd	3,3	2. kat.	2. kat.

▼M3

Vegyi anyag	CAS-szám	Halmazállapot	*In vivo* eredmény	VRM *in vitro* kategória	ENSZ GHS/EU CLP *in vivo* kategória
Heptanal	111-71-7	folyadék	3,4	2. kat.	2. kat.
Tetraklóretilén	127-18-4	folyadék	4	2. kat.	2. kat.

([1]) A vegyi anyagok kiválasztása a következő kritériumokon alapul: i. az anyag kereskedelmi forgalomban kapható; ii. képviseli a Draize-féle bőrirritációs pontértékek teljes tartományát (a nem irritálótól az erősen irritálóig); iii. jól meghatározott kémiai szerkezettel rendelkezik; iv. reprezentatív a hitelesítési folyamat során alkalmazott kémiai funkcionalitás tekintetében; és v. nem rendelkezik rendkívül toxikus profillal (például karcinogén hatással vagy reproduktív toxicitással), valamint ártalmatlanítása nem jár problémát jelentő költségekkel.

([2]) Nyulaknál irritáló hatású vegyi anyagoknak számítanak, emberekre azonban megbízható bizonyítékok alapján nincs irritáló hatásuk (31) (32) (33).

([3]) Az ENSZ GHS szerint, az EU CLP szabványban nem szerepel.

III. **A megbízhatóság és a pontosság meghatározott értékei**

8. A laboratóriumok között átadni kívánt javasolt hasonló vagy módosított módszerek megbízhatóságának és relevanciájának megállapításához az 1. táblázatban szereplő mind a 20 referenciaanyagot legalább három laboratóriumban kell vizsgálni. Ha azonban a javasolt módszert csak egy laboratóriumban kívánják alkalmazni, akkor a hitelesítéshez nem szükséges a több laboratóriumban végzett tesztelés. Elengedhetetlenül fontos azonban, hogy ezeket a hitelesítési vizsgálatokat nemzetközileg elismert, hitelesítéssel foglalkozó testületek a nemzetközi irányelvekkel összhangban függetlenül értékeljék (9). Mindegyik laboratóriumban 20 referenciaanyagot kell vizsgálni különböző szövettételekkel végzett három független menetben, megfelelő időt hagyva az egyes menetek között. Mindegyik menetnek legalább három, párhuzamos szövetmintapéldány vizsgálatát kell magában foglalnia a listában szereplő egyes vegyi anyagok, negatív kontroll és pozitív kontroll alkalmazásával.

9. A javasolt módszer megbízhatósági és pontossági értékeinek kiszámítását az alábbi négy kritérium együttes figyelembevételével kell végezni, biztosítva, hogy a megbízhatóságot és a relevanciát jellemző értékek előre meghatározott és következetes módon kerüljenek kiszámításra:

   1. Csak olyan vizsgálatmenetek adatai vonhatók be a módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti variabilitásának és prediktív értékének (pontosságának) kiszámításába, amelyek esetében a teljes vizsgálatsor lezajlott.

   2. Az egyes referenciaanyagok végleges besorolását mindegyik laboratóriumban egy teljes vizsgálatsor különböző vizsgálataiban megfigyelt életképesség átlagértékének felhasználásával kell meghatározni.

   3. A laboratóriumok közötti variabilitás kiszámítása során csak azokra a vegyi anyagokra vonatkozó adatokat szabad figyelembe venni, amelyek esetében minden résztvevő laboratóriumban végrehajtották a teljes vizsgálatsort.

   4. A pontossági értékek kiszámítását a 20 referenciaanyagra vonatkozóan a különböző résztvevő laboratóriumokban kapott egyes laboratóriumi besorolások alapján kell végezni.

   Ebben a szövegösszefüggésben a **vizsgálatsor** adott vizsgált vegyi anyaggal egy laboratórium által elvégzett három független vizsgálatmenetet jelent. A **teljes vizsgálatsor** egy adott vizsgált vegyi anyaggal egyetlen laboratórium által végzett olyan vizsgálatsort jelent, amelyben mindhárom vizsgálat érvényes. Ez azt jelenti, hogy egyetlen érvénytelen vizsgálatmenet érvénytelenné teszi a három vizsgálatmenetből álló sorozat egészét.

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság

10. A laboratóriumon belüli reprodukálhatóság vizsgálata során a húsz referenciaanyag egyetlen laboratóriumban történő, egymástól független, különböző vizsgálatmenetei során kapott besorolási eredményeknek (ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategória vagy kategória nélküli) legalább (≥) 90 %-os egyezést kell mutatniuk.

▼M3

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság

11. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság vizsgálata nem feltétlenül szükséges, amennyiben a javasolt vizsgálati módszer csak egy laboratóriumban kerül alkalmazásra. A laboratóriumok között átadásra kerülő módszerek esetében a húsz referenciaanyag lehetőleg legalább három laboratóriumban történő, egymástól független, különböző vizsgálatmenetei során kapott besorolási eredményeknek (ENSZ GHS/EU CLP szerinti 2. kategória vagy kategória nélküli) legalább (≥) 80 %-os egyezést kell mutatniuk.

Prediktív érték (pontosság)

12. A javasolt hasonló vagy módosított módszer pontosságának (érzékenységének, specificitásának és összesített pontosságának) a hitelesített referencia-módszer pontosságához hasonlónak, vagy annál jobbnak kell lennie, figyelembe véve a vizsgált faj esetében a relevanciára vonatkozó kiegészítő információkat is (2. táblázat). Az érzékenységnek legalább (≥) 80 %-osnak kell lennie (2) (8) (23). Van azonban egy további specifikus előírás az *in vitro* módszer érzékenységére vonatkozóan, amely szerint az *in vivo* 2. kategóriába tartozó kémiai anyagok közül csak az *1-dekanol*t és a *di-n-propil-diszulfid*ot sorolhatja be egynél több laboratórium tévesen a kategória nélküli csoportba. A specificitásnak legalább (≥) 70 %-osnak kell lennie (2) (8) (23). A javasolt *in vitro* módszer specificitására vonatkozóan nincs további előírás, vagyis bármely résztvevő laboratórium bármelyik *in vivo* kategória nélküli kémiai anyagot besorolhatja tévesen, feltéve, hogy a vizsgálati módszer végleges specificitása az elfogadható tartományon belül marad. Az összesített pontosságnak legalább (≥) 75 %-osnak kell lennie (2) (8) (23). Bár a hitelesített referencia-módszer 1. táblázatban szereplő 20 referenciaanyagra vonatkozóan számított érzékenysége 90 %-os, a hasonló vagy módosított módszerek esetében az érvényesnek minősülő előírt minimális érzékenységi érték 80 %, mivel az *1-dekanolról* (határértéken lévő anyag) és a *di-n-propil-diszulfidról* (a hitelesített referencia-módszerrel álnegatív eredményt adó anyag) egyaránt ismert, hogy embernél nincs irritáló hatásuk (31) (32) (33), ugyanakkor nyúlon végzett vizsgálatok során irritáló hatásúnak bizonyulnak. Mivel az RhE-modelleket humán eredetű sejtekből építik fel, előfordulhat, hogy azok e vegyi anyagok esetében nem jelezik előre az irritáló hatást (ENSZ GHS/EU CLP szerinti, kategória nélküli besorolás).

2. táblázat

A hasonló vagy módosított módszerek hitelesítéséhez előírt prediktív szenzitivitásra, specificitásra és összesített pontosságra vonatkozó értékek

Szenzitivitás	Specificitás	Összesített pontosság
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

A vizsgálat elfogadási kritériumai

13. Lehetséges, hogy egy vagy több vizsgált vegyi anyaggal végzett egy vagy több vizsgálat az adott vizsgált anyag, illetve a kontrollanyagok tekintetében nem felel meg az elfogadási kritériumoknak, vagy a vizsgálat más okból nem fogadható el. A hiányzó adatok pótlása érdekében mindegyik vizsgált vegyi anyag esetében legfeljebb két további vizsgálat („ismétlés”) fogadható el. Pontosabban, mivel a vizsgálat ismétlésekor is kell párhuzamos pozitív és negatív kontrollt vizsgálni, minden vizsgált vegyi anyagesetében legfeljebb két további vizsgálatmenet végezhető.

14. Elképzelhető, hogy a vizsgálat megismétlése után sem sikerül minden résztvevő laboratóriumban elvégezni minden referenciaanyag esetében a legalább három érvényes vizsgálatmenetet, ami hiányos adatmátrixot eredményez. Ilyen esetekben a következő három kritériumnak kell eleget tenni ahhoz, hogy az adatkészleteket elfogadhatónak lehessen tekinteni:

1. Mind a 20 referenciaanyagnál lennie kell legalább egy teljes vizsgálatsornak.

▼**M3**

2. Az egyes résztvevő laboratóriumokban a vizsgálatmenetek legalább 85 %-ának hiánytalannak kell lennie (a 20 anyag esetében ez azt jelenti, hogy egyetlen laboratóriumban 3 érvénytelen vizsgálatsor megengedett).

3. Legalább három laboratóriumban az összes lehetséges vizsgálatmenet legalább 90 %-ának hiánytalannak kell lennie (ez 3 laboratóriumban vizsgált 20 anyag esetében azt jelenti, hogy összesen 6 érvénytelen vizsgálatsor megengedett).

▼M2

B.47. **SZARVASMARHA-SZARUHÁRTYA OPACITÁSÁNAK ÉS PERMEABILITÁSÁNAK MÉRÉSÉN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA**

BEVEZETÉS

1. A szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszer (a továbbiakban: BCOP vizsgálat) olyan *in vitr*o vizsgálati módszer, amely bizonyos körülmények között és bizonyos korlátok mellett felhasználható anyagok és vegyületek „szemkorróziót és súlyos szemirritációt okozóként" történő besorolására (1) (2) (3). E vizsgálati módszer alkalmazásában súlyos szemirritációt okozó anyagok azok az anyagok, amelyek a nyulak esetében a felvitelt követően legalább 21 napon át tartó szemléziókat okoznak. Noha a vizsgálat nem váltja ki teljes mértékben a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatot, a BCOP vizsgálat alkalmazása a szabályozói követelmények szerinti besorolás és címkézés egy adott alkalmazási területen történő meghatározására szolgáló, többszintű vizsgálati stratégia részeként ajánlott (4) (5). A vizsgált anyagok és keverékek (6) nyulakon végzett további vizsgálatok nélkül „szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó" besorolást kaphatnak. Azokat az anyagokat, amelyek vizsgálata negatív eredményt adott, az OECD 405. vizsgálati iránymutatásában (e melléklet B.5. fejezete) (7) leírtak szerint lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával nyulakon végzett további vizsgálatoknak kell alávetni.

2. E vizsgálati módszer célja a vizsgált anyag szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó esetleges hatásának kimutatása annak alapján, hogy izolált szarvasmarha-szaruhártyában milyen mértékben vált ki opacitást és fokozott permeabilitást. A szaruhártyára gyakorolt toxikus hatások jellemzése (i) a csökkent fényátbocsátás (opacitás) és (ii) a fluoreszcein-nátrium festékanyag fokozott áthatolása (permeabilitás) mérésével történik. A szaruhártya vizsgált anyagnak való expozícióját követően megállapítható opacitásból és permeabilitásból együttesen származtatjuk az ún. in *vitro* irritációs pontszámot (In Vitro Irritancy Score, a továbbiakban: IVIS), amely a vizsgált anyag irritáció szempontjából való osztályba sorolására szolgál.

3. A BCOP vizsgálattal 21 napnál rövidebb idő alatt gyógyuló szemléziókat kiváltó szemirritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagokat is vizsgáltak. Az ezekbe a kategóriákba tartozó anyagok tekintetében azonban nem történt meg a BCOP vizsgálat pontosságának és megbízhatóságának formális értékelése.

4. A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. E vizsgálati módszer alapja az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) BCOP vizsgálati protokollja (8), amelynek kidolgozása az alternatív módszerek validálásával foglalkozó európai, illetve japán központ (ECVAM, JaCVAM) részvételével végrehajtott nemzetközi validációs vizsgálat (4) (5) (9) alapján történt. A protokoll alapját az In Vitro Tudományok Intézetétől (IIVS) kapott adatok, illetve az INVITTOX 124. protokoll (10) képezi; ez a protokoll szolgált a BCOP vizsgálat Európai Közösség által finanszírozott, 1997–1998-ban elvégzett elővalidációjának protokolljaként. Mindkét protokoll alapja az a BCOP vizsgálati módszer, amelyről elsőként Gautheron et al. (11) számolt be.

▼M2

6. A vizsgálati módszer azonosított korlátai a validációs adatbázisban az alkoholok és a ketonok esetében tapasztalt nagy hamis pozitív arányokon és a szilárd anyagok esetében tapasztalt nagy hamis negatív arányon alapulnak (lásd a 44. pontot) (5). Ha az említett kémiai és fizikai osztályokba tartozó anyagokat kizárjuk az adatbázisból, akkor a BCOP vizsgálat pontossága az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerében egyaránt jelentősen javul (5). A vizsgálat célját (azaz kizárólag a szemkorróziót, illetve súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) is figyelembe véve a hamis negatív arányok jelentősége nem kritikus, hiszen az érintett anyagokat a szabályozói követelményektől függően – az adatok bizonyító erejének mérlegelésével, lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával – később nyulakon vagy más, megfelelően validált *in vitro* vizsgálatokkal is megvizsgálják. Emellett a jelenleg rendelkezésre álló validációs adatbázis nem teszi lehetővé egyes kémiai osztályok vagy termékcsoportok (például a keverékek) megfelelő értékelését. A vizsgálat végrehajtója azonban a vizsgálati módszer alkalmazását valamennyi típusú vizsgálandó anyag esetében (beleértve a keverékeket is) fontolóra veheti, a pozitív eredmény ugyanis ilyenkor is elfogadható lehet a szemkorrózió, illetve a súlyosan irritatív hatás jelzésére. Az alkoholok és a ketonok esetében azonban a kapott pozitív eredményeket a túlzó előrejelzés kockázata miatt óvatosan kell értelmezni.

7. A szarvasmarhaszemmel és a szarvasmarha-szaruhártyával végzett valamennyi eljárás során be kell tartani a vizsgáló intézménynek az állati eredetű anyagok – ideértve többek között a szöveteket és a szöveti folyadékokat – kezelésére vonatkozó rendelkezéseit és eljárásait. Ajánlott továbbá követni az általános laboratóriumi óvintézkedéseket is (12).

8. A vizsgálati módszernek korlátja, hogy noha figyelembe vesz egyes szemre gyakorolt, a nyulakon végzett szemirritációs vizsgálatban elemzett hatásokat, illetve bizonyos fokig azok súlyosságát is, nem veszi figyelembe a kötőhártya- és az íriszsérüléseket. Másrészről, noha maga a BCOP vizsgálat nem alkalmas a szaruhártya-léziók visszafordíthatóságának értékelésére, a nyulakon végzett szemvizsgálatok alapján korábban javasolták, hogy a szaruhártya-sérülés kezdeti mélységének értékelése alkalmas lehet a visszafordíthatatlan és a visszafordítható hatások megkülönböztetésére (13). Végezetül a BCOP vizsgálat nem alkalmas a szembe kerülés következtében fellépő szisztémás toxicitási potenciál megítélésére.

9. Továbbra is folyik a munka a BCOP vizsgálat nem súlyos irritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagok azonosítására való használhatósága, valamint korlátai részletesebb leírása érdekében (lásd még a 45. pontot is). A felhasználókat bátorítjuk arra, hogy mintáikat és/vagy adataikat küldjék meg a validáló szervezeteknek, ezzel ugyanis segíthetik a BCOP vizsgálat jövőbeli felhasználásainak (ideértve a nem súlyos irritációt okozó, illetve az irritációt nem okozó anyagok azonosítását is) formális értékelését.

10. Minden olyan laboratóriumnak, amely a vizsgálatot először alkalmazza, a 2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok felhasználásával ajánlatos meggyőződnie felkészültségéről. Mielőtt a laboratórium a BCOP vizsgálat adatait a szabályozói követelmények szerinti veszélyességi besorolás céljaira rendelkezésre bocsátaná, e vegyi anyagok vizsgálatával demonstrálhatja a BCOP vizsgálat elvégzésében való jártasságát.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A BCOP vizsgálat olyan organotipikus módszer, amely rövid távon *in vitro* fenntartja a szarvasmarhák izolált szaruhártyájának normál fiziológiai és biokémiai működését. A módszerrel a vizsgált anyag által okozott károsodás jellemzése a szaruhártya opacitásváltozásának opaciméterrel, illetőleg permeabilitásváltozásának látható fényes fényspektroszkópiával való kvantitatív mérése útján történik. A két mérés alapján számítjuk az IVIS értékét, amely a vizsgált anyag *in vivo* szemirritációs hatásának előrejelzését megalapozó *in vitro* veszélyességi besorolási kategória megállapítására szolgál (lásd a döntési kritériumokat).

▼M2

12. A BCOP vizsgálat frissen levágott szarvasmarhából izolált szaruhártyákat használ fel. A szaruhártya opacitásának mérése kvantitatív módon, a szaruhártyán átbocsátott fény mennyiségének mérésével történik. A permeabilitás mérése ugyancsak kvantitatív módon, a szaruhártya teljes vastagságán áthatoló és a hátsó kamrában található közegben kimutatható fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérésével történik. A vizsgált anyagoknak a szaruhártya felhámjának felületére történő felvitele a szaruhártyatartó elülső kamrájába történő bevitellel történik. A 3. függelék tartalmazza a BCOP vizsgálatban felhasznált szaruhártyatartó leírását és ábráját. A szaruhártyatartó a kereskedelmi forgalomban különféle forrásokból beszerezhető, vagy saját használatra megépíthető.

A szarvasmarhaszemek származása és életkora, az állatfaj kiválasztása

13. A vágóhídon a szarvasmarhákat rendszerint emberi fogyasztás céljából vagy más kereskedelmi célokból ölik le. A BCOP vizsgálat céljára felhasználandó szaruhártyák csak az emberi élelmiszerláncba való bekerülésre alkalmas, egészséges állatokból vehetők. Mivel a szarvasmarhák tömege fajtától, életkortól és nemtől függően jelentős mértékben eltérhet, a vágásra kerülő állatok tekintetében nincs ajánlott tömeg.

14. Különböző életkorú állatokból származó szemek esetén a szaruhártya mérete változó lehet. A 30,5 mm vízszintes átmérőt meghaladó és legalább 1 100 μm középponti vastagságú szaruhártyák általában nyolcévesnél idősebb, a 28,5 mm átmérő és 900 μm középponti vastagság alatti szaruhártyák általában ötévesnél fiatalabb szarvasmarhából származnak (14). Emiatt nem szokás 60 hónaposnál idősebb szarvasmarhákból származó szaruhártyákat felhasználni. Hagyományosan nem szokás 12 hónaposnál fiatalabb szarvasmarhákból származó szemeket sem felhasználni, mivel ebben az életkorban a szemek még fejlődésben vannak, és a szaruhártya vastagsága és átmérője lényegesen kisebb a kifejlett szarvasmarhából származó szaruhártyákon mért értékeknél. Előnyeikre való tekintettel ugyanakkor megengedhető a fiatal (6 és 12 hónap közötti életkorú) állatokból származó szaruhártyák használata is, mivel ezek nagyobb mennyiségben állnak rendelkezésre, szűkebb az életkori tartományuk, és ez esetben kisebb a munkavállalóknak a szarvasmarhák szivacsos agyvelőbántalmával szembeni kitettsége is (15). Mivel a szaruhártya méretének és vastagságának a korróziót és az irritációt okozó anyagokkal szembeni reagálási képességre gyakorolt hatásával kapcsolatban hasznos volna további értékelést végezni, a felhasználókat bátorítjuk arra, hogy számoljanak be a vizsgálataikban felhasznált szaruhártyákat adó állatok becsült életkoráról és/vagy tömegéről.

A szemek begyűjtése és beszállítása a laboratóriumba

15. A szemeket a vágóhíd alkalmazottai gyűjtik be. A mechanikai és egyéb károsodásnak a lehető legkisebb mértékűre való csökkentése érdekében a szemeket a halál bekövetkezése után mihamarabb ki kell venni. A szemek potenciálisan irritatív anyagokkal szembeni expozíciójának megelőzése érdekében a vágóhíd alkalmazottai az állat fejének leöblítésekor mosószert nem használhatnak.

16. A szemeket megfelelő méretű edénybe öntött Hank-féle sóoldatba (HBBS-oldat) kell helyezni oly módon, hogy az oldat a szemeket teljesen befedje, és a laboratóriumba oly módon kell beszállítani, hogy a lehető legkisebb legyen a károsodás és/vagy a bakteriális fertőzés esélye. Mivel a begyűjtés a vágás során történik, a szemek vérrel és más biológiai anyagokkal – ideértve a baktériumokat és más mikroorganizmusokat is – érintkezhetnek. Ezért fontos annak biztosítása, hogy a kontamináció veszélye a lehető legkisebb legyen (például a szemeket tartalmazó edény jégen tárolásával, a szemek szállítás közbeni tárolására használt HBSS-oldathoz antibiotikumok [például penicillin 100 IU/ml és streptomicin 100 mg/ml koncentrációban] hozzáadásával).

▼M2

17. A szemek begyűjtése és a szaruhártyának a BCOP vizsgálatban való felhasználása között eltelt időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie (a begyűjtésnek és a felhasználásnak rendszerint ugyanazon a napon meg kell történnie), és igazolni kell, hogy ez az idő nem befolyásolja a vizsgálat eredményeit, azaz a szemek kiválasztási kritériumait, valamint a pozitív és a negatív kontrollminták eredményeit. A vizsgálatban felhasznált valamennyi szemnek egy meghatározott napon begyűjtött szemállományból kell származnia.

A BCOP vizsgálatban felhasznált szemek kiválasztási kritériumai

18. A szemek épségét a laboratóriumba való beérkezést követően gondosan meg kell vizsgálni; ennek keretében ellenőrizni kell különösen a fokozott opacitást, valamint a karcolások és a rendellenes érburjánzás (neovaszkularizáció) jelenlétét. A vizsgálat céljára csak ép szemekből származó szaruhártyák használhatók fel.

19. Az egyes szaruhártyák minőségét a vizsgálat során később is kell értékelni. A vizsgálatból ki kell zárni azokat a szaruhártyákat, amelyek opacitása a kezdeti egyórás ekvilibrációs időszak elteltével hét opacitásegységnél nagyobb (MEGJEGYZÉS: az opacimétert az opacitási egységek meghatározásához használt opacitásetalonnal kell kalibrálni, lásd a 3. függeléket).

20. Minden kezelt csoportnak (a vizsgált anyaggal és a negatív és a pozitív kontrollanyaggal kezelt csoportnak egyaránt) legalább három szemből kell állnia. A BCOP vizsgálatban a negatív kontroll céljára három szaruhártyát kell felhasználni. Mivel a szaruhártyák a teljes szemgolyóból kivágással kerülnek eltávolításra, majd pedig rögzítésre kerülnek a szaruhártyakamrában, fennáll annak a veszélye, hogy a különböző műveletek befolyásolják az egyes szaruhártyák (a negatív kontrollt is ideértve) opacitás- és permeabilitásértékét. Figyelembe veendő még az is, hogy az IVIS számítása során a vizsgált anyaggal és a pozitív kontrollanyaggal kezelt szaruhártyák opacitás- és permeabilitásértékeinek korrekciója a negatív kontrollanyaggal kezelt szaruhártyák opacitás- és permeabilitásértékeinek felhasználásával történik.

ELJÁRÁS

A szemek előkészítése

21. Az ép szaruhártyákat a későbbi kezelés elősegítése érdekében preparáljuk úgy, hogy a szaruhártya körül 2–3 mm-es perem maradjon, ügyelve arra, hogy a szaruhártya fel- és belhámja ne sérüljön. A preparált szaruhártyákat felerősítjük az erre a célra kialakított, a szaruhártya felhámja elé kerülő elülső, illetve belhámja elé kerülő hátsó kamrából álló szaruhártyatartókra. Mindkét kamrát (a hátsó kamrával kezdve) teljesen feltöltjük előmelegített Eagle-féle tápfolyadékkal (Eagle's Minimum Essential Medium, a továbbiakban: EMEM oldat), ügyelve a buborékképződés megelőzésére. A berendezést ezt követően 32 ± 1 °C-on legalább egy órán át ekvilibráljuk annak érdekében, hogy a szaruhártyák a közeggel kiegyenlítődjenek, és lehetőség szerint elérjék normális metabolikus aktivitásukat (a szaruhártya felületének hőmérséklete *in vivo* 32 °C).

22. Az ekvilibrációs idő eltelte után mindét kamrát új EMEM oldattal feltöltjük, és minden egyes szaruhártyán leolvassuk a kiindulási opacitásértéket. A vizsgálatból ki kell zárni a makroszkopikus szöveti károsodást (például karcolásokat, elszíneződést, rendellenes érburjánzást) mutató és a 7-nél nagyobb opacitású szaruhártyákat. Kiszámítjuk valamennyi ekvilibrált szaruhártya opacitásának számtani közepét. A negatív kontroll céljára legalább három olyan szaruhártyát kell kiválasztani, amelynek opacitása az összes szaruhártyán mért opacitásértékek mediánjának közelében van. A megmaradó szaruhártyákat ezt követően kezelt csoportra és pozitív kontrollcsoportra osztjuk.

▼M2

23. Mivel a víz fajhője nagyobb, mint a levegőé, a víz stabilabb hőmérsékleti viszonyokat biztosít az inkubáláshoz. Ezért a szaruhártyatartó és tartalmának 32 ± 1 °C hőmérsékleten való tartására vízfürdő használata ajánlott. A hőmérséklet állandóságának biztosítását szolgáló óvintézkedések (például a tartók és a közeg előmelegítése) mellett azonban használható levegős inkubátor is.

A vizsgált anyag felvitele

24. Két eltérő kezelési protokoll használatos, az egyik a folyadékok és a szilárd és a folyékony felületaktív anyagok, a másik pedig a nem felületaktív szilárd anyagok esetében.

25. A folyadékok vizsgálata hígítatlan állapotban, a felületaktív anyagoké 10 vegyes százalék (m/V) koncentrációban, 0,9 %-os nátrium-klorid oldattal, desztillált vízzel vagy más olyan oldószerrel készített oldatban történik, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra. A félszilárd anyagok, krémek és gyanták vizsgálata rendszerint a folyadékokra vonatkozó protokoll szerint történik. Ha a hígítás koncentrációja ettől eltérő, akkor azt megfelelően meg kell indokolni. A szaruhártyákat a folyadéknak vagy felületaktív anyagnak 10 percig kell kitenni. Ettől eltérő behatási idő alkalmazását tudományos szempontból megfelelően meg kell indokolni.

26. A nem felületaktív szilárd anyagok vizsgálata 20 % koncentrációban, 0,9 %-os nátrium-klorid-oldattal, desztillált vízzel vagy más olyan oldószerrel készült oldat vagy szuszpenzió formájában történik, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra. A szilárd anyagok bizonyos körülmények között és megfelelő tudományos indokolással hígítatlanul, a szaruhártya felületére a nyitott kamrás módszerrel (lásd a 29. pontot) való közvetlen felvitellel is vizsgálhatók. A szaruhártyát a szilárd anyagnak négy órán át kell kitenni, de a folyadékok és a felületaktív anyagok esetéhez hasonlóan – tudományos szempontú megfelelő indokolással – más behatási idő is alkalmazható.

27. A vizsgált anyag fizikai jellegétől és kémiai jellemzőitől (pl. szilárd anyag vagy folyadék, viszkózus vagy nem viszkózus folyadék) függően más felviteli módok is alkalmazhatók. A legfontosabb annak biztosítása, hogy a vizsgált anyag megfelelően beborítsa a felhám felületét, valamint hogy azt az öblítési lépések során megfelelően eltávolítsuk. A nem és a kissé viszkózus folyadékok esetében rendszerint a zárt kamrás, míg a közepes és a nagy viszkozitású folyadékok, illetve a szilárd anyagok esetében rendszerint a nyitott kamrás módszer használatos.

28. A zárt kamrás módszer esetében az elülső kamrába a szaruhártya felhámjának befedéséhez elegendő mennyiségű (750 µl) vizsgált anyagot kell a kamra tetején található adagolónyílásokon keresztül bevinni, majd az expozíció idejére a nyílásokat a kamradugaszokkal le kell zárni. Fontos annak biztosítása, hogy valamennyi szaruhártya megfelelő ideig legyen kitéve a vizsgált anyagnak.

29. A nyitott kamrás módszer esetében a kezelés előtt levesszük az elülső kamra ablakzáró gyűrűjét és az ablaknyílás üvegét. A kontrollanyagot vagy a vizsgált anyagot (750 µl vagy a szaruhártya teljes befedéséhez szükséges mennyiségben) mikropipettával közvetlenül a szaruhártya felhámjának felületére visszük fel. Ha a vizsgált anyagot nehezen lehet pipettába felszívni, akkor az adagolás megkönnyítésére finnpipettába pumpálható. A finnpipetta hegyét behelyezzük a fecskendő adagolójába, hogy az anyagot nyomás alatt lehessen befecskendezni a hegybe. A fecskendő dugattyúját a pipetta szelepének felfelé húzásával egyidejűleg benyomjuk. Ha a pipetta hegyében légbuborékok jelennek meg, a vizsgálati anyagot el kell távolítani (ki kell nyomni) és a műveletet mindaddig ismételni kell, amíg a pipetta hegye légbuborékok nélkül feltelik. Szükség esetén normál fecskendő is használható (tű nélkül), mivel ez lehetővé teszi a vizsgált anyag pontos mérését és a szaruhártya felhámjának felületére való egyszerű felvitelét. Az adagolást követően a zárt rendszer visszaállítása érdekében az ablaknyílás üvegét vissza kell szerelni az elülső kamrára.

▼M2

Inkubáció a behatást követően

30. A behatási idő elteltével a vizsgált anyagot vagy negatív vagy pozitív kontrollanyagot kivesszük az elülső kamrából, és a felhámot legalább háromszor (de legalább a vizsgált anyag látható nyomainak teljes eltávolításáig) fenolvörös indikátort tartalmazó EMEM oldattal lemossuk. Az öblítéshez azért kell fenolvörös indikátort tartalmazó közeget használni, mert a fenolvörös indikátor színváltozásának megfigyelésével ellenőrizhető a savas és a lúgos anyagok leöblítésének eredményessége. A szaruhártyát háromnál többször is le kell mosni, ha a fenolvörös indikátor még mindig elszíneződik (sárgára vagy lilára) vagy ha a vizsgált anyag még mindig látható. A közeg vizsgált anyagtól való megtisztítását követően a szaruhártyákat még egyszer le kell mosni EMEM oldattal (mely ekkor fenolvörös indikátort már nem tartalmaz). Az utolsó öblítéshez azért kell fenolvörös indikátort nem tartalmazó EMEM oldatot használni, mert így biztosítható az opacitásmérés előtt a fenolvörös indikátornak az elülső kamrából való eltávolítása. Ezt követően az elülső kamrát – fenolvörös indikátor bekeverése nélkül – ismételten feltöltjük új EMEM oldattal.

31. Folyadékok és felületaktív anyagok esetében a szaruhártyákat az öblítést követően legalább további két órán át 32 ± 1 °C hőmérsékleten inkubálni kell. Bizonyos körülmények között hasznos lehet hosszabb utóinkubációs időt alkalmazni, amiről eseti alapon kell dönteni. A szilárd anyagokkal kezelt szaruhártyákat a négyórás behatási idő végén alaposan le kell öblíteni, utóinkubáció azonban nem szükséges.

32. Folyadékok és felületaktív anyagok esetében az utóinkubáció végén, nem felületaktív szilárd anyagok esetében a négyórás behatási idő elteltével minden egyes szaruhártya opacitását és permeabilitását feljegyezzük. Egyben minden szaruhártyát szemrevételezéssel is megvizsgálunk, és az esetleges észrevételeket (pl. szövetleválás, vizsgált anyag maradéka, egyenetlen fényáteresztési minták) feljegyezzük. Ezek a megfigyelések fontosak lehetnek, mert befolyásolhatják az opaciméteren leolvasott értékeket.

Kontrollanyagok

33. Minden vizsgálatban párhuzamosan negatív vagy oldószeres/vivőanyagos kontrollt és pozitív kontrollt is kell végezni.

34. Hígítatlan folyadékok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése és a vizsgálat végpontjaiban figyelembe veendő kiindulási értékek meghatározása céljából a BCOP vizsgálatban párhuzamos negatív kontrollanyagot (például 0,9 %-os nátrium-klorid oldatot vagy desztillált vizet) kell alkalmazni. A negatív kontrollanyag alkalmazása egyben azt is biztosítja, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást.

35. Hígított folyadékok, felületaktív anyagok és szilárd anyagok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése és a vizsgálat végpontjaiban figyelembe veendő kiindulási értékek meghatározása céljából a BCOP vizsgálatban párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollt kell alkalmazni. Csak olyan oldószer, illetőleg vivőanyag alkalmazható, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra.

36. Annak ellenőrzése érdekében, hogy a kiváltott hatás valóban megfelelő-e, a vizsgálatnak mindig tartalmaznia kell egy ismerten szemirritációt okozó anyaggal végzett párhuzamos pozitív kontrollvizsgálatot is. Mivel a BCOP vizsgálat célja a szemkorróziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása, a pozitív kontrollanyagnak ideális esetben olyan referenciaanyagnak kell lennie, amely ebben a vizsgálatban súlyos hatást vált ki. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, az irritatív hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

37. Folyékony vizsgált anyagok esetében pozitív kontrollanyagként például dimetil-formamid vagy 1 %-os nátrium-hidroxid alkalmazható. Szilárd vizsgált anyagok esetében pozitív kontrollanyagként például 0,9 %-os nátrium-klorid-oldathoz 20 vegyes százalék (m/V) koncentrációban adagolt imidazol alkalmazható.

▼M2

38. A referenciaanyagok jól használhatók egy adott vegyianyag- vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

Mért végpontok

39. Az opacitást a szaruhártyán átbocsátott fény mennyiségének mérésével határozzuk meg. A szaruhártya opacitásának kvantitatív mérése opaciméterrel történik, amely a mért opacitásértéket folyamatos skálán mutatja.

40. A permeabilitás meghatározása a szaruhártya összes sejtrétegén (azaz a szaruhártya külső felületén a felhámtól a szaruhártya belső felületén a belhámig) áthatoló fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérésével történik. A szaruhártyatartónak a felhám elé kerülő elülső kamráját 1 ml (folyadék vagy felületaktív anyag vizsgálata esetében 4 mg/ml, nem felületaktív szilárd anyag vizsgálata esetében 5 mg/ml) fluoreszcein-nátrium-oldattal, a belhám elé kerülő hátsó kamrát pedig új EMEM oldattal feltöltjük. A tartót ezt követően vízszintes helyzetben 90 ± 5 percig 32 ± 1 °C hőmérsékleten inkubáljuk. A hátsó kamrába áthatoló fluoreszcein-nátrium mennyiségének mérése ultraibolya- és látható fényes fényspektroszkópiás eljárással történik. Az eljárás keretében folyamatos skálán meg kell határozni és fel kell jegyezni a 490 nm-hez tartozó optikai sűrűségek (OD_{490}) vagy abszorbanciák értékét. A fluoreszceines mérés keretében a permeabilitásértékeket a szabványos 1 cm-es fényút alkalmazásával, a látható fényes fényspektroszkópiával mért OD_{490} értékek alapján kell meghatározni.

41. Az előzőekben leírt módszer alternatívájaképpen 96 lyukú mikrotiterlemez-olvasó is alkalmazható azzal a feltétellel, hogy (i) a fluoreszceines OD_{490} értékek meghatározásához megállapítható a lemezolvasó lineáris tartománya, és (ii) a 96 lyukú lemezbe annyi fluoreszceinmintát teszünk, amennyi ahhoz szükséges, hogy az így meghatározott OD_{490} értékek megegyezzenek a szabványos 1 cm-es fényúttal mért értékekkel (ehhez gyakran teljesen [általában 360 ml-rel] feltöltött lyukak szükségesek).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az adatok kiértékelése

42. Azt követően, hogy az opacitás- és az átlagos permeabilitásértékeket (OD_{490}) a háttéropacitás, illetve a negatív kontroll OD_{490} permeabilitásértékeinek figyelembevételével korrigáltuk, az egyes kezelt csoportok átlagos opacitás- és átlagos OD_{490} permabilitásértékeit egy kísérleti úton származtatott összefüggés segítségével kezelt csoportonként egyetlen jelzőszámmá, az *in vitro* irritációs pontszámmá (IVIS) alakítjuk:

$$\text{IVIS} = \text{átlagopacitás} + (15 \times \text{OD}_{490}\ \text{átlagpermeabilitás}).$$

Sina et al. (16) szerint ezt az összefüggést belső és laboratóriumközi vizsgálatok keretében dolgozták ki. Egy több laboratóriumban 36 anyagon elvégzett vizsgálatsorozat adatain többváltozós analízist hajtottak végre azon összefüggés meghatározása végett, amely az *in vivo* és az *in vitro* adatok között a legjobb illeszkedést biztosítja. Ezt az analízist két különböző cég kutatói is elvégezték, és csaknem azonos összefüggésre jutottak.

43. Az opacitás- és a permeabilitásértékeket egymástól függetlenül is ki kell értékelni annak meghatározására, hogy a vizsgált anyag a korróziót vagy a súlyos irritációt nem csak a két végpont egyikében váltotta-e ki (lásd a döntési kritériumokat).

▼M2

Döntési kritériumok

44. Korróziót vagy súlyos irritációt okozónak kell tekinteni azt az anyagot, amelyre IVIS ≥ 55,1 adódik. Mint az 1. pontban láttuk, ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozónak, akkor a besorolás és a címkézés céljára további vizsgálatokat kell végezni. A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból származó, az EPA (1), az EU (2) vagy a GHS (3) besorolási rendszer szerint osztályozott adatokkal összehasonlítva a BCOP vizsgálat általános pontossága 79 % (113/143) és 81 % (119/147) között, hamis pozitív aránya 19 % (20/103) és 21 % (22/103) között, hamis negatív aránya pedig 16 % (7/43) és 25 % (10/40) között van. Ha az adatbázisból egyes meghatározott kémiai (alkoholok, ketonok) vagy fizikai (szilárd anyagok) osztályokat kizárunk, akkor az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerben a BCOP vizsgálat pontossága 87 % (72/83) és 92 % (78/85), hamis pozitív aránya 12 % (7/58) és 16 % (9/56), hamis negatív aránya pedig 0 % (0/27) és 12 % (3/26) közé kerül.

45. Ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja is szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozónak, a BCOP vizsgálat adatai – a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatból vagy megfelelően validált más *in vitro* vizsgálatból származó adatokkal együtt – jól használhatók annak további meghatározásában, hogy a BCOP vizsgálat mennyire és milyen korlátokkal alkalmas a nem súlyos irritációt okozó, illetve az irritációt nem okozó anyagok azonosítására (jelenleg folyik egy útmutató elkészítése az in vitro szemtoxicitás-vizsgálati módszerekre vonatkozóan).

A vizsgálat elfogadási kritériumai

46. A vizsgálat akkor elfogadható, ha a pozitív kontrollanyaghoz tartozó IVIS érték az aktuális (legalább háromhavonta, illetőleg az ilyen vizsgálatot havi egy alkalomnál ritkábban végző laboratóriumok esetében minden elfogadható vizsgálat után aktualizált) történeti átlagtól legfeljebb a szórás kétszeresének megfelelő mértékben tér el. A negatív kontrollanyagon és az oldószeren/vivőanyagon megfigyelt hatásokhoz tartozó opacitás- és permeabilitásértékeknek kisebbnek kell lenniük az adott negatív kontrollanyaggal vagy oldószerrel/vivőanyaggal kezelt szarvasmarha-szaruhártyára megállapított felső háttéropacitás- és háttérpermeabilitás-korlátnál.

Vizsgálati jegyzőkönyv

47. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

Vizsgált anyag és kontrollanyagok

Kémiai név (nevek): a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti szerkezeti név, ezt követően az egyéb ismert nevek, ha vannak

A CAS szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám), ha ismert

Az anyag vagy keverék tisztasága és összetétele (tömegszázalékban), a rendelkezésre álló információknak megfelelően

Fizikai-kémiai tulajdonságok: halmazállapot, illékonyság, pH, stabilitás, kémiai osztály, vízben való oldhatóság, ha a vizsgálat szempontjából relevánsak

A vizsgált anyag és a kontrollanyagok kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés)

Stabilitás, ha ismert

▼M2

A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai

A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe

A szemek beszerzési helyének (a létesítmény, ahonnan származnak) megjelölése

A szemek tárolásának és szállításának körülményei (pl. a szemek begyűjtésének napja és időpontja, a vizsgálat megkezdéséig eltelt idő, a szállítóeszköz és a hőmérsékleti viszonyok, az alkalmazott antibiotikumok)

Azon egyedek jellemzői, amelyekből a szemek származnak (pl. a donorállat életkora, neme, tömege), ha rendelkezésre állnak

Az alkalmazott vizsgálati módszer és protokoll indokolása

A vizsgálati módszer integritása

A vizsgálati módszer időbeli integritásának (például pontosságának, megbízhatóságának) biztosítására alkalmazott módszer (például jártassági tesztanyagokon végzett időszakos vizsgálatok, negatív és pozitív történeti kontrolladatok felhasználása)

A vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai

Az elfogadható párhuzamos pozitív és negatív kontrolladatok tartománya a történeti adatok alapján

Az elfogadható párhuzamos referencia-kontrolltartományok a történeti adatok alapján, szükség szerint

Vizsgálati körülmények

Az alkalmazott vizsgálati elrendezés leírása

Az alkalmazott szaruhártyatartó típusa

Az opacitás és a permeabilitás mérésére használt műszerek (pl. opaciméter és spektroszkóp) kalibrálási adatai

A felhasznált szarvasmarha-szaruhártya adatai, megállapítások a minőségükre vonatkozóan

Az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei

A vizsgált anyagok alkalmazott koncentrációja (koncentrációi)

A vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása

Utalás a modellel kapcsolatos történeti adatokra (pl. negatív és pozitív kontrollanyagok, jártassági tesztanyagok, referenciaanyagok)

Az alkalmazott értékelési kritériumok leírása

Eredmények

A megvizsgált minták adatai egyenként, táblázatos formában (pl. a vizsgált anyag, a pozitív, a negatív és a referencia-kontrollanyag [ha volt] opacitás- és OD_{490} értékei táblázatos formában, ideértve az esetleg megismételt azonos mérések adatait, valamint az egyes mérések középértékeit és szórásait is)

A megfigyelt egyéb jelenségek leírása

Az eredmények szöveges elemzése

Következtetések

IRODALOM

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: US Environmental Protection Agency.

▼**M2**

(2) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

(3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban:

[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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Elektronikus formátumban:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről, HL L 396., 2006.12.30., 1. o.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Elektronikus formátumban:

[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. In: 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 Centre for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban:

[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, Italy: 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. Elektronikus formátumban:

[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 Test Method. Elektronikus formátumban:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.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. Elektronikus formátumban:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

▼M2

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: A vizsgálati eredmény és az elfogadott referenciaérték közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer hatékonyságát mutatja, és alkalmazhatóságának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket.

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: (i) állandó és megbízható beszerzési forrással vagy forrásokkal kell rendelkeznie; (ii) a vizsgált anyagosztályhoz hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; (iii) ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; (iv) rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és (v) a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Szaruhártya: A szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

Szaruhártya opacitása: A szaruhártyának a vizsgált anyaggal való behatást követő átlátszatlanságát leíró jellemző. Az opacitás megnövekedése a szaruhártya károsodását jelzi. Az opacitás értékelése történhet szubjektív módon (mint például a nyulakon végzett Draize-féle szemvizsgálatban) vagy objektív módszerrel (műszerrel, például opaciméterrel).

Szaruhártya permeabilitása: A szaruhártya felhámjának károsodását leíró számadat; meghatározása a szaruhártya összes sejtrétegén áthatoló fluoreszcein-nátrium festékanyag mennyiségének mérése alapján történik.

EPA szerinti 1. kategória: Szemkorrózió (visszafordíthatatlan pusztulás a szem szöveteiben) vagy 21 napnál hosszabb ideig fennálló szaruhártya-elváltozás vagy -irritáció (1).

EU szerinti R41. kategória: A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (2).

Hamis negatív arány: A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív anyagok részaránya. A hamis negatív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

Hamis pozitív arány: A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív anyagok részaránya. A hamis pozitív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): Anyagoknak és keverékeknek a fizikai, egészségi és környezeti veszélyek szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkaadók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse az anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (3).

▼M2

GHS szerinti 1. kategória: A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (3).

Veszély: Anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy élő szervezettel, rendszerrel vagy (al)populációval való találkozásakor káros hatásokat képes előidézni.

***In vitro* irritációs pontszám (IVIS):** A BCOP vizsgálatban alkalmazott, kísérleti úton származtatott összefüggés, amely az egyes kezelt csoportok opacitásának és permeabilitásának középértékeit minden egyes kezelt csoportra egyetlen *in vitro* pontszám formájában fejezi ki. IVIS = átlagopacitás + (15 x átlagpermeabilitás).

Negatív kontroll: A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen rendszer. Ez a minta összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapítható, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

Szemirritációt nem okozó anyag: Az EPA szerinti I., II. vagy III., az EU szerinti R41. vagy R36., illetve a GHS szerinti 1., 2.A. vagy 2.B. kategóriába nem tartozó anyag.

Szemkorróziót okozó anyag: (a) A szemben visszafordíthatatlan szövetkárosodást okozó anyag; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába tartozó, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

Szemirritációt okozó anyag: (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása visszafordítható elváltozást okoz; (b) az EPA szerinti II. vagy III., az EU szerinti R36., illetve a GHS szerinti 2.A. vagy 2.B. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

Súlyos szemirritációt okozó anyag: (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása a behatást követően 21 napon belül nem gyógyuló szövetkárosodást okoz vagy a látás súlyos fizikai romlását okozza; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

Opaciméter: A szaruhártya fényátbocsátását kvantitatív módon értékelő, a szaruhártya opacitásának mérésére alkalmazott műszer. Rendszerint két kamrából áll, amelyek mindegyike saját fényforrással és fotocellával van ellátva. Az egyik kamrában helyezkedik el a kezelt szaruhártya, míg a másik a műszer kalibrálására és alaphelyzetbe állítására szolgál. Egy kontrollrekeszt (folyadékkal nem töltött üres kamra ablakok nélkül) halogénlámpa fényével átvilágítanak, a fényt fotocellával érzékelik, és ezt összevetik a szaruhártyát tartalmazó kamrát magában foglaló vizsgálati rekeszen átvezetett, a fotocellával érzékelt fénnyel. A fotocellák segítségével mért fényerősségek összehasonlításából adódó számszerű opacitásérték digitális kijelzőn jelenik meg.

Pozitív kontroll: A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt rendszer. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, a hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

▼M2

Megbízhatóság: Vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatósága ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumok közötti megismételhetőség kiszámításával történik.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó kezeletlen rendszer, amely összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapíthatók az ugyanazon oldószerben oldott vagy vivőanyaggal felvitt vizsgált anyag kiindulási értékei. E kontroll negatív kontrollal elvégzett párhuzamos vizsgálatával az is megállapítható, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

Többszintű vizsgálat: Olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgált anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintjük, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének mérlegelésével meghatározzuk, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi besorolásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

Validált vizsgálati módszer: Olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága ellenőrző vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást.

Az adatok bizonyító erejének mérlegelése: Az a folyamat, amelynek során az adott anyag veszélyességével kapcsolatban rendelkezésre álló érveket és ellenérveket a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából részletesen áttekintjük.

▼M2

2. függelék

Jártassági tesztanyagok a BCOP vizsgálathoz

Az e vizsgálati módszerre támaszkodó vizsgálati módszerek rutinszerű alkalmazásának megkezdése előtt célszerű lehet, ha a laboratórium az 1. táblázat szerinti tíz anyagon ellenőrzi a szemkorróziót okozó anyagok azonosításában való technikai jártasságát. Ezen anyagok kiválasztása úgy történt, hogy a nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatok (TG 405.) alapján a lokális szemirritáció/szemkorrózió (ENSZ GHS szerinti 1., 2.A. és 2.B. kategória, valamint a „nem besorolt és címkézett” kategória) szempontjából reprezentatívak legyenek (3) (7). Azonban e vizsgálatok validált alkalmazási körét (kizárólag a szemkorróziót, illetőleg súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) figyelembe véve besorolási célból a jártasság igazolása csak két vizsgálati kimenetelre (szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó, illetve szemkorróziót, illetve súlyos szemirritációt nem okozó) értelmezhető. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, kiváló minőségű in vivo referenciaadatok álljanak rájuk vonatkozóan rendelkezésre, és kiváló minőségű referenciaadatok álljanak rendelkezésre abból a két in vitro vizsgálati módszerből is, amelyek tekintetében folyik a vizsgálati útmutató kidolgozása. Ennek megfelelően az anyagok az ICCVAM által az in vitro szemtoxicitási vizsgálati módszer validálásához ajánlott 122 irritatív referenciaanyagból kerültek kiválasztásra (lásd Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances) (5). A referenciaadatok megtalálhatók a BCOP vizsgálatra és az izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszerre (ICE vizsgálat) vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (17) (18).

1. táblázat

Ajánlott tesztanyagok a BCOP vizsgálatban való technikai jártasság ellenőrzéséhez

Anyag	CASRN	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* besorolás ([2])	*In vitro* besorolás ([3])
Benzalkonium-klorid (5 %)	8001-54-5	Óniumvegyület	Folyadék	1. kategória	Szemkorróziót /súlyos irritációt okozó
Klórhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Szilárd	1. kategória	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt okozó
Dibenzoil-L-borkősav	2743-38-6	Karbonsav, észter	Szilárd	1. kategória	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt okozó
Imidazol	288-32-4	Heterociklikus	Szilárd	1. kategória	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt okozó
Triklórecetsav (30 %)	76-03-9	Karbonsav	Folyadék	1. kategória	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt okozó
2,6-Diklórbenzoil-klorid	4659-45-4	Savhalogenid	Folyadék	2.A. kategória	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt nem okozó
Etil-2-metilaceto-acetát	609-14-3	Keton, észter	Folyadék	2.B. kategória	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt nem okozó
Ammónium-nitrát	6484-52-2	Szervetlen só	Szilárd	2.A. kategória	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt nem okozó

▼**M2**

Anyag	CASRN	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* besorolás ([2])	*In vitro* besorolás ([3])
Glicerin	56-81-5	Alkohol	Folyadék	Nem címkézett	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt nem okozó
n-Hexán	110-54-3	Szénhidrogén (aciklikus)	Folyadék	Nem címkézett	Szemkorróziót /súlyos szemirritációt nem okozó

Rövidítések: CASRN = a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

([1]) A kémiai osztály meghatározása standard besorolási rendszer alkalmazásával, a National Library of Medicine „Medical Subject Headings” (MeSH) elnevezésű besorolási rendszere alapján (elektronikus formátumban: http//www.nlm.nih.gov/mesh címen) történt.

([2]) A nyulakon végzett in vivo szemvizsgálat (OECD TG 405) eredményei alapján és az ENSZ GHS felhasználásával (3) (7).

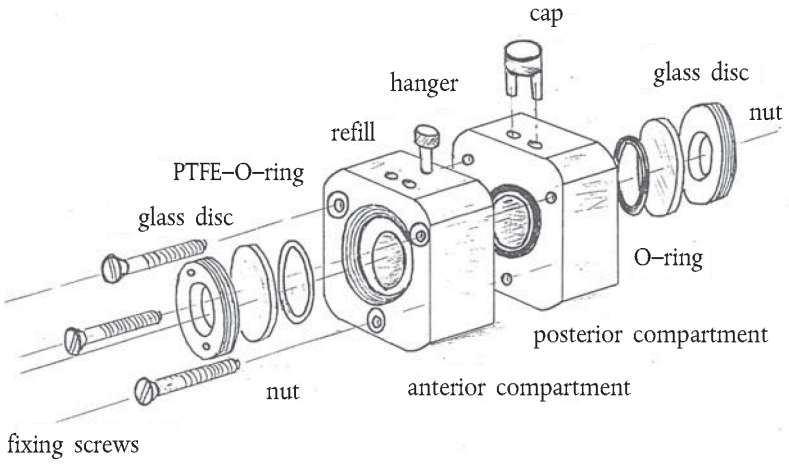
([3]) BCOP- és ICE-eredmények alapján.

▼M2

3. függelék

SZARUHÁRTYATARTÓ A BCOP VIZSGÁLATHOZ

1. A BCOP vizsgálathoz alkalmazott szaruhártyatartó inert anyagból (például polipropilénből) készül. A tartók két részből (elülső és hátsó kamrából) állnak, és két, egymáshoz hasonló hengeres belső kamrával rendelkeznek. Mindkét kamra 5 ml térfogatú és üvegablakban végződik, amelyen keresztül az opacitást mérik. Mindkét belső kamra átmérője 1,7 cm, mélysége 2,2 cm. ([1]) A szivárgás megelőzésére a hátsó kamrában egy tömítőgyűrű található. A szaruhártyákat a belhámi oldalukkal lefelé kell a hátsó kamra tömítőgyűrűjére fektetni, majd az elülső kamrákat a szaruhártyák felhámi oldalára kell elhelyezni. A kamrákat a kamrák külső peremén található három, korrózióálló acélból készült csavar rögzíti. Az egyes kamraházak végén üvegablak található, amely a szaruhártyához való könnyebb hozzáférés érdekében eltávolítható. A szivárgás megelőzésére az üvegablak és a kamra között is van egy tömítőgyűrű. Mindegyik kamra tetején két nyílás található, amelyen keresztül betölthető és üríthető a közeg és a vizsgált anyag. A kezelési és az inkubációs időszak alatt ezeket a nyílásokat gumikupak zárja le.



Szószedet

Glass disc: Üveglemez

PTFE-O-ring: PTFE tömítőgyűrű

Refill: Töltőnyílás

Hanger: Rögzítőelem

Cap: Kupak

Nut: Csavaranya

O-ring: Tömítőgyűrű

Posterior compartment: Hátsó kamra

Anterior compartment: Elülső kamra

Fixing screws: Rögzítőcsavarok

([1]) A megadott méretek 12–60 hónapos tehenekhez használt szaruhártyatartókon alapulnak. 6–12 hónapos egyedek esetében a tartót úgy kell kialakítani, hogy mindkét kamra térfogata 4 ml, a belső kamrák átmérője 1,5 cm, mélysége pedig 2,2 cm legyen. Új típusú szaruhártyatartók esetében nagyon fontos, hogy a vizsgált anyagnak kitett szaruhártyafelület és a hátsó karma térfogatának hányadosa megegyezzen a hagyományos szaruhártyatartó hasonló adatával. Ez azért szükséges, hogy az IVIS javasolt képletébe beírandó permeabilitásértékek helyesen legyenek meghatározva.

▼**M2**

AZ OPACIMÉTER

2. Az opaciméter a fényátbocsátás mérésére szolgáló műszer. Egy kontrollrekeszt (folyadékkal nem töltött üres kamra ablakok nélkül) halogénlámpa fényével átvilágítanak, a fényt fotocellával érzékelik, és ezt összevetik a szaruhártyát tartalmazó kamrát magában foglaló vizsgálati rekeszen átvezetett, a fotocellával érzékelt fénnyel. A fotocellák segítségével mért fényerősségek összehasonlításából adódó számszerű opacitásérték digitális kijelzőn jelenik meg. Ennek alapján történik az opacitásegységek megállapítása.

3. Az opaciméternek az előrejelző modellben leírt különféle besorolásokhoz tartozó határértékek által kijelölt tartományokban (vagyis a szemkorróziót, illetve a súlyos irritatív hatást meghatározó határértékig) lineáris viselkedést kell tanúsítania. Annak érdekében, hogy a leolvasások 75–80 opacitásegységig lineárisak és pontosak legyenek, az opacimétert több kalibrátorral kell kalibrálni. A kalibrátorokat (opálos poliészter lapokat) a kalibrációs kamrába (a kalibrátorok tartására átalakított szaruhártyakamrába) kell helyezni, és leolvasást kell végezni az opaciméteren. A kalibrációs kamrákat úgy kell kialakítani, hogy a kalibrátorok a fényforrástól és a fotocellától ugyanolyan távolságra helyezkedjenek el, mint a szaruhártyák az opacitásmérés során. Az opacimétert először üres kalibrációs kamrával a zérus opacitásegységre kell kalibrálni. A három különböző kalibrátort ezután egyenként be kell helyezni a kalibrációs kamrába, és mérni kell az opacitást. Az első, a második és a harmadik kalibrátor behelyezésekor rendre az előre beállított 75, 150 és 225 (± 5 % tűrés) opacitásegységet kell tudni leolvasni.

▼M2

B.48. IZOLÁLT CSIRKESZEM VIZSGÁLATÁN ALAPULÓ VIZSGÁLATI MÓDSZER A SZEMKORRÓZIÓT ÉS A SÚLYOS SZEMIRRITÁCIÓT OKOZÓ ANYAGOK AZONOSÍTÁSÁRA

BEVEZETÉS

1. Az izolált csirkeszem vizsgálatán alapuló vizsgálati módszer (a továbbiakban: ICE vizsgálat) olyan in vitro vizsgálati módszer, amely bizonyos körülmények között és bizonyos korlátok mellett felhasználható anyagok és vegyületek „szemkorróziót és súlyos szemirritációt okozóként" történő besorolására (1) (2) (3). E vizsgálati módszer alkalmazásában súlyos szemirritációt okozó anyagok azok az anyagok, amelyek a nyulak esetében a felvitelt követően legalább 21 napon át tartó szemléziókat okoznak. Noha a vizsgálat nem váltja ki teljes mértékben a nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatot, az ICE vizsgálat alkalmazása a szabályozói követelmények szerinti besorolás és címkézés egy adott alkalmazási területen történő meghatározására szolgáló, többszintű vizsgálati stratégia részeként ajánlott (4) (5). A vizsgálatban pozitív eredményt adó vizsgált anyagok és keverékek (6) nyulakon végzett további vizsgálatok nélkül „szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó" besorolást kaphatnak. Azokat az anyagokat, amelyek vizsgálata negatív eredményt adott, az OECD 405. vizsgálati iránymutatásában (e melléklet B.5. fejezete) (7) leírtak szerint lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával nyulakon végzett további vizsgálatoknak kell alávetni.

2. E vizsgálati módszer célja a vizsgált anyag szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó esetleges hatásának kimutatása annak alapján, hogy a csirkéből eltávolított csirkeszemben milyen mértékben vált ki toxikus hatást. A szaruhártyára gyakorolt toxikus hatások jellemzése (i) az opacitás kvalitatív értékelésével, (ii) a szembe juttatott fluoreszcein következtében bekövetkező felhámkárosodás (fluoreszcein-visszatartás) kvalitatív értékelésével, (iii) a megvastagodás (felduzzadás) kvantitatív mérésével és (iv) a felület makroszkopikus morfológiai károsodásának kvalitatív értékelésével történik. A szaruhártya vizsgált anyagnak való expozícióját követően megállapítható szaruhártya-opacitást, felduzzadást és károsodást különkülön jellemezzük, majd ezekből a jellemzőkből együttesen származtatjuk az ún. szemirritációs osztályt.

3. Az ICE vizsgálattal 21 napnál rövidebb idő alatt gyógyuló szemléziókat kiváltó szemirritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagokat is vizsgáltak. Az ezekbe a kategóriákba tartozó anyagok tekintetében azonban nem történt meg az ICE vizsgálat pontosságának és megbízhatóságának formális értékelése.

4. A fogalommeghatározások az 1. függelékben találhatók.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

5. E vizsgálati módszer alapja az alternatív módszerek validálásával foglalkozó ügynökségközi koordinációs bizottság (ICCVAM) ICE vizsgálati protokollja (8), amelynek kidolgozása az alternatív módszerek validálásával foglalkozó európai, illetve japán központ (ECVAM, JaCVAM), valamint a hollandiai TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology kutatószervezet részvételével végrehajtott nemzetközi validációs vizsgálat (4) (5) (9) alapján történt. A protokoll alapját publikált protokollokból származó információk, valamint a protokoll alkalmazása kapcsán a TNO-nál szerzett tapasztalatok képezik (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. A módszer azonosított korlátai az alkoholok esetében tapasztalt hamis pozitív arányokon és a szilárd és a felületaktív anyagok esetében tapasztalt hamis negatív arányon alapulnak (lásd a 47. pontot) (4). Ha az említett kémiai és fizikai osztályokba tartozó anyagokat kizárjuk az adatbázisból, akkor az ICE vizsgálat pontossága az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerében egyaránt jelentősen javul (4). A vizsgálat célját (azaz kizárólag a szemkorróziót, illetve súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) is figyelembe véve a hamis negatív arányok jelentősége nem kritikus, hiszen az érintett anyagokat a szabályozói követelményektől függően – az adatok bizonyító erejének mérlegelésével, lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával – később nyulakon vagy más, megfelelően validált in vitro vizsgálatokkal is megvizsgálják. Emellett a jelenleg rendelkezésre álló validációs adatbázis nem teszi lehetővé egyes kémiai osztályok vagy termékcsoportok (például a keverékek) megfelelő értékelését. A vizsgálat végrehajtója azonban a vizsgálati módszer alkalmazását valamennyi típusú anyag vizsgálata esetében (beleértve a keverékeket is) fontolóra veheti, a pozitív eredmény ugyanis ilyenkor is elfogadható lehet a szemkorrózió, illetve a súlyosan irritatív hatás jelzésére. Az alkoholok esetében azonban a kapott pozitív eredményeket a túlzó előrejelzés kockázata miatt óvatosan kell értelmezni.

7. A csirkeszemmel végzett valamennyi eljárás során be kell tartani a vizsgáló intézménynek az emberi és az állati eredetű anyagok – ideértve többek között a szöveteket és a szöveti folyadékokat – kezelésére vonatkozó rendelkezéseit és eljárásait. Ajánlott továbbá követni az általános laboratóriumi óvintézkedéseket is (15).

8. A vizsgálati módszernek korlátja, hogy noha figyelembe vesz egyes szemre gyakorolt, a nyulakon végzett szemirritációs vizsgálatban elemzett hatásokat, illetve bizonyos fokig azok súlyosságát is, nem veszi figyelembe a kötőhártya- és az íriszsérüléseket. Másrészről, noha maga az ICE vizsgálat nem alkalmas a szaruhártya-léziók visszafordíthatóságának értékelésére, a nyulakon végzett szemvizsgálatok alapján korábban javasolták, hogy a szaruhártya-sérülés kezdeti mélységének értékelése alkalmas lehet a visszafordíthatatlan és a visszafordítható hatások megkülönböztetésére (16). Végezetül az ICE vizsgálat nem alkalmas a szembe kerülés következtében fellépő szisztémás toxicitási potenciál megítélésére.

9. Továbbra is folyik a munka az ICE vizsgálat nem súlyos irritációt okozó, illetve irritációt nem okozó anyagok azonosítására való használhatósága, valamint korlátai részletesebb leírása érdekében (lásd még a 48. pontot is). A felhasználókat bátorítjuk arra, hogy mintáikat és/vagy adataikat küldjék meg a validáló szervezeteknek, ezzel ugyanis segíthetik az ICE vizsgálat jövőbeli felhasználásainak (ideértve a nem súlyos szemirritációt okozó, illetve a szemirritációt nem okozó anyagok azonosítását is) formális értékelését.

10. Minden olyan laboratóriumnak, amely a vizsgálatot először alkalmazza, a 2. függelékben felsorolt jártassági tesztanyagok felhasználásával ajánlatos meggyőződnie felkészültségéről. Mielőtt a laboratórium az ICE vizsgálat adatait a szabályozói követelmények szerinti veszélyességi besorolás céljaira rendelkezésre bocsátaná, e vegyi anyagok vizsgálatával demonstrálhatja a BCOP vizsgálat elvégzésében való jártasságát.

A VIZSGÁLAT ELVE

11. Az ICE vizsgálat olyan organotipikus módszer, amely rövid távon in vitro fenntartja a csirkeszem működését. A módszerrel a vizsgált anyag által okozott károsodás jellemzése a szaruhártya felduzzadásának, opacitásának és károsodásának értékelése útján történik. Míg e két utóbbi paraméter kvalitatív értékelést igényel, a szaruhártya felduzzadásának jellemzése kvantitatív módszerrel történik. A mérési eredményeket vagy kvantitatív pontszámmá transzformáljuk, amely az átfogó jellemzést adó irritációs index kiszámításához szükséges, vagy kvalitatív jellemzés formájában fejezzük ki, amely a vizsgált anyag in vitro szemkorróziót és súlyos szemirritációt okozó hatású anyagként történő besorolására szolgál. Ezt követően e két eredmény bármelyike felhasználható a vizsgált anyag in vivo szemkorróziót és súlyos szemirritációt okozó hatásának előrejelzésére (lásd a döntési kritériumokat).

▼M2

A csirkeszemek származása és életkora

12. A múltban a vizsgálathoz vágóhídról beszerzett, emberi fogyasztás céljából leölt csirkékből nyert szemeket használtak, ami biztosította, hogy nem kellett laboratóriumi állatokat tartani. Csak az emberi élelmiszerláncba való bekerülésre alkalmas, egészséges állatokból nyert szemek használhatóak fel.

13. Bár a csirkék optimális életkorának meghatározása céljából nem végeztek átfogó ellenőrzött vizsgálatot, a vizsgálat céljára igénybe vett csirkék életkora és tömege a hagyományosan vágóhídra kerülő vágócsirkék életkorának és tömegének felel meg (kb. 7 hetes, 1,5–2,5 kg tömegű csirkék).

A szemek begyűjtése és beszállítása a laboratóriumba

14. A csirke elkábítását (mely rendszerint elektromos sokkal történik) és a nyak kivéreztetési célú bemetszését követően a fejet azonnal el kell távolítani. Annak érdekében, hogy a csirkefejeket a vágóhídról a károsodás és/vagy bakteriális fertőzés megelőzéséhez szükséges gyorsasággal a laboratóriumba lehessen szállítani, a laboratórium közelében helyi beszerzési forrást célszerű találni. A fejek begyűjtése és a szemeknek az ICE vizsgálatban való felhasználása között eltelt időnek a lehető legrövidebbnek kell lennie (mindennek rendszerint két órán belül meg kell történnie), és igazolni kell, hogy ez az idő nem befolyásolja a vizsgálat eredményeit, azaz a szemek kiválasztási kritériumait, valamint a pozitív és negatív kontrollminták eredményeit. A vizsgálatban felhasznált valamennyi szemnek egy meghatározott napon begyűjtött szemállományból kell származnia.

15. Mivel a szemeknek a fejből való kimetszése a laboratóriumban történik, az egész fejeket szobahőmérsékleten, izotóniás sóoldattal nedvesített törülközőkkel párásított műanyag dobozokban kell a vágóhídról a laboratóriumba szállítani.

Az ICE vizsgálatban felhasznált szemek kiválasztási kritériumai

16. A vizsgálatból ki kell zárni azokat a szemeket, amelyek esetében a kivételt követően nagy (0,5-nél nagyobb) a fluoreszceines foltosodás kiindulási értéke vagy a szaruhártya-opacitási pontszám.

17. Minden kezelt csoportnak és pozitív kontrollcsoportnak legalább három szemből kell állnia. A negatív, illetve – ha az oldószer nem sóoldat – az oldószeres kontrollcsoportnak legalább egy szemből kell állnia.

ELJÁRÁS

A szemek előkészítése

18. A szemhéjat óvatosan bemetsszük, ügyelve arra, hogy elkerüljük a szaruhártya sérülését. Ezután a szaruhártya épségét a szaruhártya felületére néhány másodpercre felvitt, majd izotóniás sóoldattal leöblített, egy cseppnyi 2 vegyes százalékos (m/V) fluoreszcein-nátrium alkalmazásával gyorsan értékeljük. A fluoreszceinnel kezelt szemeket ezután réslámpás mikroszkóppal megvizsgáljuk, és ellenőrizzük, hogy a szaruhártya nem sérült-e meg (a fluoreszcein-visszatartási és a szaruhártya-opacitási pontszám legfeljebb 0,5 lehet).

19. Ha a szem sérüléstől mentes, akkor eltávolítjuk a koponyából, ügyelve arra, hogy elkerüljük a szaruhártya sérülését. A szemgolyót – a pislogóhártyát sebészeti csipesszel feszesen tartva – kihúzzuk a szemüregből, és a szemizmokat tompa hegyű hajlított ollóval átvágjuk. Fontos, hogy ne fejtsünk ki olyan erős nyomást, amely károsíthatja a szaruhártyát (nyomásos szövetelváltozás következhet be).

20. Amikor a szemet a szemüregből eltávolítjuk, a szemidegből egy szabad szemmel is jól látható részt rajta hagyunk. A szemet a szemüregből való eltávolítást követően nedvszívó párnára helyezzük, majd levágjuk róla a pislogóhártyát és az egyéb kötőszöveteket.

▼M2

21. A kivett szemet korrózióálló acél csíptetőre erősítjük úgy, hogy a szaruhártya függőleges helyzetben legyen. A csíptetőt ezt követően behelyezzük a szuperfúziós készülék egyik kamrájába (16). A csíptetőt a szuperfúziós készülékben úgy kell elhelyezni, hogy az izotóniás sóoldat cseppjei a teljes szaruhártyát érjék. A szuperfúziós készülék kamráinak hőmérsékletét 32 ± 1,5 °C-on kell tartani. A 3. függelék bemutatja a szuperfúziós készülék jellemző kialakítását és a szemcsíptetőket; ezek az eszközök kereskedelmi forgalomban is kaphatók, de saját használatra is megépíthetők. A készülék az egyes laboratóriumok igényeinek (például a vizsgálandó szemek számának) megfelelően módosítható.

22. A szemeket a szuperfúziós készülékbe való behelyezés után ismét megvizsgáljuk réslámpás mikroszkóppal annak ellenőrzésére, hogy az előkészítés során nem sérültek-e meg. A réslámpás mikroszkóp mélységmérőjével ekkor a szaruhártya legmagasabb pontján megmérjük a szaruhártya vastagságát is. Nem vizsgálhatók tovább azok a szemek, (i) amelyeknek fluoreszcein-visszatartási pontszáma 0,5-nél nagyobb, (ii) amelyeknek szaruhártya-opacitása 0,5-nél nagyobb, valamint (iii) amelyek a károsodás bármely további jelét mutatják. Az e szempontok alapján ki nem zárt szemek közül ki kell zárni mindazokat, amelyek szaruhártya-vastagsága az összes szem középértékétől 10 %-kal nagyobb mértékben eltér. A felhasználóknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a réslámpás mikroszkópok különböző résbeállítások esetén eltérő szaruhártya-vastagságot adhatnak. A résszélességet 0,095 mm-re kell állítani.

23. Valamennyi szem megvizsgálása és jóváhagyása után a szemeket körülbelül 45–60 percig inkubálni kell annak érdekében, hogy a vizsgálandó anyag felvitele előtt a rendszerrel ekvilibrálódjanak. Az ekvilibrációs idő eltelte után fel kell jegyezni a kiindulási (azaz a zérus időpillanatban érvényes) szaruhártya-vastagságot és opacitást. A fluoreszcein-visszatartás végpontban kiindulási értékként az előkészítéskor meghatározott fluoreszcein-pontszámot kell figyelembe venni.

A vizsgált anyag felvitele

24. A kiindulási referenciamérések után a szemeket (tartójukkal együtt) azonnal ki kell venni a szuperfúziós készülékből, vízszintes helyzetbe kell hozni, majd fel kell vinni a vizsgált anyagot a szaruhártyára.

25. A folyadékokat általában hígítatlan állapotban vizsgáljuk, de szükség esetén (például ha a vizsgálat leírása így rendelkezik) hígítás is alkalmazható. Hígítás esetén lehetőleg fiziológiás sóoldatot alkalmazunk. Ellenőrzött körülmények között másféle oldószer is használható, a fiziológiás sóoldattól eltérő oldószerek megfelelőségét azonban külön igazolni kell.

26. A folyékony vizsgált anyagot úgy visszük fel a szaruhártya felületére , hogy a szaruhártya teljes felületét egyenletesen beborítsa. A szabványos térfogat 0,03 ml.

27. A szilárd anyagokat lehetőleg dörzscsészében, mozsárban vagy hasonló őrlőeszközben a lehető legfinomabbra őröljük. A port úgy visszük fel a szaruhártya felületére, hogy a vizsgált anyag egyenletesen fedje azt be. A szabványos mennyiség 0,03 g.

28. A vizsgált anyagot (akár folyékony, akár szilárd) 10 másodpercig hagyjuk hatni, majd szobahőmérsékleten leöblítjük kb. 20 ml izotóniás sóoldattal. Ezt követően a szemet (tartójával együtt) az eredeti függőleges helyzetben visszahelyezzük a szuperfúziós készülékbe.

Kontrollanyagok

29. Minden vizsgálatban párhuzamosan negatív vagy oldószeres/vivőanyagos kontrollt és pozitív kontrollt is kell végezni.

▼M2

30. Hígítatlan folyadékok és szilárd anyagok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése céljából és annak biztosítására, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást, az ICE vizsgálatban párhuzamos negatív kontrollanyagként fiziológiás sóoldatot kell alkalmazni.

31. Hígított folyadékok vizsgálatakor a vizsgálati elrendezés esetleges nem jellemző változásainak észlelése céljából és annak biztosítására, hogy a vizsgálat körülményei ne eredményezzenek tévesen irritatív hatást, az ICE vizsgálatban párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollt kell alkalmazni. A 25. pontnak megfelelően csak olyan oldószer, illetőleg vivőanyag alkalmazható, amely igazoltan nem gyakorol káros hatást a vizsgálatra.

32. Annak ellenőrzése érdekében, hogy a kiváltott hatás valóban megfelelő-e, a vizsgálatnak mindig tartalmaznia kell egy ismerten szemirritációt okozó anyaggal végzett párhuzamos pozitív kontrollvizsgálatot is. Mivel az ICE vizsgálat célja a szemkorróziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása, a pozitív kontrollanyagnak olyan referenciaanyagnak kell lennie, amely ebben a vizsgálatban súlyos hatást vált ki. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, az irritatív hatás nem lehet túlságosan erőteljes. A pozitív kontrollanyagra vonatkozóan megfelelő mennyiségű in vitro adatot kell létrehozni úgy, hogy meghatározható legyen a pozitív kontrollanyag statisztikailag meghatározott elfogadható tartománya. Ha egy adott pozitív kontrollanyagra vonatkozóan nincs elegendő korábbi adat az ICE vizsgálat alkalmazásából, akkor ezen adatok előállításához külön vizsgálatok lehetnek szükségesek.

33. Folyékony vizsgált anyagok esetében pozitív kontrollanyagként például 10 %-os ecetsav vagy 5 %-os benzalkónium-klorid, szilárd vizsgált anyagok esetében például nátrium-hidroxid vagy imidazol alkalmazható.

34. A referenciaanyagok jól használhatók egy adott vegyianyag- vagy termékosztályba tartozó ismeretlen vegyi anyagok szemirritációs hatásának értékelésére vagy valamely szemirritációs anyag relatív irritatív hatásának az irritatív hatás egy adott tartományán belüli értékelésére.

Mért végpontok

35. A kezelt szaruhártyákat a kezelés előtt, majd a kezelést követő leöblítés után 30, 75, 120, 180 és 240 perc (± 5 perc) elteltével értékeljük. Ezek az időpontok a négyórás behatási időn belül megfelelő mennyiségű mérést adnak, miközben a mérések között elegendő idő áll rendelkezésre valamennyi szem szükséges vizsgálatának elvégzéséhez.

36. Az értékelt végpontok: a szaruhártya opacitása, felduzzadása, fluoreszcein-visszatartása és morfológiai elváltozásai (például a felhám benyomódása vagy fellazulása). A fluoreszcein-visszatartás kivételével (amelyet csak a kezelés előtt és a vizsgált anyagnak való expozíció után 30 perccel határozunk meg) minden végpontot valamennyi fenti időpontban meg kell határozni.

37. A szaruhártya opacitásának, fluoreszcein-visszatartásának, morfológiai elváltozásainak és – ha vizsgáljuk – hisztopatológiájának dokumentálására ajánlott fényképeket készíteni.

38. A négy óra elteltével végrehajtott utolsó vizsgálatot követően ajánlatos a szemeket az esetleges hisztopatológiai vizsgálathoz megfelelő fixálóban (például semleges pufferolt formalinban) tartani.

▼M2

39. A szaruhártya felduzzadását a réslámpás mikroszkóp optikai pachométerével végzett szaruhártyavastagság-mérésekből határozzuk meg. A felduzzadást százalékban fejezzük ki, és a következő képletből, a mért szaruhártya-vastagságok felhasználásával számítjuk (a képletben t_c a vizsgált időpillanathoz, t_{c0} pedig a $t = 0$ időpillanathoz tartozó szaruhártya-vastagságot jelenti):

$$\left[\frac{\textit{szaruhártya} - \textit{vastagság a vizsgált időpillanatban} - \textit{szaruhártya} - \textit{vastagság a zérus időpillanatban}}{\textit{szaruhártya} - \textit{vastagság a zérus időpillanatban}}\right] \times 100$$

40. Minden megfigyelési időpontban meghatározzuk az összes vizsgált szem szaruhártya-felduzzadásának középértékét. Az összes időpontban megfigyelt szaruhártyafelduzzadás-középértékek maximuma alapján minden vizsgált anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot rendelünk.

41. A szaruhártya-opacitási pontszámot a szaruhártya legsűrűbben opálos területe alapján kell megállapítani. Minden megfigyelési időpontban meghatározzuk az összes vizsgált szem szaruhártya-opacitásának középértékét. Az összes időpontban megfigyelt szaruhártyaopacitás-középértékek maximuma alapján minden vizsgált anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot rendelünk (1. táblázat).

1. táblázat

Szaruhártya-opacitási pontszámok

Pontszám	Megfigyelés
0	Nincs opálosodás
0,5	Nagyon halvány opálosodás
1	Szórt vagy zavaros területek; az írisz részletei tisztán kivehetőek
2	Könnyen észrevehető áttetsző terület; az írisz részletei kissé elmosódottak
3	Súlyos szaruhártya-opálosodás; az írisznek egyetlen részlete sem vehető ki, a pupilla mérete alig érzékelhető
4	A szaruhártya teljes opálosodása; az írisz nem látható

42. Kizárólag a 30 perc elteltével végzett megfigyelés alkalmával meghatározzuk az összes szem fluoreszcein-visszatartásának középértékét, és ennek alapján minden vizsgált anyaghoz átfogó jellemzést adó pontszámot rendelünk (2. táblázat).

2. táblázat

Fluoreszcein-visszatartási pontszámok

Pontszám	Megfigyelés
0	Nincs fluoreszcein-visszatartás
0,5	Igen csekély mértékű, egysejtes foltosodás
1	Egysejtes foltosodás elszórtan a szaruhártya kezelt felületén
2	Fokális vagy egybefüggő, sűrű egysejtes foltosodás
3	A szaruhártya nagy egybefüggő területei tartanak vissza fluoreszceint

▼M2

43. A morfológiai elváltozások között megemlítendő a szaruhártya felhámsejtjeinek „benyomódása”, a felhám „fellazulása”, a szaruhártya felületének „érdesedése” és a vizsgált anyag „feltapadása” a szaruhártya felületére. Ezek a megfigyelések különböző súlyosságúak lehetnek, és egyidejűleg is előfordulhatnak. A megfigyelések besorolása a vizsgálatot végző személy szubjektív megítélésétől függ.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Az adatok értékelése

44. A szaruhártya opacitását, felduzzadását és fluoreszcein-visszatartását külön-külön értékeljük, és az egyes végpontokhoz külön-külön ICE-osztályt állapítunk meg. Ezt követően az egyes végpontokhoz tartozó ICE-osztályok együttes figyelembevételével meghatározzuk az egyes vizsgált anyagok irritációs besorolását.

Döntési kritériumok

45. Az egyes végpontok értékelését követően az ICE-osztályok megállapítását előre meghatározott tartományok alapján végezzük. A szaruhártya-vastagság (3. táblázat), az opacitás (4. táblázat) és a fluoreszcein-visszatartás (5. táblázat) jellemzése a következő skálákon, négy ICE-osztály figyelembevételével történik:

3. táblázat

A szaruhártya-vastagság besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

Szaruhártya-felduzzadás középértéke (%) (*)	ICE-osztály
0-tól 5-ig	I.
5-nél nagyobb, 12-ig	II.
12-nél nagyobb, 18-ig (a kezelés után több mint 75 perccel)	II.
12-nél nagyobb, 18-ig (a kezelés után legfeljebb 75 perccel)	III.
18-nál nagyobb, 26-ig	III.
26-nál nagyobb, 32-ig (a kezelés után több mint 75 perccel)	III.
26-nál nagyobb, 32-ig (a kezelés után legfeljebb 75 perccel)	IV.
32 felett	IV.

(*) A szaruhártya-felduzzadás pontszámai csak akkor érvényesek, ha a vastagság mérése I. sz. mélységmérővel felszerelt Haag-Streit BP900 réslámpás mikroszkóppal és 9½-re (0,095 mm) állított résszélességgel történt. A felhasználóknak tisztában kell lenniük azzal, hogy a réslámpás mikroszkópok különböző résbeállítás esetén eltérő szaruhártya-vastagságot adhatnak.

4. táblázat

Az opacitás besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

A maximális opacitáspontszámok középértéke (*)	ICE-osztály
0,0–0,5	I.
0,6–1,5	II.
1,6–2,5	III.
2,6–4,0	IV.

(*) Lásd az 1. táblázatot.

▼**M2**

5. táblázat

A fluoreszcein-visszatartás középértékének besorolási kritériumai az ICE vizsgálatban

Fluoreszcein-visszatartás középértéke a kezelés után 30 perccel (*)	ICE-osztály
0,0–0,5	I.
0,6–1,5	II.
1,6–2,5	III.
2,6–3,0	IV.

(*) Lásd a 2. táblázatot.

46. A vizsgált anyag általános in vitro irritációs besorolását a szaruhártya opacitása, felduzzadása és fluoreszcein-visszatartása alapján meghatározott kategóriák alapján, a 6. táblázatban bemutatott séma szerint állapítjuk meg.

6. táblázat

Összesített in vitro irritációs besorolás

Besorolás	A három végpont kombinációi
Szemkorróziót / súlyos szemirritációt okozó anyag	3 × IV. 2 × IV., 1 × III. 2 × IV., 1 × II. (*) 2 × IV., 1 × I. (*) 30 percnél a szaruhártya opacitása legalább 3 (legalább két szem esetében) Bármely időpontban a szaruhártya opacitása 4 (legalább két szem esetében) A felhám súlyos fellazulása (legalább egy szem esetében)

(*) Kevésbé valószínű kombinációk.

47. Mint az 1. pontban láttuk, ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozónak, akkor a besorolás és a címkézés céljára további vizsgálatokat kell végezni. A nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatból származó, az EPA (1), az EU (2) vagy a GHS (3) besorolási rendszer szerint osztályozott adatokkal összehasonlítva az ICE vizsgálat általános pontossága a szemkorróziót és a súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása tekintetében 83 % (120/144) és 87 % (134/154) között, hamis pozitív aránya 6 % (7/122) és 8 % (9/116) között, hamis negatív aránya pedig 41 % (13/32) és 50 % (15/30) között van. Ha az adatbázisból egyes meghatározott kémiai (alkoholok, felületaktív anyagok) és fizikai (szilárd anyagok) osztályokat kizárunk, akkor az EU, az EPA és a GHS besorolási rendszerben az ICE vizsgálat pontossága 91 % (75/82) és 92 % (69/75), hamis pozitív aránya 5 % (4/73) és 6 % (4/70), hamis negatív aránya pedig 29 % (2/7) és 33 % (3/9) közé kerül (4).

48. Ha a vizsgált anyagot a vizsgálat nem mutatja is szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozónak, az ICE vizsgálat adatai – a nyulakon végzett in vivo szemvizsgálatból vagy megfelelően validált más in vitro vizsgálatból származó adatokkal együtt – jól használhatók annak további meghatározásában, hogy az ICE vizsgálat mennyire és milyen korlátokkal alkalmas a nem súlyos irritációt okozó, illetve az irritációt nem okozó anyagok azonosítására (jelenleg folyik egy útmutató elkészítése az in vitro szemtoxicitás-vizsgálati módszerekre vonatkozóan).

▼M2

A vizsgálat elfogadási kritériumai

49. A vizsgálat akkor elfogadható, ha a szemirritáció szempontjából az egyidejű negatív vagy vivőanyagos/oldószeres kontroll irritációt nem okozónak, az egyidejű pozitív kontroll súlyos irritációt /korróziót okozónak bizonyul.

Vizsgálati jegyzőkönyv

50. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

Vizsgált anyag és kontrollanyagok

Kémiai név (nevek): a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti szerkezeti név, ezt követően az egyéb ismert nevek, ha vannak

A CAS szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám), ha ismert

Az anyag vagy keverék tisztasága és összetétele (tömegszázalékban), a rendelkezésre álló információknak megfelelően

Fizikai-kémiai tulajdonságok: halmazállapot, illékonyság, pH, stabilitás, kémiai osztály, vízben való oldhatóság, ha a vizsgálat szempontjából relevánsak

A vizsgált anyag és a kontrollanyagok kezelése a vizsgálatot megelőzően, ha történt ilyen (pl. melegítés, őrlés)

Stabilitás, ha ismert

A megbízó és a vizsgálatot végző laboratórium adatai

A megbízó, a vizsgálatot végző laboratórium és a vizsgálatvezető neve és címe

A szemek beszerzési helyének (pl. a létesítmény, ahonnan származnak) megjelölése

A szemek tárolásának és szállításának körülményei (pl. a szemek begyűjtésének napja és időpontja, a vizsgálat megkezdéséig eltelt idő)

Azon egyedek jellemzői, amelyekből a szemek származnak (pl. a donorállat életkora, neme, tömege), ha rendelkezésre állnak

Az alkalmazott vizsgálati módszer és protokoll indokolása

A vizsgálati módszer integritása

A vizsgálati módszer időbeli integritásának (például pontosságának, megbízhatóságának) biztosítására alkalmazott módszer (például jártassági tesztanyagokon végzett időszakos vizsgálatok, negatív és pozitív történeti kontrolladatok felhasználása)

A vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai

Az elfogadható párhuzamos referencia-kontrolltartományok a történeti adatok alapján, szükség szerint

Vizsgálati körülmények

Az alkalmazott vizsgálati elrendezés leírása

Az alkalmazott réslámpás mikroszkóp (pl. modellszám)

Az alkalmazott réslámpás mikroszkóp beállításai

A felhasznált csirkeszemek adatai, megállapítások a minőségükre vonatkozóan

▼**M2**

Az alkalmazott vizsgálati eljárás részletei

A vizsgált anyagok alkalmazott koncentrációja (koncentrációi)

A vizsgálati eljárás bármilyen változtatásának leírása

Utalás a modellel kapcsolatos történeti adatokra (pl. negatív és pozitív kontrollanyagok, jártassági tesztanyagok, referenciaanyagok)

Az alkalmazott értékelési kritériumok leírása

Eredmények

A megfigyelt egyéb jelenségek leírása

A szemekről készült fényképek (ha vannak)

Az eredmények szöveges elemzése

Következtetések

IRODALOM

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: US Environmental Protection Agency.

(2) Az Európai Parlament és a Tanács 1272/2008/EK rendelete (2008. december 16.) az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353, 2008.12.31., 1. o.

(3) United Nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(6) Az Európai Parlament és a Tanács 1907/2006/EK rendelete (2006. december 18.) a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/-EGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről, HL L 396, 2006.12.30., 1. o.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Elektronikus formátumban:

[http://www.oecd.org/document/40/0, 2340, en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: 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. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban:

[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). Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_ice.htm]

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe IrritantsIsolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Elektronikus formátumban:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/-ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: A vizsgálati eredmény és az elfogadott referenciaérték közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer hatékonyságát mutatja, és alkalmazhatóságának egyik szempontja. A kifejezés gyakran használatos az „egyezés” szó megfelelőjeként, amely arra utal, hogy egy adott vizsgálat milyen arányban szolgáltat helyes eredményeket.

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: (i) állandó és megbízható beszerzési forrással vagy forrásokkal kell rendelkeznie; (ii) a vizsgált anyagosztályhoz hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; (iii) ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; (iv) rendelkezésre kell állnia az ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és (v) a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Szaruhártya: A szemgolyó elülső részén az íriszt és a pupillát fedő és a szem belsejébe a fényt bevezető, áttetsző rész.

Szaruhártya opacitása: A szaruhártyának a vizsgált anyaggal való behatást követő átlátszatlanságát leíró jellemző. Az opacitás megnövekedése a szaruhártya károsodását jelzi.

Szaruhártya felduzzadása: Az ICE vizsgálatban a szaruhártyának a vizsgált anyaggal való érintkezését követő felpuffadása mértékét objektív módon jellemző érték. Százalékban fejezzük ki, és a szaruhártya-vastagság kiindulási (a vizsgált anyag felvitele előtti) értékéből és az ICE vizsgálat során a vizsgált anyagnak való expozíciót követően rendszeres időközönként végzett mérésekből számítjuk. A szaruhártya felduzzadásának foka jelzi a szaruhártya károsodásának mértékét.

EPA szerinti 1. kategória: Szemkorrózió (a szem szöveteiben visszafordíthatatlan pusztulást okoz) vagy 21 napnál hosszabb ideig fennálló szaruhártya-elváltozás vagy -irritáció (1).

EU szerinti R41. kategória: A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (2).

Hamis negatív arány: A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen negatívnak minősített pozitív anyagok részaránya. A hamis negatív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

Hamis pozitív arány: A vizsgálati módszer alkalmazása során tévesen pozitívnak minősített negatív anyagok részaránya. A hamis pozitív arány a vizsgálati módszer hatékonyságának egyik mutatója.

Fluoreszcein-visszatartás: Az ICE vizsgálatban a szaruhártya felhámsejtjeiben a vizsgált anyagnak való expozíciót követően visszatartott fluoreszcein-nátrium mennyiségét szubjektív módon jellemző adat. A fluoreszcein-visszatartás foka utal a szaruhártyafelhám károsodásának mértékére.

GHS (a vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének globálisan harmonizált rendszere): Anyagoknak és keverékeknek a fizikai, egészségi és környezeti kockázatok szabványosított típusai és szintjei szerinti osztályokba sorolására és megfelelő kommunikációs elemekkel (például piktogramokkal, figyelmeztetésekkel, figyelmeztető mondatokkal, óvintézkedésekre vonatkozó mondatokkal és biztonsági adatlapokkal) történő jelölésére javaslatokat megfogalmazó rendszer, amelynek célja, hogy az emberek (köztük a munkaadók, a munkavállalók, a fuvarozók, a fogyasztók és a sürgősségi segélyszolgálatok) és a környezet megóvása érdekében egységesítse az anyagok káros hatásaira vonatkozó információk továbbítását (3).

▼M2

GHS szerinti 1. kategória: A vizsgált anyagnak a szem külső felületére való juttatását követően olyan szövetkárosodás kialakulása vagy a látás olyan súlyos fizikai romlása, amely a behatást követően 21 napon belül nem fordítható vissza teljes mértékben (3).

Veszély: Anyag vagy helyzet azon sajátossága, hogy élő szervezettel, rendszerrel vagy (al)populációval való találkozásakor káros hatásokat képes előidézni.

Negatív kontroll: A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó kezeletlen rendszer. Ez a minta összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapítható, hogy az oldószer kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

Szemirritációt nem okozó anyag: Az EPA szerinti I., II. vagy III., az EU szerinti R41. vagy R36., illetve a GHS szerinti 1., 2.A. vagy 2.B. kategóriába nem tartozó anyag (1) (2) (3).

Szemkorróziót okozó anyag: (a) A szemben visszafordíthatatlan szövetkárosodást okozó anyag; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába tartozó, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

Szemirritációt okozó anyag: (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása visszafordítható elváltozást okoz; (b) az EPA szerinti II. vagy III., az EU szerinti R36., illetve a GHS szerinti 2.A. vagy 2.B. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

Súlyos szemirritációt okozó anyag: (a) Olyan anyag, amelynek a szem külső felületére való behatása a behatást követően 21 napon belül nem visszafordítható szövetkárosodást okoz vagy a látás súlyos fizikai romlását okozza; (b) a GHS szerinti 1., az EPA szerinti I. vagy az EU szerinti R41. kategóriába besorolt, szemirritációt okozó anyag (1) (2) (3).

Pozitív kontroll: A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét tartalmazó, ismert pozitív hatást kiváltó anyaggal kezelt rendszer. Annak érdekében azonban, hogy a pozitív kontrollvizsgálatban jelentkező hatás időbeli változása is megfigyelhető legyen, a hatás nem lehet túlságosan erőteljes.

Megbízhatóság: Vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatósága ugyanazon protokoll alkalmazása mellett. Megállapítása a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság, valamint a laboratóriumok közötti megismételhetőség kiszámításával történik.

Réslámpás mikroszkóp: A szem binokuláris mikroszkóp nagyítása alatti, álló sztereoszkópiás kép alkotásával történő közvetlen vizsgálatára alkalmazott műszer. Az ICE vizsgálatban a műszert a csirkeszem elülső szerkezeteinek, illetve a mélységmérő tartozékkal a szaruhártya vastagságának objektív mérésére használjuk.

Oldószeres/vivőanyagos kontroll: A vizsgálati elrendezés valamennyi alkotóelemét az oldószerrel vagy vivőanyaggal együtt tartalmazó kezeletlen rendszer, amely összevethető a vizsgált anyaggal kezelt mintákkal és más kontrollmintákkal, és ennek alapján megállapíthatók az ugyanazon oldószerben oldott vagy vivőanyaggal felvitt vizsgált anyag kiindulási értékei. E kontroll negatív kontrollal elvégzett párhuzamos vizsgálatával az is megállapítható, hogy az oldószer vagy vivőanyag kölcsönhatásba lép-e a vizsgálati elrendezéssel.

▼M2

Többszintű vizsgálat: Olyan lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amelynek keretében a vizsgált anyagra vonatkozó valamennyi információt meghatározott sorrendben áttekintjük, és az egyes szinteken az adatok bizonyító erejének mérlegelésével meghatározzuk, hogy a következő szintre való továbblépés előtt a veszélyességi besorolásra vonatkozó döntéshez elegendő információ áll-e rendelkezésre. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján megállapítható, további vizsgálatra nincs szükség. Ha a vizsgált anyag irritatív hatása a rendelkezésre álló információk alapján nem állapítható meg, több lépcsőben egymás után állatkísérleteket kell végezni mindaddig, amíg az egyértelmű besorolás meg nem állapítható.

Validált vizsgálati módszer: Olyan vizsgálati módszer, amelynek az adott céllal kapcsolatos relevanciája (pontosságát is ideértve) és megbízhatósága ellenőrző vizsgálatok alapján megállapítást nyert. Fontos megjegyezni, hogy a validált vizsgálati módszer a javasolt felhasználási célra nem feltétlenül kínál megfelelő pontosságú és megbízhatóságú elfogadható eljárást.

Az adatok bizonyító erejének mérlegelése: Az a folyamat, amelynek során az adott anyag veszélyességével kapcsolatban rendelkezésre álló érveket és ellenérveket a megfelelő következtetés levonása és alátámasztása céljából részletesen áttekintjük.

▼M2

2. függelék

JÁRTASSÁGI TESZTANYAGOK AZ ICE VIZSGÁLATHOZ

Az e vizsgálati módszerre támaszkodó vizsgálati módszerek rutinszerű alkalmazásának megkezdése előtt célszerű lehet, ha a laboratórium az 1. táblázat szerinti tíz anyagon ellenőrzi a szemkorróziót okozó anyagok azonosításában való technikai jártasságát. Ezen anyagok kiválasztása úgy történt, hogy a nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálatok (TG 405.) alapján a lokális szemirritáció/szemkorrózió (ENSZ GHS szerinti 1., 2.A. és 2.B. kategória, valamint a „nem besorolt és címkézett” kategória) szempontjából reprezentatívak legyenek (3) (7). Azonban e vizsgálatok validált alkalmazási körét (kizárólag a szemkorróziót, illetőleg súlyos szemirritációt okozó anyagok azonosítása) figyelembe véve besorolási célból a jártasság igazolása csak két vizsgálati kimenetelre (szemkorróziót vagy súlyos szemirritációt okozó, illetve szemkorróziót, illetve súlyos szemirritációt nem okozó) értelmezhető. A kiválasztás másik kritériuma az volt, hogy az anyagok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők legyenek, kiváló minőségű *in vivo* referenciaadatok álljanak rájuk vonatkozóan rendelkezésre, és kiváló minőségű referenciaadatok álljanak rendelkezésre abból a két in vitro vizsgálati módszerből is, amelyek tekintetében folyik a vizsgálati útmutató kidolgozása. Ennek megfelelően az anyagok az ICCVAM által az in vitro szemtoxicitási vizsgálati módszer validálásához ajánlott 122 irritatív referenciaanyagból kerültek kiválasztásra (lásd Appendix H: ICCVAM Recommended Reference Substances List) (4). A referenciaadatok megtalálhatók a szarvasmarha-szaruhártya opacitásának és permeabilitásának mérésén alapuló vizsgálati módszerre (BCOP vizsgálat) és az ICE vizsgálatra vonatkozó ICCVAM-háttérdokumentumokban (18) (19).

1. táblázat

Ajánlott tesztanyagok az ICE vizsgálatban való technikai jártasság ellenőrzéséhez

Vegyi anyag	CASRN	Kémiai osztály ([1])	Halmazállapot	*In vivo* besorolás ([2])	*In vitro* besorolás ([3])
Benzalkonium-klorid (5 %)	8001-54-5	Óniumvegyület	Folyadék	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó
Klórhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Szilárd	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó
Dibenzoil-L-borkősav	2743-38-6	Karbonsav, észter	Szilárd	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó
Imidazol	288-32-4	Heterociklikus	Szilárd	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó
Triklórecetsav (30 %)	76-03-9	Karbonsav	Folyadék	1. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt okozó
2,6-Diklórbenzoil-klorid	4659-45-4	Savhalogenid	Folyadék	2.A. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt nem okozó
Etil-2-metilaceto-acetát	609-14-3	Keton, észter	Folyadék	2.B. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt nem okozó
Ammónium-nitrát	6484-52-2	Szervetlen só	Szilárd	2.A. kategória	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt nem okozó

▼**M2**

Vegyi anyag	CASRN	Kémiai osztály (1)	Halmazállapot	*In vivo* besorolás (2)	*In vitro* besorolás (3)
Glicerin	56-81-5	Alkohol	Folyadék	Nem címkézett	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt nem okozó
n-Hexán	110-54-3	Szénhidrogén (aciklikus)	Folyadék	Nem címkézett	Szemkorróziót/súlyos szemirritációt nem okozó

Rövidítések: CASRN\; =\; a Chemical Abstracts Service (CAS) szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám).

(1) A kémiai osztály meghatározása standard besorolási rendszer alkalmazásával, a National Library of Medicine „Medical Subject Headings” (MeSH) elnevezésű besorolási rendszere alapján (elektronikus formátumban: http//www.nlm.nih.gov/mesh címen) történt.

(2) A nyulakon végzett *in vivo* szemvizsgálat (OECD TG 405) eredményei alapján és az ENSZ GHS felhasználásával (3) (7).

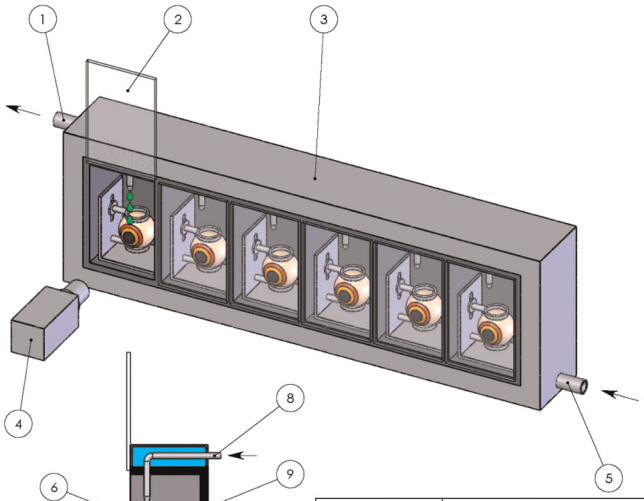
(3) BCOP- és ICE-eredmények alapján.

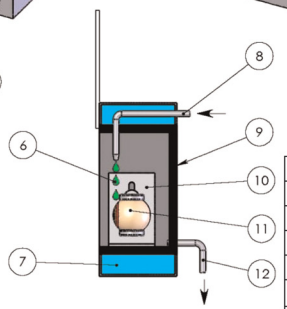
▼M2

3. Függelék

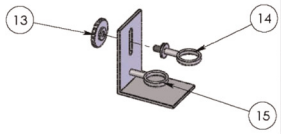
Szuperfúziós készülék és szemcsíptető az ICE vizsgálathoz

(A szuperfúziós készülék és a szemcsíptető további általános leírását lásd: Burton et al. (17))





KAMRA KERESZTMETSZETE



SZEMTARTÓ

SORSZÁM	MEGNEVEZÉS
1	MELEGVÍZ-KIFOLYÓNYÍLÁS
2	CSÚSZÓAJTÓ
3	SZUPERFÚZIÓS KÉSZÜLÉK
4	OPTIKAI MÉRŐMŰSZER
5	MELEGVÍZ-BEFOLYÓNYÍLÁS
6	SÓOLDAT
7	MELEG VÍZ
8	SÓOLDAT-BEFOLYÓNYÍLÁS
9	KAMRA
10	SZEMTARTÓ
11	CSIRKESZEM
12	SÓOLDAT-KIFOLYÓNYÍLÁS
13	ÁLLÍTÓCSAVAR
14	ÁLLÍTHATÓ FELSŐ KAR
15	RÖGZÍTETT ALSÓ KAR

▼M3

B.49 *IN VITRO* CELLULÁRIS MIKRONUKLEUSZ-VIZSGÁLAT EMLŐSÖKÖN

BEVEZETÉS

1. Az *in vitro* mikronukleusz-vizsgálat (MNvit vizsgálat) interfázisban lévő sejtek citoplazmájában mikronukleuszok (MN) kimutatására szolgáló genotoxicitási vizsgálat. A mikronukleuszok acentrikus (vagyis centromérával nem rendelkező) kromoszómafragmentumokból származhatnak, vagy olyan ép kromoszómákból, amelyek a sejtosztódás anafázisa során nem képesek a sejtpólusokra vándorolni. A vizsgálattal klasztogén és aneugén kémiai anyagok (anyagok és keverékek) (1) (2) aktivitása mutatható ki osztódó sejteken, a vizsgált anyaggal történő expozíció során vagy azt követően. Ez a vizsgálati módszer egyaránt lehetővé teszi az aktin-polimerizációt gátló citokalazin-B-t (citoB) tartalmazó és nélkülöző protokollok használatát. A citoB célzott mitózist megelőző hozzáadása az egy mitotikus cikluson átesett sejtek esetében lehetővé teszi a mikronukleuszok gyakoriságának azonosítását és szelektív analízisét, mivel ezek a sejtek kétmagvúak (3) (4). Ez a vizsgálati módszer a citokinézis-gátlást nem alkalmazó protokollok használatát is lehetővé teszi, feltéve, hogy a vizsgált sejtpopuláció mitózisa bizonyítható.

2. Amellett, hogy MNvit vizsgálat alkalmazható a mikronukleuszokat indukáló vegyi anyagok (anyagok vagy keverékek) azonosítására, a citokinézis-gátlás alkalmazása, a kinetochorok immunkémiai jelölése, illetve a centroméra/teloméra próbák hibridizációja (fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)) arról is információkat nyújthat, hogy milyen mechanizmussal történt a kromoszómasérülés és a mikronukleusz-képződés (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). A jelölést és a hibridizációs technikákat akkor lehet használni, ha fokozódik a mikronukleusz-képződés, és a vizsgáló személy szeretné megállapítani, hogy ez a fokozódás klasztogén és/vagy aneugén hatásra jött-e létre.

3. A mikronukleuszok olyan károsodást jeleznek, amely átkerült az utódsejtekbe, míg a metafázisban lévő sejtekben talált kromoszómaaberrációk nem feltétlenül öröklődnek. Mivel az interfázisos sejtben lévő mikronukleuszok viszonylag objektívan vizsgálhatók, a laboratóriumi személyzetnek csupán azt kell meghatároznia, hogy a sejtek átestek-e osztódáson, és hogy hány sejt tartalmaz mikronukleuszt. Ennek következtében a preparátumok viszonylag gyorsan értékelhetők, és a vizsgálat automatizálható. Ez a gyakorlatban kezelésenként több száz helyett több ezer sejt értékelését teszi lehetővé, növelve a vizsgálat erejét. Végül megállapítható, hogy mivel a mikronukleuszok lemaradó kromoszómákból keletkezhetnek, lehetséges olyan aneuploidiát indukáló anyagok azonosítása, amelyeket a hagyományos kromoszómaaberrációs vizsgálatokkal, például az OECD 473. vizsgálati iránymutatása (e melléklet B.10. fejezete) szerint nehéz vizsgálni (17). Az MNvit vizsgálat ugyanakkor speciális technikák, például a 2. bekezdésben leírt FISH alkalmazása nélkül nem teszi lehetővé a poliploidiát okozó és a klasztogén hatású vegyi anyagok elkülönítését.

4. Az MNvit vizsgálat *in vitro* módszer, amelyet jellemzően humán és rágcsáló eredetű tenyésztett sejteken alkalmaznak. *Mivel aneugén és klasztogén hatású anyagok egyaránt kimutathatóak*, széleskörű alapot biztosít a kromoszómakárosító hatás *in vitro* vizsgálatához.

5. Az MNvit vizsgálat számos különféle sejttípus esetében, valamint citoB jelenlétében és hiányában is megbízható és hatékony. Az MNvit vizsgálat hitelességét különböző rágcsálósejtvonalak (CHO, V79, CHL/IU és L5178Y) és humán limfociták alkalmazásával nyert nagy mennyiségű adat támasztja alá (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Ezek közé tartoznak különösen a Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) által koordinált nemzetközi hitelesítési tanulmányok (18) (19) (20) (21) (22) és a genotoxicitás vizsgálatával foglalkozó

▼M3

nemzetközi műhely (International Workshop on Genotoxicity Testing) jelentései (4) (16). A rendelkezésre álló adatokat az Európai Bizottság Alternatív Módszerek Validálásával Foglalkozó Európai Központja (ECVAM) is újraértékelte egy, a bizonyítékok súlyát mérlegelő retrospektív hitelesítési vizsgálatban, és a vizsgálati módszert az ECVAM tudományos tanácsadó bizottsága (ESAC) tudományosan hitelesített módszerként jóváhagyta (32) (33) (34). A humán TK6 limfoblasztoid sejtvonal (35), HepG2 sejtek (36) (37) és szíriai aranyhörcsög-embrió elsődleges sejtjeinek (38) felhasználását is leírták, bár ezeket hitelesítési vizsgálatok során nem használják.

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

6. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

7. Az *in vitro* végrehajtott vizsgálatok rendszerint szükségessé teszik a metabolikus aktiválás valamilyen exogén forrásának használatát, kivéve, ha a sejtek metabolizálják a vizsgált anyagokat. A külső metabolikus aktivációs rendszer nem utánozza teljesen az *in vivo* körülményeket. Ügyelni kell az olyan körülmények elkerülésére, amelyek műhibaként a belső mutagenitást nem tükröző pozitív eredményekhez vezetnének, és amelyek olyan tényezőkből adódhatnak, mint például a pH vagy az ozmolalitás jelentős változásai vagy a citotoxicitás magas szintje (39) (40) (41). Amennyiben a vizsgált vegyi anyag a hozzáadásakor változást idéz elő a közeg pH-jában, akkor a pH-t – lehetőleg a törzsoldat pufferolásával – úgy kell beállítani, hogy a térfogatok minden vizsgált koncentráció és minden kontroll esetében azonosak maradjanak.

8. A mikronukleuszok indukálásának vizsgálatához elengedhetetlen, hogy a kezelt és a nem kezelt tenyészetekben egyaránt mitózis menjen végbe. A mikronukleuszok számolásához az a leginformatívabb szakasz, amikor a sejt a vizsgált anyaggal végzett kezelés során vagy után egy mitózison esett át.

A VIZSGÁLAT ELVE

9. A humán vagy emlős eredetű sejttenyészeteket metabolikus aktiváció exogén forrásának jelenlétében és anélkül egyaránt kiteszik a vizsgált anyag hatásának, kivéve, ha megfelelő metabolizáló képességgel rendelkező sejteket használnak. A párhuzamos oldószeres/vivőanyagos (VC) és pozitív kontrollanyagok (PC) minden vizsgálathoz hozzátartoznak.

10. A vizsgált anyaggal végzett expozíció során vagy után a sejteket elegendő ideig kell tenyészteni ahhoz, hogy kromoszóma- vagy orsókárosodás jöhessen létre, és ez az interfázisban lévő sejtekben mikronukleuszok képződéséhez vezessen. Az aneuploidia indukálásához a vizsgált anyagnak a mitózis során a szokott módon jelen kell lennie. A mikronukleuszok jelenlétét a begyűjtött és megfestett, interfázisban lévő sejtekben vizsgálják. Ideális esetben a mikronukleuszokat csak azokban a sejtekben kell megszámolni, amelyek a vizsgált anyaggal történt expozíció során vagy – ha van ilyen – az expozíció utáni időszakban estek át mitózison. A citokinezis-gátlóval kezelt tenyészetekben ezt úgy érjük el, hogy csak a kétmagvú sejteket értékeljük. Citokinezis-gátló hiányában fontos annak bizonyítása, hogy a vizsgált sejtek valószínűleg sejtosztódáson estek át a vizsgált anyaggal végzett expozíció során vagy után. Minden protokoll esetében fontos bizonyítani, hogy a sejtproliferáció a kontroll és a kezelt tenyészetekben egyaránt végbement, és a mikronukleuszok számolásához használt tenyészetekben (vagy a párhuzamos tenyészetekben) meg kell állapítani a vizsgált anyag által kiváltott citotoxicitás vagy citosztázis mértékét.

▼M3

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Előkészületek

11. Humán perifériás vérből származó tenyésztett primer limfociták (5) (19) (42) (43) és bizonyos rágcsáló sejtvonalak, például a CHO, V79, CHL/IU és L5178Y sejtek alkalmazhatók (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Egyéb sejtvonalak és sejttípusok alkalmazását a vizsgálat során mutatott teljesítményük alapján, az Elfogadhatósági kritériumok című részben leírtak szerint kell indokolni. Mivel a mikronukleusz-képződés alapgyakorisága befolyásolja a vizsgálat érzékenységét, ezért alacsony, stabil mikronukleusz-képződési gyakorisággal rendelkező sejttípusok alkalmazása javasolt.

12. A limfociták kinyeréséhez a humán perifériás vért fiatal (körülbelül 18-35 éves), egészséges, nem dohányzó személytől kell venni, akiről nem ismert, hogy az utóbbi időben genotoxikus vegyi anyagoknak vagy sugárhatásnak lett volna kitéve. Amennyiben több donortól származó sejteket együtt használnak fel, akkor a donorok számát meg kell adni. A mikronukleusz-képződés gyakorisága az életkor előrehaladtával fokozódik, és ez a tendencia a nőknél erősebb, mint a férfiaknál (44), így ezt a donorsejtek gyűjtésre történő kiválasztása során figyelembe kell venni.

Tenyésztőközegek és tenyésztési körülmények

13. A tenyészetek fenntartásához megfelelő tenyésztőközeget és inkubálási körülményeket (tenyésztőedényeket, CO_2-koncentrációt, hőmérsékletet és páratartalmat) kell biztosítani. Az igazolt sejtvonalaknál és törzseknél rutinszerűen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitását és a mikoplazma-fertőzés hiányát, és amennyiben a modális kromoszómaszám megváltozott, nem szabad felhasználni a tenyészetet. A vizsgálólaboratóriumban a tenyésztéshez alkalmazott normál sejtciklus idejének ismertnek kell lennie. Amennyiben citokinezis-gátlási módszert alkalmaznak, akkor a citokinezis-gátló anyag koncentrációját az adott sejttípusnak megfelelően optimalizálni kell, és bizonyítottnak kell lennie, hogy az adott koncentráció az értékeléshez megfelelő számú kétmagvú sejtet eredményez.

Tenyészetek készítése

14. Igazolt sejtvonalak és törzsek: a törzstenyészetből származó sejteket szélleszteni kell, majd tápközegben, olyan denzitásban kell tenyészteni, hogy az egy rétegben növő tenyészetek (monolayerek) ne váljanak egybefüggővé, és a szuszpenziós tenyészetek ne érjenek el túlzott denzitást a begyűjtés előtt, majd 37 °C hőmérsékleten inkubálni kell.

15. Limfociták: a vizsgált anyaggal és a citoB-vel való expozíció előtt véralvadásgátlóval (például heparinnal) kezelt teljes vért vagy izolált limfocitákat tenyésztünk valamilyen mitogén anyag, például fitohemagglutinin (PHA) jelenlétében.

Metabolikus aktiváció

16. Megfelelő endogén metabolikus kapacitással nem rendelkező sejtek használata esetén exogén metabolizáló rendszereket kell alkalmazni. A leggyakrabban használt rendszer egy kofaktorral kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amelyet enziminduktor szerekkel, például Aroclor 1254-gyel (45) (46) vagy fenobarbiton és β-naftoflavon kombinációjával (46) (47) (48) (49) kezelt rágcsálók májából állítanak elő. Ez utóbbi kombináció nem sérti a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokra vonatkozó Stockholmi Egyezményt (50) és a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról szóló 850/2004/EK rendeletet (66), és a vegyes funkciójú oxidázok indukciója terén ugyanolyan hatékonynak bizonyult, mint az Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). Az S9 frakciót a végleges vizsgálati tenyésztőközegben általában az 1–10 % (v/v) közötti koncentrációtartományban alkalmazzák. A metabolikus aktivációs rendszer jellemzői függhetnek a vizsgált kémiai anyag csoportjától, és bizonyos esetekben megfelelő lehet több S9 koncentráció alkalmazása.

▼M3

17. A humán vagy rágcsáló eredetű aktiváló enzimeket termelő, géntechnológiával előállított sejtvonalak kiküszöbölhetik az exogén metabolikus aktivációs rendszer alkalmazásának szükségességét, és alkalmazhatók vizsgálathoz. Ilyen esetekben az alkalmazott sejtvonalra vonatkozó döntésnek – például a vegyes funkciójú oxidázoknak a vizsgált anyag metabolizmusában betöltött szerepe (51), valamint az ismert klasztogén és aneugén hatású anyagokra adott válaszreakciójuk alapján – tudományosan megalapozottnak kell lennie (lásd az Elfogadhatósági kritériumokra vonatkozó külön részt). Szem előtt kell tartani, hogy a vizsgált anyagot a termelt vegyes funkciójú oxidáz(ok) nem metabolizálhatják, ellenkező esetben ugyanis a negatív eredmények nem jelentenék azt, hogy a vizsgált anyag nem indukálja mikronukleuszok képződését.

A vizsgált anyag előkészítése

18. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat a sejtek kezelése előtt oldószerben vagy vivőanyagban kell feloldani, és szükség esetén hígítani kell. A folyékony anyagokat közvetlenül is lehet a vizsgálati rendszerhez adagolni és/vagy a kezelés előtt hígíthatók. Gáznemű vagy illékony vegyi anyagok a szabványos protokoll megfelelő módosításával vizsgálhatók, ilyen lehet például, hogy az anyagok kezelését légmentesen lezárt edényekben kell végezni (52) (53). A vizsgált anyagból friss készítményeket kell alkalmazni, kivéve, ha a stabilitási adatok a tárolás elfogadhatóságát bizonyítják.

Vizsgálati körülmények

Oldószerek/vivőanyagok

19. Az oldószer/vivőanyag nem léphet reakcióba a vizsgált anyaggal, és nem befolyásolhatja a sejtek túlélőképességét vagy az S9 aktivitásának fennmaradását az alkalmazott koncentrációban. Ha nem jól bevált oldószert/vivőanyagot (például víz, sejttenyésztőközeg, dimetil-szulfoxid) alkalmaznak, akkor a választott szer alkalmazását a vizsgált anyaggal való kompatibilitást és a genotoxicitás hiányát mutató adatokkal kell alátámasztani. Amennyiben lehetséges, először valamilyen vizes oldószer/vivőanyag használatát kell megfontolni.

CitoB alkalmazása citokinezis-gátlóként

20. Az MNvit vizsgálat teljesítményét illetően az egyik legfőbb szempont annak biztosítása, hogy az értékelt sejtek a kezelés során vagy – ha volt ilyen – a kezelés utáni inkubációs periódusban mitózison essenek át. A citokinezis gátlására a legelterjedtebben alkalmazott szer a citoB, mivel gátolja az aktin kapcsolódását, ezzel megakadályozza az utódsejtek mitózis utáni szétválását, ami kétmagvú sejtek képződéséhez vezet (5) (54) (55). A mikronukleuszok számolása ezért azokra a sejtekre korlátozható, amelyek a kezelés során vagy utána átestek a mitózison. A vizsgált anyag által a sejtproliferáció kinetikájára gyakorolt hatás párhuzamosan mérhető. A citoB akkor alkalmazandó citokinezis-gátlóként, ha humán limfocitákat alkalmazunk, mivel a sejtciklusidők adott tenyészeten belül és donorok között változóak lesznek, és nem az összes limfocita fog reagálni a PHA-ra. Egyéb módszereket alkalmazunk, ha azért vizsgáljuk a sejtvonalakat, hogy meghatározzuk, osztódtak-e az értékelt sejtek; ezek alább szerepelnek (lásd a 26. bekezdést).

21. A citoB megfelelő koncentrációját az egyes sejttípusokra vonatkozóan a laboratóriumnak kell meghatározni annak érdekében, hogy az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontroll tenyészetekben megfelelő gyakorisággal alakuljanak ki kétmagvú sejtek. A citoB megfelelő koncentrációja általában 3–6 μg/ml.

▼M3

A sejtproliferáció és a citotoxicitás mérése, valamint az expozíciós koncentráció kiválasztása

22. A vizsgált anyag legmagasabb vizsgálandó koncentrációjának meghatározásakor kerülni kell azokat a koncentrációkat, amelyek mellett álpozitív válaszreakciók alakulhatnak ki, ilyenek például a rendkívüli citotoxicitást kiváltó, a tenyésztőközegben kicsapódást okozó vagy a pH-ban, illetve az ozmolalitásban jelentős változásokat okozó koncentrációk (39) (40) (41).

23. Mérni kell a sejtproliferációt, és ezáltal meg kell győződni arról, hogy a kezelt sejtek a vizsgálat során átestek a mitózison, és hogy a kezeléseket megfelelő szintű citotoxicitás mellett végezzük (lásd a 29. bekezdést). A citotoxicitást a metabolikus aktivációt igénylő sejtekben meg kell határozni metabolikus aktiváció mellett és anélkül is, a sejtszám relatív növekedése (RICC) vagy a relatív populációduplázódás (RPD) alapján (lásd a 2. függelék képleteit), kivéve, ha citoB-t alkalmazunk. CitoB alkalmazása esetén a citotoxicitás meghatározható a replikációs index (RI) segítségével (a képletet lásd a 2. függelékben).

24. A tenyészetek citoB-vel történő kezelése, valamint a tenyészetben található egymagvú, kétmagvú és többmagvú sejtek relatív gyakoriságainak mérése pontos módszer a kezelés sejtproliferációt előidéző és citotoxikus vagy citosztatikus hatásának mennyiségi meghatározására (5), valamint biztosítja, hogy csak a kezelés során vagy után osztódott sejtek kerüljenek értékelésre.

25. A citoB-vel végzett vizsgálatokban a citosztázis/citotoxicitás mennyiségi meghatározása a citokinezis-gátlási proliferációs indexből (CBPI) (5) (26) (56) végezhető, vagy tenyészetenként legalább 500 sejt RI-jéből (a képleteket lásd a 2. függelékben) vezethető le. Amennyiben a sejtproliferáció értékeléséhez citoB-t alkalmazunk, a CBPI-t vagy az RI-t tenyészetenként legalább 500 sejtből kell meghatározni. Többek között ezek a mérések alkalmazhatók a citotoxicitásnak a kezelt tenyészetekben és a kontrolltenyészetekben kapott értékek összehasonlításával történő becslésére. A citotoxicitás egyéb markereinek (például egybefüggőség, sejtszám, apoptózis, nekrózis, metafázis számolása) értékelése szintén hasznos információkat szolgáltathat.

26. A citoB nélkül végzett vizsgálatokban igazolni kell azt, hogy a tenyészetben értékelt sejtek a vizsgált anyaggal végzett kezelés alatt vagy az után átestek az osztódáson, ellenkező esetében álnegatív lehet a válaszreakció. Annak biztosítására, hogy az osztódott sejtek kerüljenek értékelésre, alkalmazható például a bromodezoxiuridin (BrdU) beépítése és azt követő kimutatása az osztódott sejtek azonosítása érdekében (57), a klónképződés, amikor immortalizált sejtvonalat kezelnek és értékelnek in situ tárgylemezen, mikroszkóp használatával (proliferációs index, [PI]) (25) (26) (27) (28), illetve a relatív populációduplázódás (RPD), a sejtszám relatív növekedése (RICC) vagy egyéb bizonyított igazolt módszerek (16) (56) (58) (59) (a képleteket lásd a 2. függelékben). A citotoxicitás vagy citosztázis egyéb markereinek (például egybefüggőség, sejtszám, apoptózis, nekrózis, metafázis számolása) értékelése szintén hasznos információkat szolgáltathat.

27. Legalább három elemezhető vizsgálati koncentrációt kell értékelni. Ennek érdekében szükséges lehet nagyobb számú, egymáshoz közeli koncentrációkkal végezni a kísérletet, és a mikronukleusz-képződést a megfelelő tartományba eső citotoxicitást eredményező koncentrációk alkalmazásával elemezni. Egy másik lehetséges stratégia szerint előzetes citotoxicitási vizsgálatot kell végezni és ezzel leszűkíteni a tartományt a végleges vizsgálathoz.

28. A legmagasabb koncentrációval 55 ± 5 %-os citotoxicitás előidézését kell megcélozni. Nagyobb koncentrációk a citotoxicitás másodlagos hatásaként kromoszómakárosodást idézhetnek elő (60). Amennyiben citotoxicitás lép fel, a kiválasztott koncentrációknak le kell fedni az 55 ± 5 %-os citotoxicitástól kezdve a kisfokú citotoxicitáson át a citotoxicitást nem okozó koncentrációk tartományát.

▼M3

29. Amennyiben citotoxicitás vagy kicsapódás nem figyelhető meg, akkor a legmagasabb vizsgált koncentrációnak 0,01 M-nak, 5 mg/ml-nek vagy 5 µl/ml-nek kell megfelelnie, attól függően, hogy melyik a legalacsonyabb érték. A vizsgálathoz kiválasztott koncentrációk között általában nem lehet 10-nél nagyobb távolság. Olyan vizsgált anyagok esetében, amelyek meredek koncentráció-válasz görbével rendelkeznek, szükséges lehet kisebb különbségeket hagyni a vizsgált anyag koncentrációi között, hogy a közepes és alacsony toxicitási tartományban lévő tenyészetek is értékelésre kerüljenek.

30. Amennyiben az oldhatóság korlátozó tényező, akkor a maximális koncentrációnak – ha nem korlátozza citotoxicitás – azt a legalacsonyabb koncentrációt kell választani, amely mellett csak minimális precipitátumok láthatók a tenyészetekben, feltéve, hogy nem zavarják az értékelést. A precipitáció értékelését például fénymikroszkópos módszerrel kell végezni, figyelembe véve azokat a precipitátumokat, amelyek a tenyésztés során tartósan megmaradtak vagy ekkor (a kezelés végéig) jelentek meg.

Kontrollok

31. Minden kísérletben egyidejűleg pozitív és oldószeres/vivőanyagos kontrollokat is vizsgálni kell, metabolikus aktiválással és anélkül is.

32. A pozitív kontrollok azért szükségesek, hogy igazoljuk az alkalmazott sejtek és a vizsgálati protokoll alkalmasságát a klasztogén és aneugén hatású anyagok azonosítására, valamint az S9 készítmény metabolikus képességének megerősítésére. A pozitív kontrollnak a mikronukleuszképződés ismert induktorát olyan koncentrációban kell tartalmaznia, amely a háttérértékekben várhatóan kismértékű, de reprodukálható növekedést okoz, és bizonyítja a vizsgálati rendszer érzékenységét. A pozitív kontrollok koncentrációját úgy kell kiválasztani, hogy a hatások egyértelműek legyenek, de a kiértékelő számára ne árulkodjanak azonnal a kódolt tárgylemezek tartalmáról.

33. A metabolikus kompetencia és a vizsgálati rendszer klasztogén anyagok kimutatására való képességének igazolására egyaránt metabolikus aktivációt igénylő klasztogén anyagokat (például ciklofoszfamid; benzo[a]pirén) kell alkalmazni. Indokolt esetben más pozitív kontroll is alkalmazható. Mivel a metabolikus aktivációt igénylő egyes pozitív kontrollok bizonyos kezelési körülmények mellett, illetve bizonyos sejtvonalakban exogén metabolikus aktiváció nélkül is aktívak lehetnek, ezért a metabolikus aktiváció szükségességét, valamint az S9 preparátum aktivitását a kiválasztott sejtvonalban és a kiválasztott koncentrációk mellett kell vizsgálni.

34. Jelenleg nem ismert olyan aneugén hatású anyag, amely genotoxikus aktivitásához metabolikus aktivációt igényelne (16). Az aneugén aktivitás vizsgálata során alkalmazandó jelenleg elfogadott pozitív kontroll például a kolhicin és a vinblasztin. Más vegyi anyagok is alkalmazhatók, amennyiben a mikronukleuszok képződését kizárólag, vagy elsődlegesen aneugén hatásuk révén indukálják. Annak elkerülésére, hogy metabolikus aktiváció nélkül két pozitív kontrollt (a klasztogén és az aneugén hatás vizsgálatára) kelljen alkalmazni, az aneugenitás vizsgálata során alkalmazott kontroll S9 nélkül szolgálhat pozitív kontrollként, a klasztogén hatás vizsgálatához alkalmazott kontroll pedig használható az alkalmazott metabolikus aktiváló rendszer megfelelőségének vizsgálatára. Az S9 preparátumot nem igénylő sejtekben a klasztogén és az aneugén hatás vizsgálatához egyaránt szükséges pozitív kontrollt alkalmazni. A javasolt pozitív kontrollokat a 3. függelék tartalmazza.

35. Megfontolható a vegyi anyag csoportjához tartozó pozitív kontroll használata, amennyiben a megfelelő vegyi anyagok rendelkezésre állnak. Az alkalmazott pozitív kontrolloknak meg kell felelniük a sejttípusnak és az aktiválás körülményeinek.

▼M3

36. Minden begyűjtési időpontban oldószeres/vivőanyagos kontrollokat kell alkalmazni. Ezenfelül kezeletlen negatív kontrollt (amelyben nincs oldószer/vivőanyag) szintén alkalmazni kell, kivéve, ha rendelkezésre állnak olyan publikált vagy a laboratóriumban nyert régebbi kontrolladatok, amelyek igazolják, hogy a választott oldószer az alkalmazott koncentrációban nem idéz elő genotoxikus vagy egyéb ártalmas hatásokat.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A kezelés ütemterve

37. A sejtciklus meghatározott fázisában ható aneugén, illetve klasztogén anyagok azonosítási valószínűségének maximalizálása érdekében fontos, hogy a sejtciklusok valamennyi fázisa során megfelelő számú sejtet kezeljünk a vizsgált anyaggal. A kezelés ütemterve a sejtvonalak és primer sejttenyészetek esetében ezért valamelyest elérthet a limfocitákétól, amelyek mitogén stimulációt igényelnek ahhoz, hogy megkezdődjön a sejtciklus; ennek tárgyalása a 41–43. bekezdésekben szerepel (16).

38. Az elméleti megfontolások a publikált adatokkal együtt (18) azt mutatják, hogy a legtöbb aneugén és klasztogén anyagot rövid, 3–6 órás kezelési időszak alkalmazásával – S9 jelenlétében vagy hiányában – lehet kimutatni, amelyet a vizsgált anyag eltávolítása és 1,5–2,0 sejtciklusnyi szaporodási időszak követ (6). A sejteket a kezelés kezdetétől vagy végétől számítva a normál sejtciklus (vagyis a kezeletlen sejtek sejtciklusa) körülbelül 1,5–2,0-szeresének megfelelő idő elteltével kell begyűjteni (lásd az 1. táblázatot). A begyűjtési vagy visszanyerési idők meghosszabbíthatók, amennyiben ismert vagy feltételezhető, hogy a vizsgált anyag befolyásolja a sejtciklus idejét (például nukleozidanalógok vizsgálata során).

39. Az S9 preparátumok tenyésztett emlőssejtek esetében tapasztalható potenciális citotoxicitása miatt a normál sejtciklus-idő 1,5–2,0-szeresének megfelelő meghosszabbított expozíciós kezelést kizárólag S9 hiányában végeznek. Meghosszabbított kezelés esetén lehetőség kínálkozik a sejtek vizsgált vegyi anyaggal történő kezelésének citoB hiányában vagy jelenlétében történő végzésére. Ezeknek a választási lehetőségeknek azokban a helyzetekben van jelentőségük, amikor problémát jelenthet a vizsgált anyag és a citoB közötti lehetséges kölcsönhatás.

40. A sejtek kezelésének javasolt ütemtervét az 1. táblázat mutatja be. Ezek az általános kezelési ütemtervek a vizsgált anyag stabilitásától és reaktivitásától, illetve az alkalmazott sejtek konkrét szaporodási jellemzőitől függően módosíthatóak. Minden kezelésnek az exponenciális szaporodás időszakában kell kezdődnie és véget érnie. Ezeket az ütemterveket a következő, 41–47. bekezdések mutatják be részletesebben.

1. táblázat

A sejtek kezelésének és begyűjtésének ideje az MNvit vizsgálat esetében

CitoB-vel kezelt limfociták, primer sejtek és sejtvonalak	+ S9	A sejteket 3–6 órán át S9 jelenlétében kezeljük; eltávolítjuk az S9-et és a kezelési közeget; friss közeget és citoB-t adunk hozzá; a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének elteltével begyűjtjük a sejteket.
	– S9 Rövid expozíció	A sejteket 3–6 órán át kezeljük; eltávolítjuk a kezelési közeget; friss közeget és citoB-t adunk hozzá; a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének elteltével begyűjtjük a sejteket.

▼M3

	– S9 Meghoszszabbított expozíció	*„A”lehetőség:* A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2-szeresének megfelelő ideig citoB jelenlétében kezeljük; az expozíciós idő végén begyűjtjük a sejteket. *„B”lehetőség:* A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2-szeresének megfelelő ideig kezeljük; eltávolítjuk a vizsgált anyagot; friss közeget és citoB-t adunk hozzá; a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének elteltével begyűjtjük a sejteket.
CitoB nélkül kezelt sejtvonalak (Megegyezik a fentebb ismertetett kezelési ütemtervvel, azzal a kivétellel, hogy citoB hozzáadására nem kerül sor)		

CitoB-vel kezelt limfociták, primer sejtek és sejtvonalak

41. Limfociták esetében a leghatékonyabb módszer, ha a vizsgált anyaggal történő expozíciót a PHA-stimuláció után 44–48 órával kezdjük, amikorra a ciklusszinkronizáció már eltűnik (5). Az első vizsgálat során a sejteket 3–6 órán át, S9 hiányában és jelenlétében kezeljük a vizsgált anyaggal. Eltávolítjuk a kezelési közeget, citoB-t tartalmazó friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő idő elteltével begyűjtjük a sejteket.

42. Amennyiben a rövid (3–6 órás) kezeléssel végzett mindkét első vizsgálat negatív vagy kétes eredményű, akkor meghosszabbított expozíciós idővel, S9 nélkül újabb kezelést végzünk. Kétféle kezelési lehetőség áll rendelkezésre, amelyek mindegyike egyformán elfogadott. Stimulált limfociták esetében, amelyeknél az exponenciális szaporodási fázis a stimulációt követő 96. órától csökkenhet, megfelelőbb lehet az „A” lehetőség szerint eljárni. Ezenfelül a „B” lehetőség esetében a sejttenyészeteknek a végleges mintavétel időpontjáig nem szabad egybefüggővé válniuk.

— „A” lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal, majd a kezelési idő végén begyűjtjük.

— „B” lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal. Eltávolítjuk a kezelési közeget és friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő további időszak elteltével begyűjtjük a sejteket.

43. A primer sejteket és sejtvonalakat a limfocitákhoz hasonló módon kell kezelni, azzal a kivétellel, hogy a PHA-val 44–48 órán át végzett stimuláció nem szükséges. A limfocitáktól eltérő egyéb sejtek esetében az expozíciót úgy kell végezni, hogy a vizsgálat befejezésének időpontjában a sejtek még a szaporodás logaritmikus fázisában legyenek.

CitoB nélkül kezelt sejtvonalak

44. A sejteket 3–6 órán át, S9 jelenlétében és hiányában kell kezelni. Eltávolítjuk a kezelési közeget és friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő idő elteltével begyűjtjük a sejteket.

▼M3

45. Amennyiben a rövid (3–6 órás) kezeléssel végzett mindkét első vizsgálat negatív vagy kétes eredményű, akkor meghosszabbított expozíciós idővel újabb kezelést végzünk (S9 nélkül). Kétféle kezelési lehetőség áll rendelkezésre, amelyek mindegyike egyformán elfogadott:

— „A” lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal, majd a kezelési idő végén begyűjtjük.

— „B” lehetőség: A sejteket a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal. Eltávolítjuk a kezelési közeget és friss közeggel pótoljuk, majd a normál sejtciklus 1,5–2,0-szeresének megfelelő további időszak elteltével begyűjtjük a sejteket.

46. Az egy rétegben növő tenyészetekben (monolayerek) a 3-6 órás kezelés végén mitotikus sejtek (ismertetőjegyük, hogy alakjuk kerek, és leválnak a felszínről) lehetnek jelen. Mivel ezek a mitotikus sejtek könnyen leválnak, a vizsgált anyagot tartalmazó közeg eltávolításakor elveszhetnek. Ügyelni kell arra, hogy a tenyészetek átmosásakor összegyűjtsük ezeket a sejteket, és visszahelyezzük a tenyészetbe, ezáltal a begyűjtéskor ne veszítsünk el mitózisban lévő és a mikronuleusz-képződés kockázatának kitett sejteket.

A tenyészetek száma

47. A vizsgált anyag minden koncentrációjához, valamint a vivőanyagos/oldószeres és negatív kontroll tenyészetekhez két párhuzamos tenyészetet kell alkalmazni. Amennyiben a párhuzamos tenyészetek között a korábbi laboratóriumi adatok alapján csak minimális eltérések igazolhatók, elfogadható lehet egy tenyészet alkalmazása. Egy tenyészet alkalmazása esetén javasolt nagyobb számú koncentrációkat vizsgálni.

A sejtek begyűjtése és a metszet elkészítése

48. A begyűjtést és a feldolgozást minden tenyészetnél külön kell végezni. A sejtek előkészítéséhez hozzátartozhat a hipotóniás kezelés, ez a lépés azonban nem szükséges, ha a sejtek megfelelő szétterítése egyéb módon is elérhető. A metszetkészítés során különböző technikák alkalmazhatók, amennyiben ezek az értékeléshez jó minőségű sejtpreparátumokat eredményeznek. A sejt citoplazmáját meg kell tartani, hogy ki lehessen mutatni a mikronukleuszokat és (a citokinezis-gátlási módszer esetén) megbízhatóan azonosítani lehessen a kétmagvú sejteket.

49. A metszetek különböző módszerekkel festhetők meg, például Giemsa vagy fluoreszkáló DNS-specifikus festékekkel (59). DNS-specifikus festék (például akridin narancs (61) vagy Hoechst 33258 plusz pironin-Y (62)) használatával kiküszöbölhetők a nem DNS-specifikus festékkel járó bizonyos műhibák. A mikronukleuszok tartalmának (kromoszóma/kromoszómafragmentum) azonosítására antikinetokor antitestek, pancentromérás DNS-próbákkal végzett FISH vagy pancentroméra-specifikus primerekkel végzett *in situ* jelölés, illetve megfelelő DNS-kontrasztfestés alkalmazható, amennyiben a mikronukleuszok keletkezésének mechanizmusára vonatkozó információkra van szükség (15)(16). A klasztogén és aneugén hatású anyagok megkülönböztetésére egyéb, korábban hatékonynak bizonyult módszerek is alkalmazhatók.

Elemzés

50. A mikroszkópos elemzés előtt az összes metszetet, köztük az oldószeres/vivőanyagos metszeteket és a kontrollokat is egymástól függetlenül kell kódolni. A kódolt minták hitelesített, automatikus flow citometriával vagy képelemzési rendszerrel is elemezhetők.

▼M3

51. A citoB-vel kezelt tenyészetekben a mikronukleusz-képződés gyakoriságát koncentrációnként legalább 2 000 kétmagvú sejt értékelésével (tenyészetenként legalább 1 000 kétmagvú sejt; két tenyészet koncentrációként) kell vizsgálni. Ha csak egy tenyészetet alkalmazunk, akkor az adott tenyészetből koncentrációként legalább 2 000 kétmagvú sejtet kell értékelni. Ha az egyes koncentrációkban tenyészetenként 1 000-nél vagy – egy tenyészet alkalmazása esetén – 2 000-nél jelentősen kevesebb kétmagvú sejt áll rendelkezésre, és nem mutatható ki a mikronukleuszok számának jelentős növekedése, akkor vizsgálatot szükség szerint több sejt vagy kevésbé toxikus koncentrációk alkalmazásával meg kell ismételni. Ügyelni kell arra, hogy nem szabad olyan kétmagvú sejteket értékelni, amelyek szabálytalan alakúak vagy amelyeknél nagyobb méretű a két mag, továbbá nem szabad összetéveszteni a rosszul szétterített sejteket a többmagvú sejtekkel. A kettőnél több fő magot tartalmazó sejteknél nem szabad vizsgálni a mikronukleuszokat, mivel a ezekben a sejtekben magasabb lehet a mikronukleusz-képződés háttérgyakorisága (63) (64). Egymagvú sejtek értékelése elfogadható, amennyiben a vizsgált anyagról bebizonyosodott, hogy interferál a citoB aktivitásával.

52. A citoB nélkül vizsgált sejtvonalakban a mikronukleusz-képződés gyakoriságát koncentrációnként legalább 2 000 sejt értékelésével (tenyészetenként legalább 1 000 sejt; két tenyészet koncentrációként) kell vizsgálni. Ha koncentrációnként csak egy tenyészetet alkalmazunk, akkor az adott tenyészetből legalább 2 000 sejtet kell értékelni.

53. Amennyiben citoB-t alkalmazunk, a sejtproliferáció értékelése érdekében tenyészetenként legalább 500 sejtből meg kell határozni a CBPI-t vagy az RI-t (lásd 2. függelék). Amennyiben a kezeléseket citoB hiányában végzik, elengedhetetlen annak bizonyítása, hogy az értékelt sejtek osztódtak, amint ezt a 24–27. bekezdések is tárgyalták.

Elfogadhatósági kritériumok

54. A vizsgálati módszerben leírt MNvit tesztet alkalmazni kívánó laboratóriumnak igazolnia kell, hogy metabolikus aktivációval és anélkül, megbízatóan és pontosan ki tudja mutatni az ismert aneugén és klasztogén hatású anyagokat, valamint az ismert negatív vegyi anyagokat a 3. függelékben felsorolt referenciaanyagok alkalmazásával. Amennyiben a vizsgálatot citoB használata nélkül végzik, akkor a vizsgálati módszer helyes elvégzésének alátámasztására a laboratóriumnak igazolnia kell, hogy a mikronukleusz-képződés vizsgálatához értékelt sejtek egy magosztódáson átestek.

55. Referenciaanyagként történő alkalmazásra a 3. függelékben szereplő vegyi anyagok javasoltak. Helyettesítő vagy további vegyi anyagok is alkalmazhatók, ha ezek ismert hatásúak, és ugyanolyan hatásmechanizmussal indukálják a mikronukleusz-képződést, továbbá igazoltan relevánsak az MNvit eljárással vizsgálandó vegyi anyagok szempontjából. Ezt olyan hitelesítési vizsgálat elvégzésével lehet indokolni, amelyhez az anyagok széles körét alkalmazzák vagy a vizsgált vegyi anyag kémiai csoportja vagy a vizsgált károsodás mechanizmusa alapján egy szűkebb körre összpontosítanak.

56. Az oldószeres/vivőanyagos kontrollnak és a kezeletlen tenyészeteknek reprodukálhatóan alacsony és következetes mikronukleusz-képződési gyakoriságot kell produkálniuk (a 11. bekezdésben azonosított sejttípusok esetében általában 5–25 mikronukleusz/1 000 sejt). Az egyéb sejttípusok esetében a válaszreakciók eltérő tartományokba eshetnek, amelyeket a sejtek MNvit vizsgálathoz történő alkalmazásának hitelesítésekor meg kell határozni. A historikus kontrolltartományok megállapításához a negatív kontroll, az oldószer és a pozitív kontroll adatait kell felhasználni. A vizsgálat során párhuzamosan értékelt negatív kontrollok/pozitív kontrollok megfelelőségének megítéléséhez ezeket az értékeket kell felhasználni.

▼M3

57. Amennyiben a vizsgálati protokollon kisebb változtatásokat terveznek (például manuális értékelés helyett automatikus; új sejttípus használata), akkor ahhoz, hogy a módosított protokollt használatra elfogadhatónak lehessen tekinteni, a változtatás után igazolni kell a vizsgálat hatékonyságát. A hatékonyság igazolása magába foglalja annak bizonyítását, hogy a kromoszómatörés, valamint a szám feletti vagy hiányzó kromoszómák kimutathatók, és a vizsgálandó kémiai anyagok adott csoportjával vagy anyagok széles körével a vizsgálat megfelelő pozitív vagy negatív eredményeket ad.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Eredmények kezelése

58. Amennyiben a citokinezis-gátlási technikát alkalmazzuk, a mikronuleusz-képződés indukciójának értékelése során (a mikronukleuszok sejtenkénti számától függetlenül) csak a mikronukleuszokkal rendelkező kétmagvú sejtek gyakoriságát használjuk fel. Az egy, két vagy több mikronukleusszal rendelkező sejtek pontozása hasznos információval szolgálhat, de nem kötelező.

59. Egyidejűleg az összes kezelt, illetve oldószeres/vivőanyagos kontroll tenyészet esetében meg kell határozni a citotoxicitás és/vagy a citosztázis paramétereit is (58). Amennyiben a citokinezis-gátlási módszert alkalmazzuk, a kezelt és kontrolltenyészetek esetében a sejtcikus késésének mutatójaként ki kell számolni a CBPI-t vagy az RI-t. CitoB nélkül végzett vizsgálatoknál az RPD-t, az RICC-t vagy a PI-t kell alkalmazni (lásd a 2. függeléket).

60. Meg kell adni a tenyészetre vonatkozó egyedi adatokat. Ezenkívül táblázatos formában az összes adatot össze kell foglalni.

61. Az MNvit vizsgálatban a mikronukleusz-képződést indukáló vegyi anyagok azért válthatnak ki ilyen hatást, mert kromoszómatörést, kromoszómavesztést vagy a kettő együttesét idézik elő. Annak vizsgálatára, hogy a mikronukleusz-képződés indukciója klasztogén és/vagy aneugén hatás eredménye-e, antikinetokor antitestekkel, centroméraspecifikus in situ próbákkal vagy egyéb módszerekkel végzett további elemzések alkalmazhatók.

Az eredmények értékelése és értelmezése

62. Egyértelműen pozitív vagy negatív eredmény esetén nincs előírva további vizsgálattal végzendő igazolás. A kétes eredmények tisztázhatók – a vizsgálat vak jellegének fenntartása érdekében – az összes tenyészetből vett újabb 1 000 sejt vizsgálatával. Ha ezzel a módszerrel nem lehet egyértelmű eredményre jutni, akkor további vizsgálatokat kell végezni. A nyomonkövetési kísérletek során mérlegelendő a vizsgálati paraméterek módosítása a vizsgálati paraméterek tartományának szükség szerinti növelésével vagy csökkentésével. A módosítható vizsgálati paraméterek közé tartozik a vizsgált koncentrációk különbsége, a sejtek begyűjtésének időzítése és/vagy a metabolikus aktiváció körülményei.

63. A pozitív eredmény kimondásának számos feltétele van, például a mikronukleuszokat tartalmazó sejtek számában bekövetkezett koncentrációfüggő vagy statisztikailag szignifikáns növekedés. Elsőként mérlegelendő az eredmények biológiai relevanciája. A válaszreakció biológiai jelentőségének értékelésekor támpontot adhat annak mérlegelése, hogy a megfigyelt értékek a kontrollokkal kapott régebbi eredmények tartományába esnek-e. A vizsgálati eredmények értékelése során segítségként megfelelő statisztikai módszerek alkalmazhatók (65). A statisztikai próbák eredményeit azonban a dózis-válasz összefüggés figyelembevételével kell értékelni. A reprodukálhatóságot és a régebbi adatokat szintén figyelembe kell venni.

▼M3

64. Bár a legtöbb kísérlet egyértelmű pozitív vagy negatív eredményeket fog hozni, bizonyos esetekben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet a vizsgált anyag aktivitásával kapcsolatban egyértelműen állást foglalni. Előfordul, hogy az eredmények továbbra is többféleképpen magyarázhatók vagy megkérdőjelezhetők maradnak függetlenül attól, hogy hány alkalommal ismételik meg a kísérletet.

65. Az MNvit vizsgálattal kapott pozitív eredmény azt jelzi, hogy a vizsgált anyag tenyésztett emlőssejtekben kromoszómatörést vagy kromoszómavesztést indukál. A negatív eredmények azt jelzik, hogy az alkalmazott vizsgálati körülmények között a vizsgált anyag tenyésztett emlőssejtekben nem idéz elő kromoszómatöréseket és/vagy szám feletti kromoszómákat vagy kromoszómahiányt.

Vizsgálati jelentés

66. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia, amennyiben azok a vizsgálat lefolytatása szempontjából relevánsak:

Vizsgált vegyi anyag:

— azonosítási adatok, valamint a CAS nyilvántartási szám és EU-szám,

— fizikai jelleg és tisztaság,

— a vizsgálat elvégzése szempontjából releváns fizikai-kémiai tulajdonságok,

— a vizsgált vegyi anyag reaktivitása az oldószerrel/vivőanyaggal vagy a sejttenyészethez alkalmazott tápközeggel,

Oldószer/vivőanyag:

— az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indoklása,

— a vizsgált anyag oldhatósága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban,

Sejtek:

— az alkalmazott sejtek típusa és eredete,

— az alkalmazott sejtek alkalmassága,

— adott esetben a mikoplazma-fertőzöttség hiánya,

— a sejtciklus hosszára, a duplázódási időre, illetve a proliferációs indexre vonatkozó információk,

— limfociták alkalmazása esetén adott esetben a véradók neme, életkora és száma,

— limfociták alkalmazása esetén meg kell adni, hogy teljes vér vagy szeparált limfociták expozíciója történt-e,

— adott esetben az átoltások száma,

— adott esetben a sejttenyészetek fenntartására alkalmazott módszerek,

— modális kromoszómaszám,

— a normál (negatív kontroll) sejtciklusidő,

Vizsgálati körülmények:

— amennyiben alkalmaznak citokinezis-gátló anyagot, annak megnevezése (például citoB), illetve koncentrációja és a sejtek expozíciójának időtartama,

— a koncentrációk kiválasztásának és a tenyészetek számának indoklása, beleértve a citotoxicitási adatokat és az oldhatóságra vonatkozó korlátokat, ha rendelkezésre állnak,

— közegek összetétele, adott esetben a CO_2–koncentráció,

— a vizsgált anyag koncentrációi,

▼M3

— a hozzáadott vivőanyag és vizsgált anyag koncentrációja (és/vagy térfogata),

— inkubációs hőmérséklet és idő,

— a kezelés időtartama,

— a kezelés utáni begyűjtés időpontja,

— adott esetben sejtsűrűség a leoltáskor,

— a metabolikus aktiváló rendszer típusa és összetétele, ideértve az elfogadhatósági kritériumokat,

— pozitív kontrollanyagok és negatív kontrollok,

— az alkalmazott metszetkészítési módszer és festési technika,

— a mikronukleusz azonosításának kritériumai,

— a vizsgált sejtek száma,

— a citotoxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

— a citotoxicitás szempontjából lényeges kiegészítő információk,

— a pozitív, negatív és kétes vizsgálati eredmény kritériumai,

— az alkalmazott statisztikai elemzési módszer(ek),

— szükség esetén annak meghatározására alkalmazott módszerek, hogy a mikronukleuszok teljes kromoszómákat vagy csak kromoszómatöredékeket tartalmaznak,

Eredmények:

— a citokinezis-gátlási módszer esetében az alkalmazott citotoxicitás mérése, például CBPI vagy RI meghatározásával; citokinezis-gátlási módszerek alkalmazása nélkül az RICC, RPD vagy PI meghatározása; szükség esetén egyéb megfigyelések, például a sejtek egybefüggősége, apoptózis, nekrózis, metafázis számolás, kétmagvú sejtek előfordulási gyakorisága,

— a precipitáció jelei,

— a kezelési közeg pH-jára és ozmolalitására vonatkozó adatok, amennyiben meghatározásra kerültek,

— az elemzéshez elfogadható sejtek meghatározása,

— az egymagvú, kétmagvú és többmagvú sejtek megoszlása, amennyiben citokinezis-gátlási módszert alkalmazunk,

— a mikronukleuszokkal rendelkező sejtek száma minden kezelt és kontrolltenyészetre megadva, valamint adott esetben annak meghatározása, hogy kétmagvú vagy egymagvú sejtben találhatók-e,

— amennyiben lehetséges, a koncentráció-válasz összefüggés,

— a párhuzamos negatív (oldószeres/vivőanyagos) kontroll és pozitív kontroll kémiai adatai,

— a negatív (oldószeres/vivőanyagos) kontroll és pozitív kontroll historikus kémiai adatai a tartományokkal, átlagokkal, szórással és konfidenciaintervallummal (például 95 %) együtt,

— statisztikai elemzés; p-értékek, ha meghatározásra kerültek.

Az eredmények tárgyalása

Következtetések

▼**M3**

SZAKIRODALOM

(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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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, 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). Elektronikus formátumban: [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, 463-467.

(66) Az Európai Parlament és a Tanács 850/2004/EK rendelete (2004. április 29.) a környezetben tartósan megmaradó szerves szennyező anyagokról és a 79/117/EGK irányelv módosításáról, HL L 229., 2004.4.30., 5. o.

▼M3

1. függelék

Fogalommeghatározások

Aneugén: olyan anyag vagy folyamat, amely a mitózissal vagy meiózissal történő sejtosztódási ciklus elemeivel kölcsönhatásba lépve a sejtek vagy organizmusok aneuploidiáját eredményezi.

Aneuploidia: bármilyen eltérés a normális diploid (vagy haploid) kromoszómaszámtól, amely lehet egy vagy több szám feletti vagy hiányzó kromoszóma, nem tartozik viszont ide a teljes kromoszómakészlet többszöröződése (poliploidia).

Apoptózis: programozott sejthalál olyan lépések során keresztül, amelyek a sejt membránhoz kötött részecskékre történő szétesését eredményezik; a részecskék ezután fagocitózissal és endocitózissal kerülnek eltávolításra.

Sejtproliferáció: a sejtek számának növekedése mitotikus sejtosztódással.

Centroméra: A kromoszóma DNS-ének azon része, ahol a két kromatida összeér, és amelyhez a két kinetokor oldalirányban kapcsolódik.

Klasztogén: bármilyen anyag vagy folyamat, amely a sejtek vagy organizmusok populációjában szerkezeti kromoszómakárosodásokat okoz.

Citokinezis: a mitózist közvetlenül követő sejtosztódási folyamat, amelynek eredményeként két utódsejt képződik egy-egy sejtmaggal.

Citokinezis-gátlási proliferációs index (CBPI): a kezelt populációban tapasztalható másodszor osztódó sejtek aránya a kezeletlen kontrollhoz képest (a képletet lásd a 2. függelékben).

Citosztázis: a sejtszaporodás gátlása (a képletet lásd a 2. függelékben).

Citotoxicitás: a sejt szerkezetét vagy működését károsító hatások, amelyek végső soron sejthalált idéznek elő.

Genotoxikus: általános kifejezés, amely magába foglalja a DNS- vagy kromoszómakárosodás valamennyi típusát, köztük a töréseket, adduktok képződését, átrendeződéseket, mutációkat, kromoszómaaberrációkat és aneuploidiát. A genotoxikus hatás nem minden típusa eredményez mutációkat vagy stabil kromoszómakárosodást.

Interfázisban lévő sejtek: azok a sejtek, amelyek nincsenek a mitózis fázisában.

Kinetokor: protein tartalmú struktúra, amely a kromoszóma centroméra részén épül fel, és amelyhez az orsórostok a sejtosztódás során kötődnek, lehetővé téve a leánykromoszómák szabályos mozgását az utódsejtek pólusaihoz.

Mikronukleuszok: kis magvak, amelyek a sejtmagtól külön, azon felül találhatók a sejtekben, és a mitózis vagy meiózis telofázisa során, lemaradó kromoszómatöredékek vagy teljes kromoszómák révén képződnek.

Mitózis: a sejtmag osztódása, amely általában profázisra, prometafázisra, metafázisra, anafázisra és telofázisra osztható fel.

Mitotikus index: a metafázisban lévő sejtek aránya osztva a sejtpopulációban megfigyelt sejtek összes számával; az adott populációban a sejtproliferáció fokát jelzi.

Mutagén: örökletes elváltozást idéz elő a génekben lévő DNS-bázispár szekvenciában vagy szekvenciákban vagy a kromoszómák szerkezetében (kromoszómaaberrációk).

▼**M3**

Nondiszjunkció: a kromatidpárok nem válnak szét, és különülnek el a kifejlődő utódsejtekbe, rendellenes kromoszómaszámmal rendelkező utódsejteket eredményezve.

Poliploidia: ellentétben a csak egyetlen kromoszómát vagy bizonyos kromoszómákat érintő számbeli rendellenességekkel (aneuploidia), poliploidia esetében a teljes kromoszómakészlet(ek) számbeli rendellenessége áll fenn.

Proliferációs index (PI): a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

A sejtszám relatív növekedése (RICC): a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

Relatív populációduplázódás (RPD): a citotoxicitás mérésére használható módszer olyan esetekben, amikor nem alkalmaznak citoB-t (a képletet lásd a 2. függelékben).

Replikációs index (RI): a kezelt tenyészetben tapasztalható sejtciklusok aránya a kezeletlen kontrollhoz képest, az expozíciós időszakban és a helyreállás időszakában (a képletet lásd a 2. függelékben).

Vizsgált vegyi anyag (más néven vizsgált anyag): Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

▼M3

2. függelék

A citotoxicitás értékelésére szolgáló képletek

1. *CitoB alkalmazása esetén* a citotoxicitás értékelését a citokinezis-gátlási proliferációs index (CBPI) vagy replikációs index (RI) alapján kell végezni (16) (58). A CBPI a citoB-expozíció időszaka alatt megmutatja a sejtenkénti sejtciklusok átlagos számát, így alkalmazható a sejtproliferáció kiszámítására. Az RI a kezelt tenyészetekben a sejtmagok viszonylagos számát mutatja meg a kontroll tenyészetekhez képest, így alkalmazható a %-os citosztázis kiszámítására:

$$\%\text{-os citosztázis} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

valamint:

T = a vizsgált vegyi anyaggal kezelt tenyészet

C = vivőanyagos kontrolltenyészet

ahol:

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{egymagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{kéétmagvú sejtek száma}) + (3 \times \text{többmagvú sejtek száma}))}{(\text{sejtek száma összesen})}$$

Tehát az 1-es CBPI (az összes sejt egymagvú) 100 %-os citosztázisnak felel meg.

$$\text{Citosztázis} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{kétmagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{többmagvú sejtek száma})) \div (\text{sejtek összes száma})_T}{((\text{kétmagvú sejtek száma}) + (2 \times \text{többmagvú sejtek száma})) \div (\text{sejtek összes száma})_C} \times 100$$

T = kezelt tenyészetek

C = kontrolltenyészetek

2. Tehát az 53 %-os RI azt jelenti, hogy a kontroll tenyészetben kétmagvú és többmagvú sejtekké osztódott sejtek számához képest a kezelt tenyészetben ennek csak 53 %-a osztódott, vagyis a citosztázis 47 %-os.

3. *Amennyiben citoB-t nem alkalmaznak*, a citotoxicitás értékelésére a sejtszám relatív növekedése (RICC) vagy a relatív populációduplázódás (RPD) ajánlott (58), mivel mindkét módszer figyelembe veszi az osztódott sejtpopuláció arányát.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{a sejtszám növekedése a kezelt tenyészetekben (végsö – kiindulási)})}{(\text{a sejtszám növekedése a kontrolltenyészetekben (végsö – kiindulási)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{a populáció duplázódásának száma a kezelt tenyészetekben})}{(\text{a populáció duplázódásának száma a kontrolltenyészetekben})} \times 100$$

▼M3

ahol:

Populációduplázódás = [log (kezelés utáni sejtszám ÷ kiindulási sejtszám)] ÷ log 2

4. Tehát az 53 %-os RICC vagy RPD 47 %-os citotoxicitást/citosztázist jelez.

5. Proliferációs index (PI) alkalmazásával a citotoxicitás az 1 sejtből (cl1), 2 sejtből (cl2), 3-4 sejtből (cl4) és 5-8 sejtből (cl8) álló telepek megszámlálásával határozható meg.

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. A PI-t a citotoxicitás értékes és megbízható paramétereként alkalmazzák a citoB nélkül *in situ* tenyésztett sejtvonalak esetében is (25) (26) (27) (28).

▼M3

3. függelék

A teljesítmény értékeléséhez ajánlott referenciaanyagok ([1])

Kategória	Vegyi anyag	CAS-szám	EU-szám
1. Metabolikus aktiváció nélkül is aktív klasztogének			
	Citozin-arabinozid	147-94-4	205-705-9
	Mitomicin C	50-07-7	200-008-6
2. Metabolikus aktivációt igénylő klasztogének			
	Benzo(a)pirén	50-32-8	200-028-5
	Ciklofoszfamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugén anyagok			
	Kolhicin	64-86-8	200-598-5
	Vinblasztin	143-67-9	205-606-0
4. Negatív anyagok			
	Di-(2-etilhexil)-ftalát	117-81-7	204-211-0
	Nalidixsav	389-08-2	206-864-7
	Pirén	129-00-0	204-927-3
	Nátrium-klorid	7647-14-5	231-598-3

([1]) A referenciaanyagok a használatra ajánlott vegyi anyagokat képviselik. A referenciaanyagok listájában szereplő vegyi anyagok akkor helyettesíthetők vagy egészíthetők ki, ha azok hatása ismert, ugyanolyan hatásmechanizmussal indukálják a mikronukleusz-képződést, és igazoltan relevánsak az MNvit eljárással vizsgálandó vegyi anyagok szempontjából. A céltól függően olyan hitelesítési vizsgálat végzése is indokolhatja ezt, amelyhez az anyagok széles körét alkalmazzák vagy a vizsgált anyag kémiai csoportja vagy a vizsgált károsodás mechanizmusa alapján egy szűkebb körre összpontosítanak.

▼M3

B.50. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): DA

BEVEZETÉS

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzitizáció egereknél történő meghatározására szolgáló első vizsgálati módszer (B.42.), a lokális nyirokcsomó-vizsgálat (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) átdolgozásra került (1). Az LLNA hitelesítésének részleteit és az ezzel kapcsolatos munka áttekintését publikálták (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Az LLNA során a limfociták proliferációjának mérése radioizotópos timidin vagy jód alkalmazásával történik, ezért amennyiben a radioaktív anyagok beszerzése, használata vagy ártalmatlanítása problémát jelent, a vizsgálat csak korlátozottan alkalmazható. Az LLNA: DA (a Daicel Chemical Industries, Ltd. fejlesztése) az LLNA nem radioaktív változata, amely az adenozin-trifoszfát (ATP) tartalom mennyiségi meghatározását bioluminescencia útján végzi, amely alkalmazható a limfocitaproliferáció indikátoraként. Az LLNA: DA vizsgálati módszert egy szakértőkből álló nemzetközi értékelő testület hitelesítette, vizsgálta felül és ajánlotta olyan módszerként, amely a bőrszenzitizációt okozó, illetve nem okozó vegyi anyagok meghatározására bizonyos megkötésekkel hasznosnak tekinthető (10) (11) (12) (13). A vizsgálati módszer célja a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizáló hatásának állatoknál történő felmérése. E melléklet B.6. fejezete és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása tengerimalac-vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és Bühler-vizsgálatot (14). Az LLNA (e melléklet B.42. fejezete; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) és a két nem radioaktív módosított eljárás, az LLNA: DA (e melléklet B.50. fejezete; az OECD 442. A. vizsgálati iránymutatása) és az LLNA: BrdU-ELISA (e melléklet B.51. fejezete; az OECD 442. B. vizsgálati iránymutatása) egyaránt előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (14) szereplő tengerimalac-vizsgálatnál abból a szempontból, hogy kevesebb állat használatát igényli és kíméletesebb.

2. Az LLNA-hoz hasonlóan az LLNA: DA is a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz értékelésére alkalmas mennyiségi adatokat szolgáltat. Emellett azáltal, hogy a bőrszenzibilizáló anyagokat a DNS radioaktív jelölése nélkül lehet kimutatni, a munka során kiküszöbölhető a radioaktivitásnak való kitettség, valamint a hulladék ártalmatlanításának problémája. Ez viszont az egerek nagyobb arányú használatát jelentheti a bőrszenzibilizáló anyagok kimutatására, ami a bőrszenzibilizáló képesség vizsgálata során tovább csökkenthetné a tengerimalacok használatát (pl. B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14).

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA: DA egy módosított LLNA módszer, amely bizonyos korlátozások mellett a potenciális bőrszenzibilizáló vegyi anyagok azonosítására szolgál. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az LLNA vagy a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (14) helyett minden esetben az LLNA: DA-t kell alkalmazni, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést (10) (11). A vizsgálat elvégzése előtt a vizsgáló laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló

▼M3

összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezetileg rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy az LLNA: DA módszer alkalmazható-e a vizsgált anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyianyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn [lásd az 5. bekezdést]), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.

5. Az LLNA: DA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor a tengerimalac-vizsgálatokhoz képest (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) lehetővé teszi az állatok ilyen célú felhasználásának csökkentését (14). Továbbá az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve az LLNA: DA jelentősen kíméletesebb (kevesebb fájdalmat és szenvedést okoz), mivel a B.6. fejezet és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásával ellentétben az LLNA: DA esetében nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. A B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglalt módszerrel (14) szembeni előnyei ellenére az LLNA: DA módszernek vannak bizonyos korlátai, amelyek szükségessé tehetik a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglaltak alkalmazását (pl. bizonyos fémek vizsgálata, álpozitív eredmények bizonyos bőrirritáló anyagokkal [például bizonyos felületaktív anyagokkal] (6) [1, illetve e melléklet B.42. fejezete], vagy a vizsgált anyag oldhatósága). Továbbá az olyan funkcionális csoportokat tartalmazó anyagcsoportok, illetve anyagok, amelyek potenciális zavaró tényezőként szerepelnek (16) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása (14)) használatát. Az LLNA esetében megállapított korlátozásokat (1, illetve e melléklet B.42. fejezete) az LLNA: DA módszerre is ajánlott alkalmazni (10). Ezenkívül az LLNA: DA módszer nem feltétlenül alkalmas olyan anyagok vizsgálatára, amelyek befolyásolják az ATP szintjét (például ATP-gátlóként ható anyagok) vagy az intracelluláris ATP pontos mérését (például az ATP-t bontó enzimek jelenléte vagy extracelluláris ATP jelenléte a nyirokcsomóban). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA: DA bármilyen anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek az anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA: DA pontosságát. Emellett abban az esetben, ha a stimulációs indexre (SI) kapott érték 1,8 és 2,5 közé esik figyelembe kell venni a határértéken lévő pozitív eredmények lehetőségét is (lásd a 31–32. bekezdést). Ez egy legalább 1,8 értékű stimulációs indexszel rendelkező, 44 anyagot magában foglaló hitelesítési adatbázison alapul (lásd a 6. bekezdést), amely esetében az LLNA: DA módszer helyesen azonosította mind a 32, az LLNA módszer szerint szenzibilizáló anyagot, de hibásan azonosított három anyagot az LLNA módszerrel nem szenzibilizálóként meghatározott, 1,8 és 2,5 közötti SI-értékkel (vagyis határértéken lévő pozitív) rendelkező 12 anyagok közül (10). Mivel azonban az SI-értékek beállításához és a vizsgálat prediktív jellemzőinek kiszámításához ugyanazt az adatállományt alkalmazták, a megadott eredmények túlbecsülhetik a valós prediktív jellemzőket.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

6. Az LLNA: DA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaproliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokelvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dózisával és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy a vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt csoportban mért proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát,

▼M3

amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább ≥ 1,8-nek kell lennie ahhoz, hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő további vizsgálata. Az itt leírt eljárások az ATP tartalom biolumineszcenciával történő mérésén alapulnak (az ATP-ről ismert, hogy korrelál az élő sejtek számával) (17), amely az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedését jelzi (18) (19). A bioluminescens módszer során alkalmazott luciferáz enzim ATP-ből és luciferinből fény képződését katalizálja a következő reakció lezajlásával:

$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxiluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + fény$$

A kibocsátott fény intenzitása lineáris összefüggést mutat az ATP koncentrációjával, és luminométerrel mérhető. A luciferin-luciferáz vizsgálat széles körében alkalmazott, érzékeny módszer az ATP mennyiségi meghatározására (20).

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A LLNA: DA módszerhez a hitelesítési vizsgálatokat kizárólag a CBA/J törzzsel végezték, amely ezért preferált törzsnek tekintendő (12) (13). Fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8-12 hétnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA: DA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (21), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C ± 3 °C-nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálnak, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

▼M3

A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak olyan szenzibilizáló tesztanyagként, amelynél a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mert ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA: DA módszer elvégzése előtt ajánlott egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd a 12. bekezdést). A pozitív kontrollnak az LLNA: DA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 1,8-del növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózisát úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (például SI > 10 már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 101-86-0) és a 25 %-os eugenol (CAS-szám: 97-53-0) aceton:olívaolaj (4:1, v/v) arányú keverékében. Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.

12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az LLNA: DA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA: DA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.

13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA: DA vizsgálati módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítása a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.

14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálatai közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelőségére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetők azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (22).

▼M3

15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiailag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (23). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagos kontrollt is vizsgálni kell.

16. Azokban az estekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:

— szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,

— ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,

— az LLNA: DA módszerrel kapott alátámasztó adatok,

— egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.

18. A dózist és a vivőanyagot a (2) és (24) számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisok kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsort megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikai-kémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (24) (25). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd 21–24. bekezdés).

19. A vivőanyagnak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1 v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (6), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofil anyagokat olyan vivőanyag-rendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.

▼M3

20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 33. bekezdést). Emellett csak akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (22). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés rendszeresítése állatjóléti előnyökkel jár azáltal, hogy elkerülhető a vizsgálatok megismétlése abban az esetben, amikor a vizsgált anyagról eredetileg csak egyféleképpen gyűjtötték az adatokat (pl. összevont állatkísérletes adatok), míg a szabályozó hatóság később eltérő követelményeket állít fel (pl. egyedi állatokon alapuló adatok).

Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA: DA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA: DA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd a 23. bekezdést) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózisnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.

22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA: DA vizsgálathoz hasonló körülmények között kell végezni, eltekintve attól, hogy nem kell a nyirokcsomó proliferációt értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (8. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (25) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 7. napon (az exterminálás előtt 24 órával) és a 8. napon. A 8. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi irritációnak minősül a legalább ≥ 3-as pontszámú bőrpír és/vagy legalább ≥ 25 %-os fülvastagság a vizsgálat bármely napján (26) (27). A fő LLNA: DA vizsgálathoz azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentrációsorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

1. táblázat

Bőrpír (erythema) pontszámai

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2

▼M3

Megfigyelés	Pontszám
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (26) (27), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (30) (31) (32) (33) (34).

24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (35), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA: DA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekció, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyzörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Továbbá az értékelés során figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömeg-csökkenést az 1. naptól a 8. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévõ vagy súlyos fájdalmak és szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (36).

A fő vizsgálat kísérleti ütemterve

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

— *1. nap:* Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyük fel 1 % nátrium-lauril-szulfát (SLS) vizes oldatát mindkét fül dorzális oldalára egy SLS-oldatba mártott kefével, és négy-öt húzással be kell fedni a fülek teljes dorzális felszínét. Az SLS-tal végzett kezelés után egy órával vigyünk fel a vizsgált anyag megfelelő hígításából 25 µl-t, valamint a vivőanyagot önmagában, illetve pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.

— *2., 3. és 7. nap:* Az 1. napnak megfelelően ismételjük meg az SLS 1 %-os vizes oldatával végzett előkezelést, valamint a vizsgált anyag felviteli eljárását.

— *4., 5. és 6. nap:* Nincs kezelés.

— *8. nap:* Fel kell jegyezni minden állat testtömegét és minden klinikai megfigyelést. Az állatokat az alkalmazás megkezdése után körülbelül 24–30 órával a 7. napon humánus módon exterminájuk. Mindegyik egér füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és tegyük be azokat állatonként külön-külön foszfáttal pufferelt sóoldatba (PBS). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrák az (22) hivatkozásban találhatók. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár elölés utáni füldarabsúly-meghatározással).

▼M3

A sejtszuszpenziók elkészítése

26. Mindegyik egér esetében el kell készíteni a két oldalról kimetszett nyirokcsomó-sejtek (LNC) különálló sejtekből álló szuszpenzióját; ehhez a nyirokcsomót két üveg tárgylemez közé kell helyezni, és a nyirokcsomók összetöréséhez enyhe nyomást kell rá gyakorolni. Miután meggyőződtünk róla, hogy a szövet vékony rétegben szétterjedt, válasszuk szét a két tárgylemezt. Szuszpendáljuk a két tárgylemezen található szövetet PBS-ben; ehhez a tárgylemezeket Petri-csésze fölött ferdén tartva öblítsük le PBS-oldattal, eközben sejtkaparóval kaparjuk le a szövetet a tárgylemezről. A negatív kontrollként szolgáló állatok nyirokcsomói kisméretűek, ezért az SI-értékre gyakorolt mesterséges hatások elkerülése érdekében fontos az elővigyázatos kezelés. A két tárgylemez leöblítéséhez összesen 1 ml térfogatú PBS-oldatot kell használni. A Petri-csészében lévő LNC-szuszpenziót a sejtkaparóval enyhén homogenizálni kell. Ezután az LNC-szuszpenzióból mikropipettával 20 µl-nyi adagot fel kell szívni, ügyelve arra, hogy szemmel látható membránt ne szívjunk fel, majd el kell keverni 1,98 ml PBS-oldattal, hogy 2 ml-nyi mintát kapjunk. Ezután ugyanilyen eljárással újabb 2 ml-es mintát kell készíteni, hogy minden állat esetében két minta álljon rendelkezésre.

A sejtproliferáció meghatározása (a limfociták ATP-tartalmának mérése)

27. A nyirokcsomók ATP-tartalmában bekövetkezett növekedést a luciferin/luciferáz módszerrel ATP-mérési készlet segítségével határozzuk meg, amely a bioluminescenciát relatív lumineszcencia egységekben (RLU) méri. A vizsgálat idejének az állat exterminálásától az ATP-tartalom méréséig mindegyik állat esetében azonosnak, körülbelül 30 percesnek kell lennie, ugyanis az ATP tartalom az állat exterminálása után idővel feltételezhetően fokozatosan csökken (12). Tehát az eljárások sorát az aurikuláris nyirokcsomók kimetszésétől az ATP méréséig, az előre meghatározott, mindegyik állat esetében azonos ütemterv szerint 20 percen belül el kell végezni. Az ATP-lumineszcenciát mindegyik 2 ml-es mintában mérni kell, hogy minden állat esetében összesen két ATP mérési eredmény álljon rendelkezésre. Ezután meghatározzuk az átlagos ATP-lumeneszcenciát, és a további számításokhoz ezt alkalmazzuk (lásd a 30. bekezdést).

MEGFIGYELÉSEK

Klinikai megfigyelések

28. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (36).

Testtömeg

29. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

30. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket átlagos stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos RLU-értéket el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos állatonkénti RLU-értékével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1.

▼M3

31. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index ≥ 1,8 (10). Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény (vagyis amikor az SI-érték 1,8 és 2,5 között van) pozitívnak tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (2) (3) (37).

32. Az 1,8 és 2,5 közötti SI-vel járó, határértéken lévő pozitív válaszreakciók esetében a felhasználók dönthetnek úgy, hogy az eredmények pozitivitásának megerősítéséhez további információkat – például a dózis-válasz összefüggést, szisztémás toxicitás vagy nagyfokú irritáció jelét, illetve adott esetben a statisztikai szignifikanciát az SI értékekkel együtt – kívánnak figyelembe venni (10). Figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait is, köztük azt, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e nagyfokú bőrirritációt egereknél, illetve a megfigyelt dózis-válasz összefüggés jellegét. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (4) hivatkozásban.

33. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy William-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett „kiugró adatokkal”) és azok nélkül.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

34. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, feltüntetve az egyedi állatok RLU-értékeit, a csoport átlagos RLU/állat értékét, a hozzá tartozó hibamutatóval (például SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokban kapott átlagos stimulációs indexeket (SI) összehasonlítva a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoport értékeivel.

Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

— azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, stabilitás, oldhatóság),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

— azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat),

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

▼M3

Kísérleti állatok:

— CBA egértörzs származása,

— az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

— az ATP készlet származása, tételszáma, a gyártó minőségbiztosítási/minőség-ellenőrzési adatai,

— a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),

— a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,

— a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

— a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,

— a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

— a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,

— a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokra vonatkozó adatai,

— ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

— az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és az exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,

— a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan,

— az állat exterminálásának időpontja és az ATP mérésének időpontja az egyes állatok esetében,

— az állatonkénti RLU-értékek és dóziscsoportonkénti SI-értékek táblázata,

— átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti RLU-értékek esetében, az egyes kezelés csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban,

▼M3

— a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontrollcsoportokban egyaránt figyelembe veszi,

— dózis-válasz összefüggés,

— adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

— rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRP-Rept2009.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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (38).

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionalitással kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt hatástartományban ismert hatásúnak kell lennie.

Álnegatív eredmény: Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített anyag, amely valójában pozitív vagy aktív.

Álpozitív: Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített anyag, amely valójában negatív vagy inaktív.

Veszély: Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyagok alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (38).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (38).

Kiugró érték: A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

Minőségbiztosítás: Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

Megbízhatóság: Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (38).

Bőrszenzibilizáció: Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

Stimulációs index (SI): Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag): Bármely anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

▼M3

B.51. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER (LLNA): BRDU-ELISA

BEVEZETÉS

1. Az OECD vegyi anyagok vizsgálatára vonatkozó iránymutatásait és az uniós vizsgálati módszereket időnként felülvizsgálják a tudományos fejlődés, a változó szabályozási igények és állatjóléti megfontolások fényében. A bőrszenzibilizáció egereknél történő meghatározására szolgáló első vizsgálati módszer (B.42.), a lokális nyirokcsomó-vizsgálat (LLNA; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) átdolgozásra került (e melléklet 1. és B.42. fejezete). Az LLNA hitelesítésének részleteit és az ezzel kapcsolatos munka áttekintését publikálták (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Az LLNA során a limfociták proliferációjának mérése radioizotópos timidin vagy jód alkalmazásával történik, ezért amennyiben a radioaktív anyagok beszerzése, használata vagy ártalmatlanítása problémát jelent, a vizsgálat csak korlátozottan alkalmazható. Az LLNA: BrdU-ELISA (enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) az LLNA vizsgálati módszer nem radioaktív változata, amely radioaktívan nem jelölt 5-bromo-2-dezoxiuridin (BrdU) (Chemical Abstracts Service [CAS] szám: 59-14-3) felhasználásával, ELISA alapú vizsgálati rendszerben méri a limfocitaproliferációt. Az LLNA: BrdU-ELISA-t vizsgálati módszert egy szakértőkből álló független nemzetközi értékelő testület hitelesítette, vizsgálta felül és ajánlotta olyan módszerként, amely a bőrszenzibilizációt okozó, illetve nem okozó vegyi anyagok meghatározására bizonyos megkötésekkel hasznosnak tekinthető (10) (11) (12). A vizsgálati módszer célja a vegyi anyagok (anyagok és keverékek) bőrszenzibilizáló hatásának állatoknál történő felmérése. E melléklet B.6. fejezete és az OECD 406. vizsgálati iránymutatása tengerimalac-vizsgálatokat alkalmaz, nevezetesen a tengerimalac-maximizációs módszert és Bühler-vizsgálatot (13). Az LLNA (e melléklet B.42. fejezete; az OECD 429. vizsgálati iránymutatása) és a két nem radioaktív módosított eljárás, az LLNA: BrdU-ELISA (e melléklet B.51. fejezete; az OECD 442. B. vizsgálati iránymutatása) és az LLNA: DA (e melléklet B.50. fejezete; az OECD 442. A. vizsgálati iránymutatása) egyaránt előnyösebb a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (13) szereplő tengerimalac-vizsgálatnál abból a szempontból, hogy kevesebb állat használatát igényli és kíméletesebben.

2. Az LLNA-hoz hasonlóan az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálat is a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja, és a dózis-válasz értékelésére alkalmas mennyiségi adatokat szolgáltat. Emellett azáltal, hogy a bőrszenzibilizáló anyagokat a DNS radioaktív jelölése nélkül lehet kimutatni, a munka során kiküszöbölhető a radioaktivitásnak való kitettség, valamint a hulladék ártalmatlanításának problémája. Ez viszont az egerek nagyobb arányú használatát jelentheti a bőrszenzibilizáló anyagok kimutatására, ami a bőrszenzibilizáló képesség vizsgálata során tovább csökkenthetné a tengerimalacok használatát (pl. B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati irányelve) (13).

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

3. Az alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben található.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK ÉS KORLÁTOK

4. Az LLNA: BrdU-ELISA egy módosított LLNA (helyi nyirokcsomó-vizsgálati) módszer, amely bizonyos korlátozások mellett a bőrön túlérzékenységi reakciót kiváltó vegyi anyagok azonosítására szolgál. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az LLNA vagy a tengerimalac-vizsgálat (lásd B.6. fejezet, az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) (13) helyett minden esetben az LLNA: BrdU-ELISA-t kell alkalmazni, inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer ugyanolyan hasznos, és olyan alternatív módszerként alkalmazható, amely esetében a pozitív és negatív eredmények általában már nem igényelnek további megerősítést (10) (11). A vizsgálat elvégzése előtt

▼M3

a vizsgáló laboratóriumnak a vizsgált anyagról rendelkezésre álló összes adatot figyelembe kell vennie. Ezen információk közé tartozik a vizsgált anyag azonosítása, kémiai szerkezete, fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint a vizsgált anyaggal korábban végzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei és a szerkezetileg rokon vegyi anyagok toxikológiai adatai is. Mindezen információk figyelembevételével dönthető el, hogy az LLNA: BrdU-ELISA módszer alkalmazható-e a vizsgált anyag esetében (tekintve, hogy bizonyos vegyianyag-típusoknál inkompatibilitás áll fenn [lásd az 5. bekezdést]), és milyen dózist célszerű választani a vizsgálatokhoz.

5. Az LLNA: BrdU-ELISA *in vivo* módszer, következésképpen nem küszöbölhető ki vele az állatok felhasználása az allergiás kontakt szenzibilizáló hatás vizsgálata során. Ugyanakkor a tengerimalac-vizsgálatokhoz képest (B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása) lehetővé teszi az állatok ilyen célú felhasználásának csökkentését (13). Továbbá az állatok kontakt szenzibilizációs vizsgálatok során történő felhasználásának módját tekintve az LLNA: BrdU-ELISA jelentősen kíméletesebb, mivel a B.6. fejezetben és a 406-os OECD vizsgálati irányelvben foglaltakkal ellentétben az LLNA: BrdU-ELISA esetében nincs szükség indukált bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. Továbbá az LLNA: BrdU-ELISA során a tengerimalac-maximizációs vizsgálattal ellentétben nincs szükség adjuváns alkalmazására sem (e melléklet B.6. fejezete, 13). Az LLNA: BrdU-ELISA alkalmazásával tehát csökkenthető az állatok szenvedése. A B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában (13) foglalt módszerrel szembeni előnyei ellenére az LLNA: BrdU-ELISA módszernek vannak bizonyos korlátai, amelyek szükségessé tehetik a B.6. fejezetben és az OECD 406. vizsgálati iránymutatásában foglaltak alkalmazását (pl. bizonyos fémek vizsgálata, álpozitív eredmények bizonyos bőrirritáló anyagokkal [például bizonyos felületaktív anyagokkal] (6) [1, illetve e melléklet B.42. fejezete], vagy a vizsgált anyag oldhatósága). Továbbá az olyan funkcionális csoportokat tartalmazó anyagcsoportok, illetve anyagok, amelyek potenciális zavaró tényezőként szerepelnek (15) szükségessé tehetik a tengerimalac-vizsgálatok (vagyis a B.6. fejezet; az OECD 406. vizsgálati iránymutatása (13)) használatát. Az LLNA esetében megállapított korlátozásokat (1, illetve e melléklet B.42. fejezete) az LLNA: BrdU-ELISA módszerre is javasolt alkalmazni (10). E meghatározott hiányosságokon kívül, az LLNA: BrdU-ELISA bármilyen vegyi anyag vizsgálatára megfelelő, kivéve, ha ezek a vegyi anyagok olyan tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek befolyásolják az LLNA: BrdU-ELISA pontosságát. Emellett abban az esetben, ha a stimulációs indexre (SI) kapott érték 1,6 és 1,9 közé esik (lásd a 31–32. bekezdést) figyelembe kell venni a határértéken lévő pozitív eredmények lehetőségét. Ez egy legalább 1,6 értékű stimulációs indexszel rendelkező, 43 anyagot magában foglaló hitelesítési adatbázison alapul (lásd a 6. bekezdést), a mely esetében az LLNA: BrdU-ELISA módszer helyesen azonosította mind a 32, az LLNA módszer szerint szenzibilizáló anyagot, de hibásan azonosított két anyagot az LLNA módszerrel nem szenzibilizálóként meghatározott, 1,6 és 1,9 közötti SI-értékkel (vagyis határértéken lévő pozitív értékkel) rendelkező 11 anyag közül (10). Mivel azonban az SI-értékek beállításához és a vizsgálat prediktív jellemzőinek kiszámításához ugyanazt az adatállományt alkalmazták, a megadott eredmények túlbecsülhetik a valós prediktív jellemzőket.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

6. Az LLNA: BrdU-ELISA módszer hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocitaproliferációt indukálnak a vizsgált anyag alkalmazási területének nyirokelvezetéséről gondoskodó nyirokcsomókban. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott allergén dózisával és erősségével, valamint egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció kvantitatív méréséhez. A proliferációt úgy mérik, hogy az egyes vizsgálati csoportokban mért átlagos proliferációt összehasonlítják a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban (VK) mért átlagos proliferációval. Meghatározzák az egyes kezelt csoportokban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mért átlagos proliferáció arányát, amelyet stimulációs indexnek (SI) neveznek, és amelynek legalább $\geq$ 1,6-nek kell lennie ahhoz,

▼M3

hogy indokolt legyen a vizsgált anyag potenciális bőrszenzibilizáló anyagként történő további vizsgálata. Az itt leírt eljárások a BrdU tartalom mérésén alapulnak, amely jelzi az elvezető aurikuláris nyirokcsomókban lévő proliferáló sejtek számának növekedését. A BrdU egy timidinanalóg, amely hasonlóan beépül a proliferáló sejtek DNS-ébe. A BrdU beépülését ELISA-val mérjük, amely peroxidázzal is jelölt BrdU-specifikus antitestet alkalmaz. A szubsztrát hozzáadáskor a peroxidáz reakcióba lép a szubsztráttal, és színes termék képződik, amelynek mennyisége meghatározott abszorbancia mellett mikrotiterlemez-leolvasó segítségével mérhető.

A VIZSGÁLAT LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

7. Ehhez a vizsgálathoz az egér a választandó faj. A LLNA: BrdU-ELISA módszerhez a hitelesítési vizsgálatokat kizárólag a CBA/JN törzzsel végezték, amely ezért preferált törzsnek tekintendő (10) (12). Fiatal felnőtt nullipara és nem vemhes nőstény egereket kell használni. A vizsgálat elején az állatok korának 8-12 hétnek kell lennie, az állatok testtömege között az eltérésnek minimálisnak kell lennie, és a testtömeg nem haladhatja meg az átlagos testtömeg 20 %-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy az LLNA:BrdU-ELISA módszerrel kapott válaszreakcióban nincsenek jelentős törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek, akkor más törzsek, illetve hím állatok is alkalmazhatók.

Az állatok tartásának és etetésének körülményei

8. Az egereket csoportosan kell tartani (16), kivéve, ha az egyedenkénti tartásra megfelelő tudományos indok merül fel. A kísérleti állatok tartásául szolgáló helyiség hőmérsékletének 22 °C ± 3 °C-nak kell lennie. Noha a helyiség relatív páratartalmának legalább 30 %-nak kell lennie, és – a takarítás időtartamától eltekintve – lehetőség szerint nem haladhatja meg a 70 %-ot, a célértéknek 50–60 % között kell lennie. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos, 12 órás sötét periódusok váltakozásával. Az etetéshez a szokásos laboratóriumi takarmány alkalmazható korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

Az állatok előkészítése

9. Az állatokat véletlenszerűen választják ki, majd egyedi azonosítóval látják el (viszont az állat fülén semmiféle azonosító nem alkalmazható), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartják őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot megvizsgálnak, hogy meggyőződjenek arról, nincs rajtuk látható bőrsérülés.

A dózisok előkészítése

10. A szilárd halmazállapotú vegyi anyagokat az egér fülén történő alkalmazás előtt oldószerben/vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, és szükség esetén hígítani kell. A folyadék halmazállapotú vegyi anyagokat hígítatlanul vagy az adagolás előtt hígított formában lehet alkalmazni. A nem oldható vegyi anyagokat, például az orvosi eszközökben általánosan előforduló anyagokat megfelelő oldószerben történő agresszív extrakciónak kell kitenni, hogy a vizsgálat során az egér fülén való alkalmazás előtt az összes kivonható összetevőt feltárjuk. A vizsgált anyagokat naponta kell elkészíteni, kivéve, ha stabilitási adatok igazolják, hogy a tárolás elfogadható.

A megbízhatóság ellenőrzése

11. A vizsgálat megfelelő teljesítményének megfelelő és reprodukálható szenzitivitással adott válaszreakciókkal történő igazolására pozitív kontrollanyagokat (PK) alkalmaznak; ezek olyan szenzibilizáló tesztanyagok, amelyek esetében a válaszreakció mértéke pontosan meghatározott. Pozitív kontroll párhuzamos vizsgálata ajánlott, mivel ez igazolja, hogy a laboratórium megfelelő szakértelemmel végzi az egyes vizsgálatokat, és lehetővé teszi a laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti reprodukálhatóság és összehasonlíthatóság értékelését. Néhány szabályozó hatóság szintén előírja a pozitív kontroll minden vizsgálat során történő alkalmazását, ezért az LLNA: BrdU-ELISA módszer elvégzése előtt ajánlott

▼M3

egyeztetni az illetékes hatóságokkal. Ennek megfelelően javasolt a pozitív kontroll rutinszerű párhuzamos vizsgálata, hogy elkerülhetőek legyenek az olyan további állatkísérletek, amelyeket a pozitív kontrollt csak időszakosan alkalmazó laboratórium az előírásoknak való megfelelés érdekében végezne (lásd 12. bekezdés). A pozitív kontrollnak az LLNA: BrdU-ELISA módszerrel olyan expozíciós szint mellett kell pozitív válaszreakciót adnia, amely a negatív kontrollcsoporthoz (NK) képest várhatóan legalább 1,6-del növeli a stimulációs indexet (SI). A pozitív kontroll dózisát úgy kell megválasztani, hogy ne okozzon túlzott bőrirritációt vagy szisztémás toxicitást, és az indukció reprodukálható, de ne túl nagymértékű legyen (például SI > 14 már túlzottnak tekinthető). Az előnyben részesítendő pozitív kontrollanyagok a 25 %-os hexil-cinnemaldehid (CAS-szám: 101-86-0) és a 25 %-os eugenol (CAS-szám: 97-53-0) aceton:olívaolaj (4:1, v/v) arányú keverékében. Adódhatnak olyan körülmények, amelyek fennállásakor, megfelelő indoklás esetén a fenti kritériumoknak megfelelő más pozitív kontrollanyagok is alkalmazhatók.

12. Bár ajánlott a pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata, lehetnek azonban olyan helyzetek, amikor a pozitív kontroll időszakos (például legalább 6 havonta végzett) vizsgálata elfogadható lehet az olyan, az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálatot rendszeresen (vagyis legalább havonta egyszeri gyakorisággal) végző laboratóriumok esetében, amelyek rendelkeznek a pozitív kontrollok igazolt, historikus adatbázisával, és ezzel bizonyítható, hogy a laboratórium a pozitív kontrollokkal képes reprodukálható és pontos eredményeket előállítani. Az LLNA: BrdU-ELISA módszerben való jártasság alátámasztható a pozitív kontrollal megfelelő időszakon belül (kevesebb mint egy éve) végzett legalább 10 független vizsgálat során kapott következetesen pozitív eredményekkel.

13. Pozitív kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata minden alkalommal szükséges, valahányszor az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálati módszerében változtatást hajtanak végre (például a képzett személyzet, a vizsgálati eljárás során használt anyagok és/vagy reagensek, a vizsgálati eszközök, a kísérleti állatok beszerzési forrásának megváltoztatása), és ezeket a változásokat dokumentálni kell a laboratóriumi jelentésekben. Figyelembe kell venni, hogy ezek a változtatások mennyiben befolyásolják a korábban létrehozott historikus adatbázis megfelelőségét, és el kell dönteni, hogy szükséges-e új historikus adatbázis felállítása a pozitív kontroll eredményei következetességének dokumentálása érdekében.

14. A vizsgálatot végző személyeknek tisztában kell lenniük azzal, hogy amennyiben a párhuzamos vizsgálat helyett a pozitív kontrollok időszakos vizsgálata mellett döntenek, ez hatással lehet a pozitív kontrollok időszakos vizsgálatai közötti időszakokban, párhuzamos pozitív kontroll vizsgálata nélkül előállított negatív vizsgálati eredmények megfelelőségére és elfogadhatóságára. Ha például a pozitív kontrollal végzett időszakos vizsgálat álnegatív eredményt adott, akkor megkérdőjelezhetők azok a negatív eredmények, amelyek az utolsó elfogadható eredményű és az elfogadhatatlan eredményű időszakos pozitív kontroll vizsgálat között eltelt időszakban keletkeztek. Az ilyen következmények jelentőségét körültekintően mérlegelni kell annak eldöntésekor, hogy pozitív kontrollokat párhuzamosan vagy csak időszakosan vizsgáljanak-e. Szintén megfontolandó a kevesebb állat használata a párhuzamos pozitív kontrollcsoportban, amennyiben ez tudományosan indokolt, és a laboratóriumra specifikus historikus adatok alapján a laboratórium igazolja, hogy megfelelő a kevesebb egér használata (17).

15. Bár a pozitív kontrollt olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismert, hogy következetes válaszreakciót vált ki (például aceton:olívaolaj; 4:1, v/v arányú keveréke), lehetnek olyan szabályozási helyzetek, amikor nem szokványos vivőanyagokban (klinikailag/kémiailag releváns készítmény) történő vizsgálat elvégzésére is szükség van (18). Amennyiben a párhuzamos pozitív kontrollt a vizsgált anyagétól eltérő vivőanyagban vizsgálják, akkor a párhuzamos pozitív kontrollal együtt egy külön vivőanyagos kontrollt is vizsgálni kell.

▼M3

16. Azokban az estekben, amikor egy bizonyos vegyi csoportba tartozó vizsgált anyagokat vagy a válaszreakciók tartományát értékelik, szintén hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása annak igazolására, hogy a vizsgálati módszer megfelelően működik az ilyen típusú vizsgált anyagok bőrszenzibilizáló hatásának kimutatására. A megfelelő referenciaanyagoknak a következő tulajdonságokkal kell rendelkezniük:

— szerkezeti és funkcionális hasonlóság a vizsgált anyag csoportjával,

— ismert fizikai/kémiai tulajdonságok,

— az LLNA: BrdU-ELISA módszerrel kapott alátámasztó adatok,

— egyéb állatmodellekből és/vagy emberből származó alátámasztó adatok.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

Az állatok száma és a dózisszintek

17. Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell használni, és a vizsgált anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá párhuzamos negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgált anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint egy pozitív kontroll csoportot kell alkalmazni (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésben foglaltakat). Megfontolandó a pozitív kontroll többféle dózisának vizsgálata, különösen, ha a pozitív kontroll vizsgálatát időszakosan végzik. A kontrollcsoportban lévő állatokkal ugyanúgy kell bánni és dolgozni, mint a kezelt csoportokban lévőkkel, azzal a kivétellel, hogy az állatokat nem kezelik a vizsgált anyaggal.

18. A dózist és a vivőanyagot a 2. és 19. számú hivatkozásokban megadott ajánlások alapján kell kiválasztani. Az egymás utáni dózisok kiválasztása általában megfelelő koncentrációsorból, például 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % stb. történik. Az alkalmazott koncentrációsort megfelelő tudományos megfontolások alapján kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált anyagról esetlegesen rendelkezésre álló valamennyi toxikológiai információt (például akut toxicitás és bőrirritáció), valamint szerkezeti és fizikokémiai adatot, hogy a legmagasabb koncentrációval a lehető legnagyobb expozíciót idézzük elő, amely még nem okoz szisztémás toxicitást és/vagy túlzott mértékű lokális bőrirritációt (19) (20, illetve e melléklet B.4. fejezete). Ilyen jellegű információk hiányában szükséges lehet a megelőző előszűrő vizsgálat (lásd a 21–24. bekezdést).

19. A vivőanyagnak nem szabad megzavarnia vagy befolyásolnia a vizsgálat eredményét, és aszerint kell kiválasztani, hogy a vizsgált anyag oldhatósága a lehető legnagyobb koncentráció elérése érdekében maximális legyen, ugyanakkor a vizsgált anyag felvitelére alkalmas oldatot/szuszpenziót kapjunk. A javasolt vivőanyagok az aceton:olívaolaj (4:1 v/v) keveréke, N,N-dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (6), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben további kontrollként szükséges lehet valamely klinikai szempontból releváns oldószer használata, vagy annak a kereskedelmi formulának az alkalmazása, amelyben a vizsgált anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy megfelelő szolubilizáló szerek (pl. 1 % Pluronic® L92) alkalmazásával a hidrofil vizsgált anyagokat olyan vivőanyagrendszerbe építsük be, amely benedvesíti a bőrt, de nem folyik le azonnal. A teljesen vizes alapú vivőanyagokat tehát kerülni kell.

▼M3

20. A nyirokcsomók egyedenként történő feldolgozása lehetővé teszi az egyedek közötti variabilitás, valamint a vizsgált anyaggal és a vivőanyaggal kezelt csoport eredményeinek statisztikai összehasonlítását (lásd a 33. bekezdést). Emellett csak akkor lehet értékelni, hogy lehetséges-e csökkenteni a pozitív kontrollcsoportban lévő egerek számát, ha az egyedi állatokra vonatkozóan gyűjtünk adatokat (17). Ezen túlmenően, egyes szabályozó hatóságok is megkövetelik az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtést. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés rendszeresítése állatjóléti előnyökkel jár azáltal, hogy elkerülhető a vizsgálatok megismétlése abban az esetben, amikor a vizsgált anyagról eredetileg csak egyféleképpen gyűjtötték az adatokat (pl. összevont állatkísérletes adatok), míg a szabályozó hatóság később eltérő követelményeket állít fel (pl. egyedi állatokon alapuló adatok).

Előszűrő vizsgálat

21. A legmagasabb vizsgálandó dózis meghatározását lehetővé tevő információ hiányában (lásd a 18. bekezdést) az LLNA: BrdU-ELISA módszerhez alkalmazandó megfelelő dózisszint megállapítása érdekében előszűrő vizsgálatot kell végezni. Az előszűrő vizsgálat célja, hogy támpontot adjon az LLNA: BrdU-ELISA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózis kiválasztásához, amennyiben a szisztémás toxicitást (lásd a 24. bekezdést) és/vagy nagyfokú bőrirritációt (lásd a 23. bekezdést) okozó koncentrációra vonatkozó információk nem állnak rendelkezésre. Folyadékok esetében a legmagasabb vizsgált dózisnak 100 %-os koncentrációnak kell lennie, szilárd anyagok vagy szuszpenziók esetében pedig a lehetséges maximális koncentrációnak.

22. Az előszűrő vizsgálatot a fő LLNA: BrdU-ELISA vizsgálathoz hasonló körülmények között kell végezni, eltekintve attól, hogy nem kell a nyirokcsomó-proliferációt értékelni, valamint dóziscsoportonként kevesebb állat használható. Dóziscsoportonként egy vagy két állat javasolt. Az egereket a szisztémás toxicitás, illetve az alkalmazás helyén fellépő helyi irritáció jeleinek szempontjából naponta megfigyelik. A testtömeget a vizsgálat előtt és az állat exterminálása előtt is (6. nap) feljegyzik. A bőrpírt az egerek mindkét fülén vizsgálják és pontozzák az 1. táblázat (20, illetve e melléklet B.4. fejezete) szerint. A fülvastagság értékeit egy vastagságmérővel (például digitális mikrométer, vagy Peacock Dial vastagságmérő) állapítják meg az 1. napon (az adagolás előtt), a 3. napon (hozzávetőleg 48 órával az első dózis után), valamint a 6. napon. A 6. napon a fülvastagságot ezen kívül a fülből lyukasztással eltávolított szövet tömegének meghatározásával is meg lehet állapítani, amit az állat exterminálása után kell elvégezni. Nagyfokú helyi irritációnak minősül a legalább ≥ 3-as pontszámú bőrpír és/vagy legalább ≥ 25 %-os fülvastagság a vizsgálat bármely napján (21) (22). A fő LLNA: BrdU-ELISA vizsgálathoz azt a dózist kell maximális dózisként választani, amely az előszűrés során alkalmazott koncentrációsorban (lásd a 18. bekezdést) a szisztémás toxicitást és/vagy nagyfokú helyi bőrirritációt okozó koncentrációnál eggyel alacsonyabb.

1. táblázat

Bőrpír (erythema) pontszámai

Megfigyelés	Pontszám
Nincs erythema	0
Nagyon enyhe erythema (alig észlelhető)	1
Jól körülírt erythema	2

▼M3

Megfigyelés	Pontszám
Közepes-súlyos erythema	3
Súlyos (céklavörös elszíneződés), pörkképződéig terjedő erythema, amely lehetetlenné teszi az erythema besorolását	4

23. A 25 %-os fülvastagság-növekedésen felül (21) (22), a bőrirritáló anyagok LLNA módszerrel végzett kimutatásához a kezelt állatok fülvastagságának kontrollcsoporthoz viszonyított statisztikailag szignifikáns növekedését is használják (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Noha 25 % alatti fülvastagság esetén előfordulhat statisztikailag szignifikáns növekedés, a nagyfokú irritációval azonban ezt különösen nem hozták összefüggésbe (25) (26) (27) (28) (29).

24. Az integrált értékelés részeként alkalmazva a következő klinikai tünetek jelezhetnek szisztémás toxicitást (30), és ezáltal kijelölhetik a fő LLNA:BrdU-ELISA vizsgálat során alkalmazandó maximális dózist: az idegrendszer működésében bekövetkező változások (például piloerekció, ataxia, tremorok és görcsrohamok); a viselkedésben bekövetkező változások (például agresszivitás, a tisztálkodási tevékenységekben bekövetkező változás, az aktivitási szint jelentős változása); a légzési mintázat változása (például a légvételek gyakoriságában és az intenzitásában bekövetkező változás, úgymint dyspnoe, zihálás és szörtyzörejek), valamint változások az táplálék- és vízfogyasztásban. Az értékelés során emellett figyelembe kell venni a letargia és/vagy reakciókészség hiányának jeleit, valamint az enyhénél és pillanatnyinál fokozottabb fájdalom vagy szenvedés bármilyen klinikai tünetét, az > 5 %-nál nagyobb arányú testtömegcsökkenést az 1. naptól a 6. napig tartó időszakban, valamint a mortalitást. Az elhullásközeli állapotban lévõ vagy súlyos fájdalmak és szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell (31).

A fő vizsgálat kísérleti ütemterve

25. A vizsgálat kísérleti ütemterve a következő:

— *1. nap:* Külön meg kell határozni, és fel kell jegyezni mindegyik állat testtömegét és az esetleges klinikai megfigyeléseket. Vigyünk fel 25 µl térfogatú, megfelelő hígítású vizsgált anyagot, valamint a vivőanyagot önmagában vagy pozitív kontrollt (pozitív kontroll párhuzamos vagy a közelmúltban végzett vizsgálata a laboratórium szabályzatának megfelelően, figyelembe véve a 11–15. bekezdésekben foglaltakat) a fülek dorzális oldalára.

— *2. és 3. nap:* Ismételjük meg az 1. napon elvégzett felviteli eljárást.

— *4. nap:* Nincs kezelés.

— *5. nap:* Fecskendezzünk be 0,5 mL (5 mg/egér) BrdU (10 mg/ml) oldatot intraperitoneálisan.

— *6. nap:* Fel kell jegyezni minden állat testtömegét és minden klinikai megfigyelést. A BrdU befecskendezése után körülbelül 24 órával (24 h) exterminájuk az állatokat. Mindegyik egér füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokelvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat, és tegyük be azokat állatonként külön-külön foszfáttal pufferelt sóoldatba (PBS). A nyirokcsomók azonosításának és preparálásának részletei és az ehhez kapcsolódó ábrák a (17) hivatkozásban találhatók. A helyi bőrreakció fő vizsgálatban történő további monitorozásához olyan további paramétereket lehet belevenni a vizsgálati protokollba, mint például a bőrpír pontozása vagy a fülvastagság mérése (akár vastagságmérővel, akár elölés utáni füldarabsúly-meghatározással).

▼M3

A sejtszuszpenziók elkészítése

26. Az egyes állatokból két oldalról vett nyirokcsomósejtekből (LNC) egysejtszuszpenziót kell készíteni a sejtek mechanikus úton történő óvatos szétválasztásával, amely végezhető 200 mikrométeres lyukméretű rozsdamentes acélból készült fémhálóval vagy egyéb elfogadható módszerrel (pl. a nyirokcsomók egyszer használatos műanyag mozsárban történő összetörése, majd 70-es nejlonhálón való átpréselése). Az LNC szuszpenzió elkészítése a vizsgálat szempontjából döntő fontosságú, ezért a módszert a vizsgálatot végző valamennyi munkatársnak előre el kell sajátítani. A negatív kontrollként szolgáló állatok nyirokcsomói kisméretűek, ezért az SI-értékre gyakorolt mesterséges hatások elkerülése érdekében fontos az elővigyázatos kezelés. Az LNC szuszpenzió céltérfogatát minden esetben a meghatározott optimalizált térfogathoz kell igazítani (körülbelül 15 ml). Az optimális térfogat meghatározása a negatív kontrollcsoport 0,1–0,2 közötti átlagos abszorbanciájának elérésén alapul.

A sejtproliferáció meghatározása (a BrdU limfociták DNS-ébe való beépülésének mérése)

27. A BrdU mérése a kereskedelemben kapható ELISA készlet (például Roche Applied Science, Mannheim, Németország, katalógusszám: 11 647 229 001) használatával történik. A mérés lényege, hogy az LNC-szuszpenzióból három adagban 100 µl-t kell egy lapos aljú mikrotiterlemez mélyedéseibe adagolni. Az LNC fixálása és denaturálása után mindegyik mélyedésbe anti-BrdU-antitestet kell adni, majd várni kell, hogy a reakció kialakuljon. Ezután az anti-BrdU antitestet mosással el kell távolítani, majd hozzá kell adni a szubsztrátoldatot, és várni kell, hogy kialakuljon a kromogén termék. Ekkor 370 nm-en 492 nm-es referencia-hullámhossz mellett mérni kell az abszorbanciát. A vizsgálati körülményeket minden esetben optimalizálni kell (lásd a 26. bekezdést).

MEGFIGYELÉSEK

Klinikai megfigyelések

28. Naponta legalább egyszer minden egérnél meg kell vizsgálni az alkalmazás helyén kialakuló lokális vagy szisztémás toxicitás esetleges tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni minden egyes egér esetében, egyedi adatsor felvételével. A monitoring tervnek tartalmaznia kell azon kritériumokat, amelyek alapján azonnal azonosíthatóak az eutanáziát igénylő, szisztémás toxicitást, kiterjedt helyi bőrirritációt vagy bőrkorróziót mutató egerek (31).

Testtömeg

29. Ahogyan az a 25. bekezdésben szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, valamint a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

30. Az egyes kezelési csoportokra vonatkozó eredményeket átlagos stimulációs indexben (SI) fejezzük ki. Az SI kiszámítása úgy történik, hogy a vizsgált anyaggal kezelt egyes csoportokban és a pozitív kontrollcsoportban kapott állatonkénti átlagos BrdU jelölési indexet el kell osztani az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos BrdU jelölési indexével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1.

A BrdU jelölési index meghatározása:

$$\text{BrdU jelölési index} = (\text{ABS}_{em} - \text{ABS vak}_{em}) - (\text{ABS}_{ref} - \text{ABS vak}_{ref})$$

em = kibocsátott hullámhossz; ref = referencia hullámhossz.

▼M3

31. A válaszreakciót akkor lehet pozitívan értékelni, ha a stimulációs index ≥ 1,6 (10). Amikor azonban azt kell meghatározni, hogy egy határértéken lévő eredmény (vagyis amikor az SI-érték 1,6 és 1,9 között van) pozitívnak tekintendő-e, akkor a dózis-válasz összefüggés erőssége, a statisztikai szignifikancia és az oldószerrel/vivőanyaggal, valamint a pozitív kontrollal kapott válaszreakciók következetessége is felhasználható (3) (6) (32).

32. Az 1,6 és 1,9 közötti SI-vel járó, határértéken lévő pozitív válaszreakciók esetében a felhasználók dönthetnek úgy, hogy az eredmények pozitivitásának megerősítéséhez további információkat – például a dózis-válasz összefüggést, szisztémás toxicitás vagy nagyfokú irritáció jelét, illetve adott esetben a statisztikai szignifikanciát az SI értékekkel együtt – kívánnak figyelembe venni (10). Figyelembe kell venni a vizsgált anyag különféle tulajdonságait is, köztük azt, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e nagyfokú bőrirritációt egereknél, illetve a megfigyelt dózis-válasz összefüggés jellegét. Ezek, illetve további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (4) hivatkozásban.

33. Az egyedi állatokon alapuló adatgyűjtés lehetővé teszi a dózis-válasz összefüggés adatokban tükröződő fennállásának és mértékének statisztikai elemzését. Bármely statisztikai elemzés tartalmazhatja a dózis-válasz összefüggés értékelését, valamint a vizsgálati csoportok megfelelően korrigált összehasonlításait (például a dóziscsoportok páronkénti összehasonlítása a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportokkal). A statisztikai elemzésekben a dózis-válasz tendenciák értékelésénél szerepelhet például lineáris regresszió vagy William-féle próba, a páronkénti összehasonlításoknál pedig Dunnett-féle próba. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges varianciaegyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, amelyek miatt az adatok transzformációjára vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. A vizsgálónak minden esetben el kell végeznie az SI-k kiszámítását és statisztikai elemzéseket bizonyos adatpontokkal (az úgynevezett „kiugró adatokkal”) és azok nélkül.

ADATOK ÉS JELENTÉS

Adatok

34. Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, feltüntetve az egyedi állatok BrdU jelölési indexének értékeit, a csoport átlagos BrdU jelölés/állat értékét, a hozzá tartozó hibamutatóval (például SD, SEM), valamint az egyes dóziscsoportokban kapott átlagos stimulációs indexeket (SI) összehasonlítva a párhuzamos oldószeres/vivőanyagos kontrollcsoportéval.

Vizsgálati jelentés

35. A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyagok és kontrollanyagok:

— azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám és az EU-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám),

— fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, stabilitás, oldhatóság),

— elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya,

Oldószer/vivőanyag:

— azonosító adatok (adott esetben tisztaság; koncentráció; alkalmazott térfogat),

— a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

▼M3

Kísérleti állatok:

— CBA egértörzs származása,

— az állatok mikrobiológiai státusa, amennyiben ismert,

— az állatok száma és életkora,

— az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.,

Vizsgálati körülmények:

— az ELISA készlet esetében a származás, a tételszám, a gyártó minőségbiztosítási/minőség-ellenőrzési adatai (antitest szenzitivitása és specificitása, illetve a kimutatási határ),

— a vizsgált anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok,

— a dózisszintek megválasztásának indoklása (ezen belül adott esetben az előszűrési vizsgálatok eredményei),

— a vivőanyag és a vizsgált anyag alkalmazott koncentrációja, valamint a vizsgált anyagból alkalmazott teljes mennyiség,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a kezelés adatai és a mintavételek ütemezése,

— a toxicitás mérésére alkalmazott módszerek,

— a pozitív és negatív vizsgálati eredmény kimondásának kritériumai,

— a protokolltól való esetleges eltérések adatai, és annak kifejtése, hogy az eltérés hogyan érintheti vizsgálati tervet és az eredményeket,

A megbízhatóság ellenőrzése:

— a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt,

— a vizsgálólaboratórium párhuzamosan és/vagy korábban vizsgált pozitív és párhuzamosan vizsgált negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollokra vonatkozó adatai,

— ha nem vizsgáltak párhuzamosan pozitív kontrollt, a laboratóriumban legutóbb végzett időszakos pozitív kontroll dátuma és laboratóriumi jelentése, valamint pozitív kontroll vizsgálatának korábbi adatait részletező jelentés, amely indokolja, hogy miért nem végzik a laboratóriumban pozitív kontroll párhuzamos vizsgálatát,

Eredmények:

— az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és a humánusan történő exterminálás tervezett időpontjában, illetve az átlagos és vonatkozó hibamutatók (pl. SD, SEM) kezelési csoportonként,

— a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan, amennyiben volt ilyen,

— az állatonkénti BrdU jelölési indexek és kezelési csoportonkénti SI értékek táblázata,

— átlagos és kapcsolódó hibamutatók (pl. SD, SEM) az állatonkénti BrdU jelölési index esetében, az egyes kezelés csoportokban, és a kiugró értékek elemzése az egyes kezelési csoportokban,

▼M3

— a kiszámított SI és a variabilitás megfelelő mutatója, amely az egyedek közti variabilitást a vizsgált anyaggal kezelt csoportban és a kontroll-csoportokban egyaránt figyelembe veszi,

— dózis-válasz összefüggés,

— adott esetben statisztikai elemzések,

Az eredmények tárgyalása:

— rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, és következtetés levonása arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyagot bőrszenzibilizáló hatásúnak kell-e tekinteni vagy sem.

SZAKIRODALOM

(1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRP-Rept2009.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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban:

[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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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. Elektronikus formátumban: [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**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Pontosság: A vizsgálati módszerrel kapott eredmények és az elfogadott referenciaértékek közötti egyezés mértéke. A vizsgálati módszer teljesítményének mutatója, valamint a relevanciájának egyik megítélési szempontja. E kifejezést gyakran használják az „egyezés” megfelelőjeként, amely egy adott vizsgálati módszer alkalmazásakor az azonos eredmények arányát fejezi ki (33).

Referenciaanyag: A vizsgált anyaggal való összehasonlítás céljából etalonként használt szenzibilizáló vagy nem szenzibilizáló anyag. A referenciaanyaggal szemben a következő elvárások fogalmazhatók meg: i. állandó és megbízható beszerzési forrásból vagy forrásokból kell származnia; ii. a vizsgált anyagok csoportjához hasonló szerkezettel és funkcionális jellemzőkkel kell rendelkeznie; iii. ismert fizikai-kémiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie; iv. rendelkezésre kell állniuk az anyag ismert hatásait alátámasztó adatoknak; és v. a kívánt válaszreakciók tartományában ismert hatásúnak kell lennie.

Álnegatív eredmény: Valamely vizsgálati módszerrel tévesen negatívnak vagy inaktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában pozitív vagy aktív (33).

Álpozitív: Valamely vizsgálattal tévesen pozitívnak vagy aktívnak minősített vizsgált anyag, amely valójában negatív vagy inaktív (33).

Veszély: Káros egészségügyi vagy ökológiai hatások előidézésének lehetősége. A káros hatás csak akkor jelenik meg, ha kellő szintű az expozíció.

Laboratóriumok közötti reprodukálhatóság: Annak mértéke, hogy a különböző minősített laboratóriumok azonos protokoll és azonos vizsgált anyag alkalmazásával mennyire képesek minőségileg és mennyiségileg azonos eredményeket produkálni. A laboratóriumok közötti reprodukálhatóság az előhitelesítési és hitelesítési folyamat során kerül meghatározásra, és annak mértékét jelzi, hogy az adott vizsgálat mennyire sikeresen vihető át laboratóriumok között; más néven laboratóriumok közötti megismételhetőség (33).

Laboratóriumon belüli reprodukálhatóság: Annak meghatározása, hogy az ugyanazon laboratóriumban dolgozó képzett személyek meghatározott protokoll különböző időpontokban történő alkalmazásával mennyire sikeresen tudják reprodukálni az eredményeket. Más néven laboratóriumon belüli megismételhetőség (33).

Kiugró érték: A kiugró érték olyan megfigyelés, amely szembetűnően eltér az egy populációból vett véletlenszerű minta egyéb értékeitől.

Minőségbiztosítás: Irányítási folyamat, amelynek során a laboratóriumi vizsgálati szabványok és követelmények betartását, a jegyzőkönyvek vezetését, valamint az adattovábbítás pontosságát a vizsgálatot végző személyektől független személyek ellenőrzik.

Megbízhatóság: Azonos protokoll szerint végzett vizsgálati módszer laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóságának mérésére szolgál. A laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti reprodukálhatóság kiszámításával állapítják meg (33).

Bőrszenzibilizáció: Immunológiai folyamat, amely akkor jelentkezik, ha egy érzékeny egyén lokálisan érintkezik valamely indukáló hatású allergén vegyi anyaggal, amely esetlegesen kontakt szenzibilizáció kialakulásához vezető immunválaszt vált ki a bőrben.

Stimulációs index (SI): Adott vizsgált anyag bőrszenzibilizációt okozó képességének meghatározására kiszámított érték, amely az anyaggal kezelt csoportban és a párhuzamosan vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportban tapasztalt proliferáció aránya.

Vizsgált anyag (más néven vizsgált vegyi anyag): Bármilyen anyag vagy keverék, amelyet ezzel a vizsgálati módszerrel vizsgálnak.

▼M4

B.52. AKUT INHALÁCIÓS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER

BEVEZETÉS

1. A jelen vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 436. vizsgálati iránymutatásban (2009) leírt módszerrel. Az akut inhalációs toxicitásra vonatkozó első 403. vizsgálati iránymutatást 1981-ben fogadták el, és azóta felülvizsgálták (lásd e melléklet B.2. fejezetét (1)). Az inhalációs akut toxikus osztály (ATC) módszer (2) (3) (4) kidolgozását helyénvalónak ítélték a felülvizsgált orális ATC módszer elfogadását követően (a e B.1b. fejezete) (5). Az ATC vizsgálati módszer akut inhalációs toxicitásra vonatkozó visszamenőleges teljesítmény-értékelésének eredménye azt mutatta, hogy a módszer megfelelő az osztályozási és címkézési célból történő használatra (6). Az inhalációs ATC vizsgálati módszer rögzített célkoncentrációk melletti sorozatos, lépésenkénti vizsgálatot tesz lehetővé a vizsgált vegyi anyag toxicitásának besorolása céljából. A letalitás kulcsfontosságú végpont, azonban a súlyos fájdalom vagy szorongás jeleit mutató, szenvedő vagy elhullásközeli állapotban lévő állatokat humánus módon el kell pusztítani a szenvedés minimalizálása érdekében. A humánus végpontokra vonatkozóan az OECD 19. iránymutatásában (7) található útmutatás.

2. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálatok végrehajtásához és értelmezéséhez az akut inhalációs toxicitási vizsgálatokra vonatkozó (39. számú) iránymutatás (8) nyújt útmutatást.

3. Az e vizsgálati módszer összefüggésében alkalmazott fogalmak meghatározása az 1. függelékben, valamint a 39. iránymutatásban (8) található.

4. A jelen vizsgálati módszer információkat szolgáltat a veszélyes tulajdonságokról, és lehetővé teszi a vizsgált vegyi anyagnak az akut toxicitást okozó vegyi anyagok osztályozására vonatkozó 1272/2008/EK rendelet (9) szerinti besorolását és osztályozását. Abban az esetben, ha az LC_{50} értékek pontbecslése vagy a koncentráció-válasz összefüggés elemzése szükséges, az e melléklet B.2. fejezetében leírt vizsgálati módszert kell alkalmazni (1). A vizsgálati módszer kiválasztására vonatkozó további útmutatás a 39. iránymutatásban (8) található. A jelen vizsgálati módszer nem kifejezetten különleges anyagok – például alacsony oldhatóságú izometrikus vagy rostos anyagok, vagy mesterséges nanoanyagok – vizsgálatára szolgál.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

5. A jelen vizsgálati módszer szerinti vizsgálat alkalmazásának mérlegelése előtt a vizsgálati laboratóriumnak az állatkísérletek minimalizálása érdekében figyelembe kell vennie minden, a vizsgált vegyi anyagról rendelkezésre álló információt, beleértve az olyan, meglévő tanulmányokat, amelyek adatai a további vizsgálatok elvégzésének mellőzését támasztják alá. A legalkalmasabb faj, törzs, nem, expozíciós mód és a megfelelő vizsgálati koncentráció kiválasztását esetlegesen segítő információk közé tartozik a vizsgált vegyi anyag azonossága, kémiai szerkezete, valamint fizikai és kémiai tulajdonságai, az esetleges *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálatok eredményei, a várható felhasználási terület(ek) és a humán expozíció lehetősége, a szerkezetileg rokon vegyi anyagokról rendelkezésre álló (Q)SAR- és toxikológiai adatok. A maró ([1]) vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt várhatóan súlyos fájdalmat vagy szorongást okozó koncentrációk jelen vizsgálati módszerrel való vizsgálata nem javasolt (lásd a 39. iránymutatást (8)).

([1]) A maró hatás értékelése egyebek között az alábbi bizonyítékokat felhasználó szakértői véleményen alapulhat: emberekkel és állatokkal kapcsolatos tapasztalatok, rendelkezésre álló (*in vitro)* adatok, például a jelen melléklet B.40. (10), B.40a. fejezete (11), vagy az OECD 435. iránymutatása (12), pH-értékek, hasonló vegyszerekkel kapcsolatos információk vagy bármely más vonatkozó adat.

▼M4

A VIZSGÁLAT ELVE

6. A progresszív eljáráson alapuló vizsgálat elve, hogy a 4 órás expozíciós időszak alatt elegendő információt szerezzünk a vizsgált vegyi anyag akut inhalációs toxicitására vonatkozóan a vizsgált vegyi anyag osztályozásának lehetővé tétele érdekében. Meghatározott szabályozási célok elérése érdekében más expozíciós időtartamok is alkalmazhatók. A lépésenként változó koncentráció bejuttatásának minden meghatározott szakaszában nemenként 3 állatot kell vizsgálni. Az elhullási aránytól és/vagy az állatok elhullásközeli állapotától függően 2 lépés elegendő lehet a vizsgált vegyi anyag akut toxicitásának megítéléséhez. Ha bizonyítható, hogy az egyik nem érzékenyebb a vizsgált anyagra, mint a másik, a vizsgálat folytatható csak az érzékenyebb nemmel. Az előző lépés eredménye meghatározza a következő lépést, az alábbiak szerint:

   a) nincs szükség további vizsgálatra;

   b) nemenként 3 állat vizsgálata szükséges; vagy

   c) 6 állat vizsgálata szükséges csak az érzékenyebb nemből, azaz a toxikus osztály becsült alsó határainak vizsgált koncentrációs csoportonként nemtől függetlenül 6 állaton kell alapulniuk.

7. Az elhullásközeli állapotban lévő, nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat humánus módon el kell pusztítani, és a vizsgálat eredményeinek értelmezésekor a vizsgálat során elhullott állatokkal azonos módon kell figyelembe venni. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok elpusztítására vonatkozó döntési kritériumok a humánus végpontokról szóló 19. iránymutatásban (7) találhatók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Az állatfaj kiválasztása

8. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal, ivarérett állatokat kell alkalmazni. A javasolt állatfaj a patkány, más faj használata esetén a döntést indokolni kell.

Az állatok előkészítése

9. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az expozíció napján az állatoknak 8–12 hetes fiatal, ivarérett egyedeknek kell lenniük, a testsúlyuk pedig a korábbi expozíciókkal érintett, azonos életkorú állatok nemenkénti átlagos testsúlyától legfeljebb ± 20 %-kal térhet el. Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, egyedi azonosítás céljából meg kell jelölni azokat. Az állatokat a laboratóriumi körülményekhez való szoktatás céljából a vizsgálat megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben tartjuk. Az állatokat a vizsgálatot megelőzően rövid ideig szoktatni kell a vizsgálati eszközökhöz, mivel ezzel csökkenthető az új környezet okozta stressz.

Az állatok tartása

10. A kísérleti állatok tartására használt helyiség hőmérséklete 22 ± 3 °C kell, hogy legyen. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor ez nem feltétlenül lehetséges, ha vivőanyagként vizet használnak. Az expozíció előtt és után az állatokat általában nemek és koncentrációk szerinti csoportokban kell a ketreceikben elhelyezni, azonban az állatok ketrecenkénti számának nem szabad akadályoznia az egyes állatok megfigyelését, és minimalizálnia kell a kannibalizmus és a marakodás okozta veszteségeket. Ha az állatok expozíciója csak orron át történik, szükséges lehet szoktatni azokat a lefogásukra szolgáló csövekhez. Az állatok lefogására szolgáló csövek nem okozhatnak az állatoknak indokolatlan fizikai, termális vagy a mozgásképtelenség okozta stresszt. A lefogás hatással lehet olyan fiziológiai végpontokra, mint a testhőmérséklet

▼M4

(hipertermia) és/vagy a percenkénti légzésvolumen. Amennyiben a rendelkezésre álló általános adatok azt igazolják, hogy ilyen változások nem lépnek fel számottevő mértékben, az állatok lefogására szolgáló csövekhez való előzetes szoktatás mellőzhető. Az aeroszoloknak egész testfelületükön kitett állatokat az expozíció során külön ketrecben kell elhelyezni, hogy a vizsgált aeroszol ne szűrődhessen át a többi állat szőrzetén. Hagyományos és minősített laboratóriumi takarmány alkalmazható – kivéve az expozíció időtartama alatt –, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást.

Inhalációs kamrák

11. Az inhalációs kamra kiválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag jellegét és a vizsgálat célját. Az előnyben részesítendő expozíciós mód a csak orron keresztüli expozíció (ez magában foglalja a csak a fejet, orrot vagy szájat érintő expozíciót). A csak orron keresztüli expozíció általában előnyben részesítendő a folyékony vagy szilárd aeroszolok, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök vizsgálata esetén. Előfordulhat, hogy a vizsgálat különleges céljai egész testfelületen keresztüli expozíció alkalmazásával hatékonyabban elérhetők, ezt azonban indokolni kell a vizsgálati jegyzőkönyvben. Egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamra használata esetén a légköri stabilitás biztosítása érdekében a vizsgált állatok össztérfogata nem haladhatja meg a kamra térfogatának 5 %-át. A csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíciós technikák elveit, valamint azok különös előnyeit és hátrányait a 39. iránymutatás (8) ismerteti.

EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK

A koncentrációk beadása

12. Az expozíció javasolt időtartama négy óra, amelybe nem tartozik bele az egyensúlyi állapot eléréséhez szükséges időtartam. Meghatározott követelmények teljesítése érdekében ettől eltérő időtartamok alkalmazása lehet szükséges, ezt azonban a vizsgálati jegyzőkönyvben indokolni kell (lásd a 39. iránymutatást (8)). Az anyagnak egész testfelületen keresztüli expozícióra szolgáló kamrában kitett állatokat külön ketrecben kell tartani, hogy az állatok egymás tisztogatása során ne nyelhessék le a vizsgált vegyi anyagot. Az expozíció időtartama alatt az állatok nem kaphatnak takarmányt. Az állatoknak víz az egész testfelületen keresztüli expozíció teljes időtartama alatt adható.

13. Az állatokat gáz, gőz, aeroszol vagy ezek keveréke formájában tesszük ki a vizsgált vegyi anyagnak. A vizsgálandó halmazállapot a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, a kiválasztott koncentrációtól és/vagy a vizsgált vegyi anyag kezelése és használata során legnagyobb valószínűséggel előforduló halmazállapottól függ. A higroszkopikus és kémiailag reakcióképes vizsgált vegyi anyagokat száraz levegős körülmények között kell vizsgálni. Ügyelni kell a robbanékony koncentrációk keletkezésének elkerülésére.

Részecskeméret-eloszlás

14. Minden aeroszol, valamint a lecsapódva esetlegesen aeroszolt alkotó gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni. A légzőrendszer összes lényeges részének expozíciója érdekében 1 és 4 μm közötti tömegfelező aerodinamikai átmérővel (MMAD) rendelkező, az 1,5 és 3,0 közötti tartományba eső geometriai szórású (σ_g) aeroszolok használata javasolt (8) (13) (14). Habár ésszerű keretek között törekedni kell az e szabványnak való megfelelésre, szakértői megítélésre kell hagyatkozni, ha erre nincs lehetőség. A fémgőzök részecskéi például kisebbek lehetnek e szabványos méretnél, míg a töltéssel rendelkező részecskék, a rostok és a higroszkopikus anyagok (amelyek részecskemérete a légzőrendszer nedves környezetében nő) meghaladhatják azt.

▼M4

A vizsgált vegyi anyag előkészítése vivőanyagban

15. A vizsgált vegyi anyag megfelelő légköri koncentrációjának és részecskeméretének eléréséhez vivőanyag alkalmazható. Főszabályként a víz részesítendő előnyben. A részecskéket képző anyagok mechanikai eljárásoknak vethetők alá a szükséges részecskeméret-eloszlás elérése érdekében, ugyanakkor ügyelni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag ne induljon bomlásnak és ne módosuljon. Amennyiben úgy véljük, hogy a mechanikai folyamatok (például a túlzott őrlésből adódó súrlódás miatt kialakult szélsőséges hőmérséklet) megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételét analitikai úton ellenőrizni kell. Kellő figyelmet kell fordítani a vizsgált vegyi anyag szennyeződésének elkerülésére. A nem morzsálódó, szándékosan belélegezhetetlen összetétellel készült szemcsés anyagokat nem szükséges vizsgálni. Kopásvizsgálattal kell igazolni, hogy a szemcsés anyag kezelése során nem keletkeznek belélegezhető részecskék. Ha a kopásvizsgálat során belélegezhető részecskék keletkezését észlelik, inhalációs toxicitási vizsgálatot kell végezni.

Kontrollállatok

16. Negatív (levegővel kezelt) kontrollcsoport párhuzamos vizsgálata nem szükséges. Amennyiben a vizsgálati légkör létrehozása során víztől eltérő vivőanyagot alkalmazunk, vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra csak akkor van szükség, ha nem állnak rendelkezésre múltbeli inhalációs toxicitási adatok. Ha a vivőanyaggal kevert vizsgált vegyi anyag a toxicitási vizsgálat alapján nem bizonyul toxikusnak, a vizsgált koncentráció mellett a vivőanyag sem tekintendő toxikusnak, tehát nincs szükség vivőanyaggal kezelt kontrollra.

AZ EXPOZÍCIÓS KÖRÜLMÉNYEK NYOMON KÖVETÉSE

Kamrabeli légáramlás

17. A kamrán keresztüli légáramlást gondosan szabályozni kell, folyamatosan nyomon kell követni, és minden expozíció során legalább óránként fel kell jegyezni. A vizsgálati légköri koncentráció (vagy stabilitás) nyomon követése valamennyi dinamikus paraméter globális mérését jelenti, és közvetett lehetőséget nyújt a légkör előállítása szempontjából lényeges összes dinamikus paraméter szabályozására. Különös figyelmet kell fordítani a csak orron át történő expozícióra szolgáló kamrában az újbóli belélegzés elkerülésére, amennyiben az expozíciós rendszeren keresztüli légáramlás nem elegendő a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó légkör dinamikus áramlásának biztosítására. Előírt módszerek állnak rendelkezésre annak igazolására, hogy a választott működési körülmények között nem történik újbóli belélegzés (8) (15). Az oxigénkoncentrációnak legalább 19 %-nak kell lennie, a szén-dioxid-koncentráció pedig legfeljebb 1 % lehet. Amennyiben bármilyen okból feltételezhető, hogy ezek a szabványok nem teljesíthetők, az oxigén- és szén-dioxid-koncentrációt mérni kell.

A kamra hőmérséklete és relatív páratartalma

18. A kamra hőmérsékletét 22 ± 3 °C-on kell tartani. Az állatok belégzési zónájában fennálló relatív páratartalmat a csak orron át történő és az egész testfelületen keresztüli expozíció esetén egyaránt nyomon kell követni, és legfeljebb 4 órás időtartamú expozíciók esetén legalább háromszor, rövidebb időtartamok esetén pedig óránként fel kell jegyezni. A relatív páratartalmat ideális esetben 30–70 %-os tartományban kell tartani, ugyanakkor előfordulhat, hogy ez vagy nem érhető el (például vízalapú keverékek vizsgálata esetén), vagy nem mérhető a vizsgált vegyi anyag vizsgálati módszerrel való interferenciája miatt.

▼M4

Vizsgált vegyi anyag: névleges koncentráció

19. Az expozíciós kamrában fennálló névleges koncentrációt lehetőség szerint ki kell számítani és fel kell jegyezni. A névleges koncentrációt úgy kapjuk meg, hogy az előállított vizsgált vegyi anyag tömegét elosztjuk a kamrarendszeren áthaladt levegő össztérfogatával. A névleges koncentráció nem az állatok expozíciójának jellemzésére szolgál, ugyanakkor a névleges és a tényleges koncentráció összehasonlításával megismerhető a vizsgálati rendszer előállítási hatásfoka, és így feltárhatók az előállítással összefüggő problémák.

Vizsgált vegyi anyag: tényleges koncentráció

20. A tényleges koncentráció a vizsgált vegyi anyagnak az inhalációs kamrán belül, az állatok belégzési zónájában fennálló koncentrációját jelenti. A tényleges koncentráció vagy specifikus módszerekkel (például közvetlen mintavétellel, adszorpciós vagy kémiai reakcióképességet vizsgáló módszerekkel, valamint utólagos analitikai jellemzéssel), vagy nem specifikus módszerekkel, például gravimetriai szűrőelemzéssel határozható meg. A gravimetriai elemzés csak egykomponensű, por alakú aeroszolok, illetve alacsony illékonyságú folyadékok aeroszoljai esetén elfogadható, és alkalmazását a vizsgált vegyi anyag megfelelő, a vizsgálat előtt végzett jellemzésével kell alátámasztani. A gravimetriai elemzés a többkomponensű, por alakú aeroszolok koncentrációjának meghatározására szintén alkalmazható. Ebben az esetben azonban analitikai adatokkal kell alátámasztani, hogy a levegőben lévő anyag összetétele hasonló a kiindulási anyagéhoz. Amennyiben ilyen információ nem áll rendelkezésre, a (lehetőleg levegőben lebegő) vizsgált vegyi anyag rendszeres időközönként végzett újbóli elemzésére lehet szükség a vizsgálat során. Olyan aeroszolizálódott ágensek esetén, amelyek elpárologhatnak vagy szublimálhatnak, igazolni kell, hogy mindegyik fázisból a választott módszerrel vettünk mintát. A cél-, névleges és tényleges koncentrációt fel kell tüntetni a vizsgálati jegyzőkönyvben, azonban a letális koncentráció értékének kiszámításához csak a tényleges koncentrációkat kell felhasználni.

21. Lehetőség szerint a vizsgált vegyi anyag egyetlen tételét kell használni, és a vizsgált mintát olyan körülmények között kell tárolni, hogy megőrződjön annak tisztasága, homogenitása és stabilitása. A vizsgálat megkezdését megelőzően el kell végezni a vizsgált vegyi anyag jellemzését, meghatározva többek között annak tisztaságát, valamint amennyiben technikailag lehetséges, az észlelt szennyező anyagok és szennyeződések azonosságát és mennyiségét. Ez többek között – de nem kizárólag – a következő adatokkal mutatható ki: retenciós idő és relatív csúcsterület, tömegspektroszkópiai vagy gázkromatográfiás elemzéssel, illetve más becslésekkel meghatározott molekulatömeg. Bár a vizsgált minta azonosságának meghatározása nem tartozik a vizsgálati laboratórium feladatai közé, óvatosságból érdemes lehet a vizsgálati laboratóriumban legalábbis korlátozott módon (például szín, fizikai jelleg stb. alapján) megerősíteni a megbízó által adott jellemzést.

22. Az expozíciós légkört amennyire csak lehet, állandó állapotban kell tartani, továbbá az analitikai módszertől függően folyamatosan és/vagy időszakosan nyomon kell követni. Időszakos mintavétel esetén a kamrából a négyórás vizsgálat során legalább kétszer kell légköri mintát venni. Ha az alacsony légáramlási sebesség vagy koncentráció miatt ez nem megoldható, a teljes expozíciós időszak alatt egy mintavétel végezhető. Ha jelentős ingadozás figyelhető meg az egyes minták között, a következőnek vizsgált koncentrációkat expozíciónként négy minta alapján kell vizsgálni. Az egyes kamrakoncentráció-minták gázok és gőzök esetén legfeljebb ± 10 %-kal, folyékony vagy szilárd aeroszolok esetén pedig legfeljebb ± 20 %-kal térhetnek el a kamrabeli átlagkoncentrációtól. A kamra egyensúlyi állapotának kialakulásához szükséges időt (t_{95}) ki kell számítani és fel kell jegyezni. Egy adott expozíció időtartama magában foglalja a vizsgált vegyi anyag előállításának idejét, utóbbihoz pedig figyelembe kell venni a t_{95} eléréséhez szükséges időt. A t_{95} becsléséhez a 39. iránymutatásban (8) található útmutatás.

▼M4

23. A nagyon összetett, gőzökből/gázokból és aeroszolokból álló keverékek (például égési légkörök, valamint meghatározott célra szolgáló végfelhasználói termékekből/készülékekből kibocsátott vizsgált vegyi anyagok) esetén az egyes fázisok eltérően viselkedhetnek az inhalációs kamrában, ezért mindegyik fázishoz (gőz/gáz és aeroszol) legalább egy indikátoranyagot (analitot) – általában a keverék elsődleges hatóanyagát – kell kiválasztani. Amennyiben a vizsgált vegyi anyag keverék, az analitikai koncentrációt a teljes keverék, nem pedig csak az aktív összetevő vagy a komponens (analit) vonatkozásában kell a jegyzőkönyvben feltüntetni. A tényleges koncentrációról további információ a 39. iránymutatásban található (8).

Vizsgált vegyi anyag: részecskeméret-eloszlás

24. Az aeroszolok részecskeméret-eloszlását mindegyik 4 órás expozíció során legalább kétszer meg kell határozni sorozatos ütközésmérő vagy alternatív műszer, például aerodinamikai részecskeméret-meghatározó segítségével. Ha bizonyítható, hogy a sorozatos ütközésmérővel és az alternatív műszerrel kapott eredmények egyeznek, az alternatív műszer a teljes vizsgálat folyamán használható. Az elsődleges műszerrel párhuzamosan egy második eszközt, például gravimetriai szűrőt vagy impingert/gázbuborékoltatót kell használni az elsődleges műszer mintavételi hatékonyságának megerősítése érdekében. A részecskeméret-elemzés útján kapott tömegkoncentrációnak a szűrőelemzéssel kapott tömegkoncentrációt ésszerű mértékben meg kell közelítenie (lásd a 39. iránymutatást (8)). Ha a vizsgálat kezdeti szakaszában egyezés mutatható ki, a további megerősítő mérések mellőzhetők. Az állatok jóléte érdekében intézkedéseket kell tenni az expozíció eseteges megismétlését szükségessé tevő kétes adatok előfordulásának minimalizálása érdekében. Gőzök esetén részecskeméretezést kell végezni, ha fennáll annak a lehetősége, hogy a gőz lecsapódásával aeroszol keletkezhet, vagy ha vegyes fázisok alkotására képes részecskéket észlelünk a gőzatmoszférában (lásd a 14. bekezdést).

ELJÁRÁS

Fő vizsgálat

25. Minden szakaszhoz nemenként három állatot, vagy az anyagra érzékenyebb nemből hat állatot kell használni. Patkányoktól eltérő rágcsálófajok csak orron át történő expozíciója esetén az expozíció maximális időtartama kiigazítható a fajspecifikus szorongás minimalizálása érdekében. A kiindulási dózisként alkalmazandó koncentrációszintet négy meghatározott szint közül kell kiválasztani, és kiindulási koncentrációszintként azt a szintet kell választani, amely a legnagyobb valószínűséggel eredményez toxicitást a kezelt állatok némelyikénél. A gázokra, gőzökre és aeroszolokra vonatkozó (a 2–4. függelékben bemutatott) vizsgálati rendszerek az 1–4. CLP-kategória (9) határértékeivel történő vizsgálatokra vonatkoznak gázok (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (2. függelék), gőzök (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (3. függelék) és aeroszolok (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (4. függelék) esetében. Az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szereplő 5. kategória a vonatkozó határkoncentrációkat meghaladó koncentrációkra vonatkozik. Minden egyes kiindulási koncentrációra a vonatkozó vizsgálati rendszert kell alkalmazni. A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a jelzett nyilakat követi mindaddig, amíg az osztályozás el nem végezhető.

26. Az egyes expozíciós csoportok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő koncentrációszintnek való expozícióját addig kell halasztani, amíg ésszerű biztonsággal nem várható az előzőleg vizsgált állatok túlélése. Minden egyes koncentrációszint esetében az expozíciók között három- vagy négynapos időszak biztosítása javasolt a késleltetett toxicitás megfigyelésének lehetővé tétele érdekében. Ez az időtartam szükség szerint – például nem egyértelmű válaszok esetén – kiigazítható.

▼M4

Határérték-vizsgálat

27. Határérték-vizsgálatot akkor kell végezni, ha a vizsgált vegyi anyagról ismert vagy várható, hogy gyakorlatilag nem mérgező, azaz csak a hatóságilag előírt határkoncentráció felett idéz elő toxikus reakciót. A vizsgált vegyi anyag toxicitásával kapcsolatban hasonló vizsgált anyagokra vagy hasonló keverékekre vonatkozó adatokból nyerhetők információk, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, valamint azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó vegyi anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni (további útmutatás a 39. iránymutatásban (8) található).

28. A jelen vizsgálati módszer határérték-vizsgálataként szolgáló szokásos eljárás alkalmazása során nemenként három állatot, vagy az anyagra érzékenyebb nemből hat állatot teszünk ki gázok esetén 20 000 ppm, gőzök esetén 20 mg/l, porok/párák esetén pedig 5 mg/l koncentrációnak (ha ez megvalósítható). Aeroszolok vizsgálata esetén az elsődleges cél a belélegezhető részecskeméret (azaz 1–4 μm-es MMAD) elérése. Ez a legtöbb vizsgált vegyi anyag esetén 2 mg/l koncentrációnál érhető el. Aeroszolok 2 mg/l feletti koncentráció mellett történő vizsgálatát csak akkor szabad megkísérelni, ha ezzel elérhető a belélegezhető részecskeméret (lásd a 39. iránymutatást (8)). A GHS-nek (16) megfelelően a határkoncentrációt meghaladó koncentrációnál végzett vizsgálat állatjóléti okokból nem javasolt. Az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szereplő 5. GHS-kategóriában (16) végzett vizsgálatot csak abban az esetben szabad kilátásba helyezni, ha egy ilyen vizsgálat eredménye nagy valószínűséggel közvetlen jelentőséggel bírna az emberi egészség védelme szempontjából, továbbá ha mindezt a vizsgálati jegyzőkönyvben indokoljuk. Robbanásveszélyes vizsgált vegyi anyagok esetén ügyelni kell a robbanást elősegítő körülmények elkerülésére. A szükségtelen állatkísérletek elkerülése végett a határérték-vizsgálatot megelőzően állatok nélküli próbavizsgálatot kell végezni annak érdekében, hogy a kamrában elérhetők legyenek a határérték-vizsgálathoz szükséges körülményeket.

MEGFIGYELÉSEK

29. Az expozíció időtartama alatt az állatokat gyakori klinikai megfigyeléseknek kell alávetni. Az expozíciót követően az expozíció napján legalább kétszer, vagy – amennyiben az állatok kezelésre adott reakciója ezt indokolja – annál gyakrabban, az azt követő 14 nap során pedig naponta legalább egyszer klinikai megfigyeléseket kell végezni. A megfigyelés időtartama nem rögzített, hanem a klinikai tünetek jellege és jelentkezésének ideje, valamint a felépülés időtartama alapján határozandó meg. Fontos a toxicitási tünetek megjelenésének és megszűnésének időpontja, különösen, ha fennáll a toxicitási tünetek késleltetett megjelenésének tendenciája. Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort veszünk fel. Állatjóléti okokból humánus módon el kell pusztítani az elhullásközeli állapotban lévő, valamint súlyos fájdalom és/vagy tartós és súlyos szorongás jeleit mutató állatokat. A toxicitás klinikai tünetei előfordulásának vizsgálata során ügyelni kell arra, hogy az expozíciós eljárás okozta kezdeti beteges megjelenést és átmeneti légúti változásokat ne azonosítsuk tévesen a kezeléssel összefüggő hatásokként. A humánus végpontokra vonatkozó iránymutatásban összegzett elveket és feltételeket figyelembe kell venni (7). Ha az állatokat humánus okok miatt el kell pusztítani, vagy ha azok elhullnak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját.

▼M4

30. A ketrecben tartott állatok megfigyelésének ki kell terjednie a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártya, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszer, továbbá a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési minták változásaira. Lehetőség szerint fel kell jegyezni, ha különbséget lehet tenni a helyi és szisztémás hatások között. Figyelmet kell szentelni a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. A végbélben mért hőmérséklet bizonyítékot szolgáltathat a kezelés vagy a fogság okozta bradipnoés reflexre vagy hipo-/hipertermiára.

Testsúly

31. Az egyes állatok súlyát az szoktatási időszak során egy alkalommal, az expozíció napján (0. nap) az expozíció előtt, valamint legalább az 1., 3. és 7. napon (azt követően pedig hetente) egy-egy alkalommal, továbbá az 1. napon túli elhullás vagy elpusztítás időpontjában fel kell jegyezni. A testsúly a toxicitás kulcsfontosságú indikátorának számít, és a vizsgálat előtti értékekhez képest legalább 20 %-os tartós súlycsökkenést mutató állatokat szorosan figyelemmel kell kísérni. Az expozíciót követő időszak végén az életben maradt állatokat újra megmérjük, majd humánus módon elpusztítjuk.

Patológia

32. Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni, azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt el kellett pusztítani és ki kellett vonni a vizsgálatból. Ha a boncolás nem végezhető el rögtön azután, hogy az elpusztult állatot észrevették, az állatot hűtve (nem fagyasztva) kell tárolni az autolízis minimalizálásához kellően alacsony hőmérsékleten. A boncolást a lehető leghamarabb, általában egy vagy két napon belül el kell végezni. Minden állat esetén fel kell jegyezni minden makroszkopikus patológiai elváltozást, különös tekintettel a légzőrendszert érintő változásokra.

33. A vizsgálat értelmező értékének fokozása érdekében előzetesen, terv szerint kilátásba helyezhetők olyan további vizsgálatok, mint az életben maradt patkányok tüdeje súlyának megmérése és/vagy az irritációnak a légzőrendszer mikroszkópos vizsgálatával való igazolása. Megvizsgálhatók azok a szervek is, amelyek makroszkopikus patológia jeleit mutatják 24 óráig vagy annál tovább életben maradt állatoknál, valamint olyan szervek, amelyekről ismert vagy várható, hogy a vizsgált anyag hatást gyakorolt azokra. A teljes légzőrendszer mikroszkópos vizsgálata hasznos információkkal szolgálhat a vízzel könnyen reagáló vizsgált vegyi anyagokról, például a savakról és higroszkópos vegyi anyagokról.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

Adatok

34. Meg kell adni az egyes állatok testsúlyával és boncolási eredményeivel kapcsolatos adatokat. A klinikai megfigyelések adatait táblázatos formában össze kell foglalni, minden egyes vizsgált csoporthoz megadva a csoportban lévő állatok számát, a specifikus mérgezési tüneteket mutató, valamint a vizsgálat során elhullott vagy humánus okokból elpusztított állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

▼M4

Vizsgálati jegyzőkönyv

35. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell értelemszerűen tartalmaznia:

Kísérleti állatok és azok tartása

— a ketrecben való tartás körülményei, beleértve a következőket: az állatok ketrecenkénti száma (vagy számának változása), az alom anyaga, környezeti hőmérséklet és relatív páratartalom, a megvilágítás időtartama, valamint a takarmány meghatározása,

— a vizsgált faj/törzs, valamint a patkánytól eltérő faj alkalmazásának indokolása,

— az állatok száma, kora és neme,

— a véletlen kiválasztás módszere,

— a táplálék és a víz minőségére vonatkozó adatok (ezen belül a takarmány típusa/eredete, a víz eredete),

— a vizsgálat előtti esetleges kondicionálás leírása, beleértve a takarmányt, a karantént és a betegség kezelését,

Vizsgált vegyi anyag

— fizikai jelleg, tisztaság, valamint – ha lényeges – fizikai és kémiai tulajdonságok (beleértve az izomerizációt),

— azonosító adatok és – amennyiben ismert – a Vegyianyag Nyilvántartási Szolgálat szerinti nyilvántartási szám (CAS-szám),

Vivőanyag

— a vivőanyag használatának, valamint kiválasztásának indokolása (ha a vivőanyag nem víz),

— múltbeli vagy párhuzamosan kapott adatok, amelyek igazolják, hogy a vivőanyag nem befolyásolja a vizsgálat eredményét,

Inhalációs kamra

— az inhalációs kamra leírása, beleértve annak méreteit és térfogatát,

— az állatok expozíciójához és a légkör előállításához használt berendezések eredete és leírása,

— a hőmérséklet, páratartalom, részecskeméret és tényleges koncentráció mérésére szolgáló berendezések,

— a levegő forrása, a bevitt/elszívott levegő kezelése, valamint a kondicionáló rendszer,

— az eszközök homogén vizsgálati légkör biztosítása érdekében történő kalibrálására alkalmazott módszerek,

— nyomáskülönbség (pozitív vagy negatív),

— expozíciós nyílások száma kamránként (csak orron keresztüli expozíció), az állatok helye a rendszerben (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— a vizsgálati légkör időbeli homogenitása/stabilitása,

— a hőmérséklet- és páratartalom-érzékelők, valamint a vizsgálati légkör mintavételének helye a kamrában,

— légáramlási sebességek, légáramlási sebesség expozíciós nyílásonként (csak orron keresztüli expozíció), vagy az állatok terhelése kamránként (egész testfelületen keresztüli expozíció),

— adott esetben az oxigén és a szén-dioxid mérésére használt eszközökre vonatkozó információk,

▼M4

— az inhalációs kamra egyensúlyi állapotának eléréséhez szükséges idő (t_{95}),

— a térfogatváltozások óránkénti száma,

— mérőberendezések (ha vannak),

Expozíciós adatok

— a fő vizsgálathoz kiválasztott célkoncentráció indokolása,

— névleges koncentrációk (az inhalációs kamrába való bejuttatásra előállított vizsgált vegyi anyag össztömege osztva a kamrán áthaladt levegő térfogatával),

— a vizsgált vegyi anyagnak az állatok belégzési zónájából gyűjtött tényleges koncentrációi; a heterogén halmazállapotokat (gáz, gőz, aeroszol) felvevő vizsgált keverékek esetén mindegyik külön elemezhető,

— minden levegőbeli koncentrációt tömegegységekben (például mg/l, mg/m^3 stb.) kell megadni; zárójelben a térfogategységekben (például ppm, ppb) kifejezett értékek is feltüntethetők,

— részecskeméret-eloszlás, tömegfelező aerodinamikai átmérő (MMAD), valamint geometriai szórás (σ_g), beleértve azok kiszámításának módját. Jegyzőkönyvezni kell az egyes részecskeméret-elemzéseket,

Vizsgálati körülmények

— A vizsgált vegyi anyag előkészítésének részletei, beleértve a szilárd anyagok részecskeméretének csökkentésére vagy a vizsgált vegyi anyag oldatainak elkészítésére esetlegesen alkalmazott eljárások részleteit. mennyiben a mechanikai folyamatok megváltoztatták a vizsgált vegyi anyag összetételét, a vizsgált vegyi anyag összetételének ellenőrzése érdekében végzett elemzések eredményeit is fel kell tüntetni,

— a vizsgálati légkör előállítására és az állatok vizsgálati légkörnek való kitételére alkalmazott berendezések leírása (lehetőség szerint vázlatrajzzal),

— az alkalmazott kémiai analitikai módszer és a módszer validációjának részletei (beleértve a vizsgált vegyi anyag mintavételi közegből való visszanyerésének hatásfokát),

— a vizsgált koncentrációk kiválasztásának indokolása,

Eredmények

— a kamrabeli hőmérséklet, páratartalom és légáramlás táblázatos összefoglalása,

— a kamra névleges és tényleges koncentrációs adatainak táblázatos összefoglalása,

— részecskeméret-adatok táblázatos összefoglalása, beleértve az analitikai mintavételi adatokat, a részecskeméret-eloszlást, valamint az MMAD és a σ_g számításait,

— a válaszadatok és a koncentrációszintek táblázatos összefoglalása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és elhullt állatok, a hatások jellege, súlyossága és időtartama),

— az egyes állatok vizsgálati napokon mért testsúlya, az elhullás dátuma és időpontja, amennyiben az a tervszerű elpusztítást megelőzően történt, a toxicitási tünetek megjelenésének időbeli alakulása, valamint annak megjelölése, hogy azok visszafordíthatók voltak-e az egyes állatoknál,

▼M4

— a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan,

— CLP-kategóriák szerinti besorolás és az LC_{50}-határérték,

Az eredmények szöveges értékelése és értelmezése

— különös hangsúlyt kell fektetni az e vizsgálati módszer feltételeinek – például a határkoncentrációnak vagy a részecskeméretnek – való megfelelés érdekében alkalmazott módszerek leírására,

— ki kell térni a részecskék belélegezhetőségére az általános megállapítások tükrében, különösen ha a részecskeméretre vonatkozó feltétel nem teljesült,

— a vizsgálat általános értékelésének ismertetnie kell a névleges és a tényleges koncentrációk meghatározására használt módszerek konzisztenciáját, valamint a tényleges és a névleges koncentráció közötti összefüggést,

— ki kell térni az elhullás valószínű okára, valamint az elsődleges hatásmechanizmusra (szisztémás vagy helyi),

— magyarázatot kell szolgáltatni, amennyiben a humánus végpontokról szóló OECD-iránymutatás (7) szerinti kritériumok alapján humánus módon el kellett pusztítani a fájdalommal küszködő vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutató állatokat.

SZAKIRODALOM

(1) E melléklet B.2., Akut toxicitás (inhaláció) című fejezete.

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and 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 and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC_{50} Tests. *ALTEX* 1: 129-134.

(5) E melléklet B.1b., Akut orális toxicitás – Akut toxikus osztály módszer című fejezete.

(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 No. 105, OECD, Paris. Available at: [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. Available at: [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. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Az Európai Parlament és a Tanács 2008. december 16-i 1272/2008/EK rendelete az anyagok és keverékek osztályozásáról, címkézéséről és csomagolásáról, a 67/548/EGK és az 1999/45/EK irányelv módosításáról és hatályon kívül helyezéséről, valamint az 1907/2006/EK rendelet módosításáról, HL L 353., 2008.12.31., 1. o.

▼**M4**

(10) E melléklet B.40., In vitro bőrkorrózió: transzkután elektromos rezisztencia vizsgálat (TER) című fejezete.

(11) E melléklet B.40a., In vitro bőrkorrózió: emberi bőrmodellen végzett vizsgálat című fejezete.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [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. Appéldául Toxicol.* 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appéldául Toxicol. 27: 160-167

(16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼**M4**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁS

Vizsgált vegyi anyag: A jelen vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált bármely anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

Az egyes kiindulási gázkoncentrációk esetében követendő eljárás (ppm/4 óra)

Általános megjegyzések ([1])

Az egyes kiindulási koncentrációk esetében a jelen függelékben leírt vonatkozó vizsgálati rendszer vázolja a követendő eljárást.

2.a. függelék: a kiindulási koncentráció 100 ppm

2.b. függelék: a kiindulási koncentráció 500 ppm

2.c. függelék: a kiindulási koncentráció 2 500 ppm

2.d. függelék: a kiindulási koncentráció 20 000 ppm

A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a megjelölt nyilakat követi.

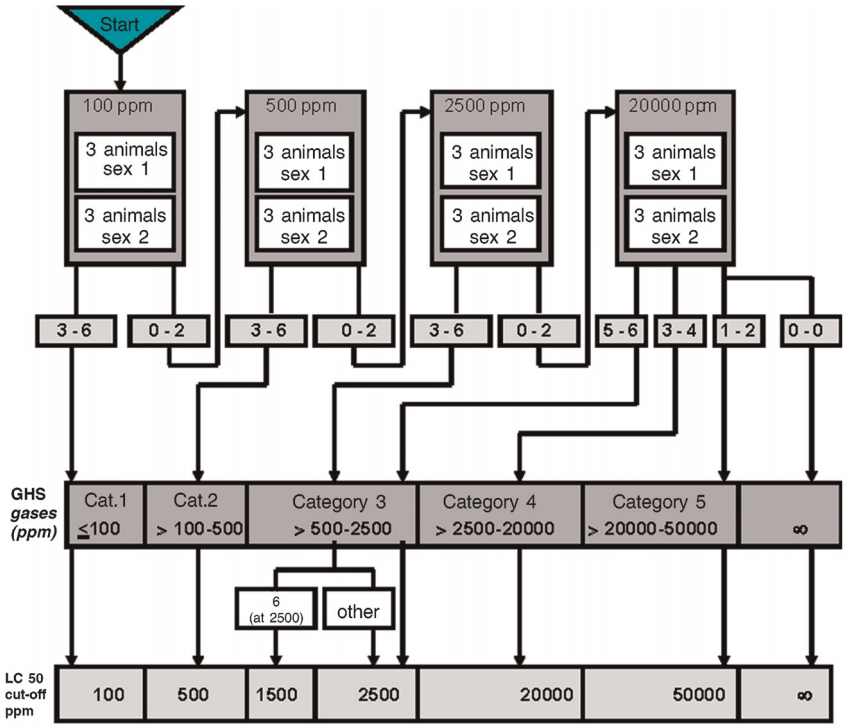
([1]) Az alábbi táblázatokban a GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) rendszerre találhatók hivatkozások. A rendszer uniós megfelelője az 1272/2008/EK rendelet. Az akut inhalációs toxicitás esetében az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szerepel az 5. kategória.

▼M4

2.a. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

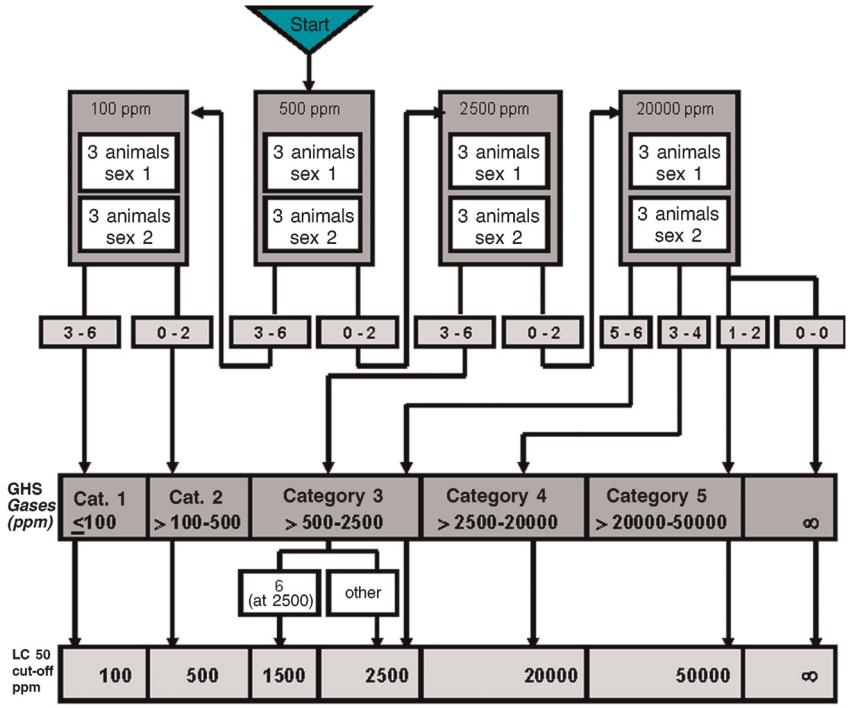
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

2.b. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

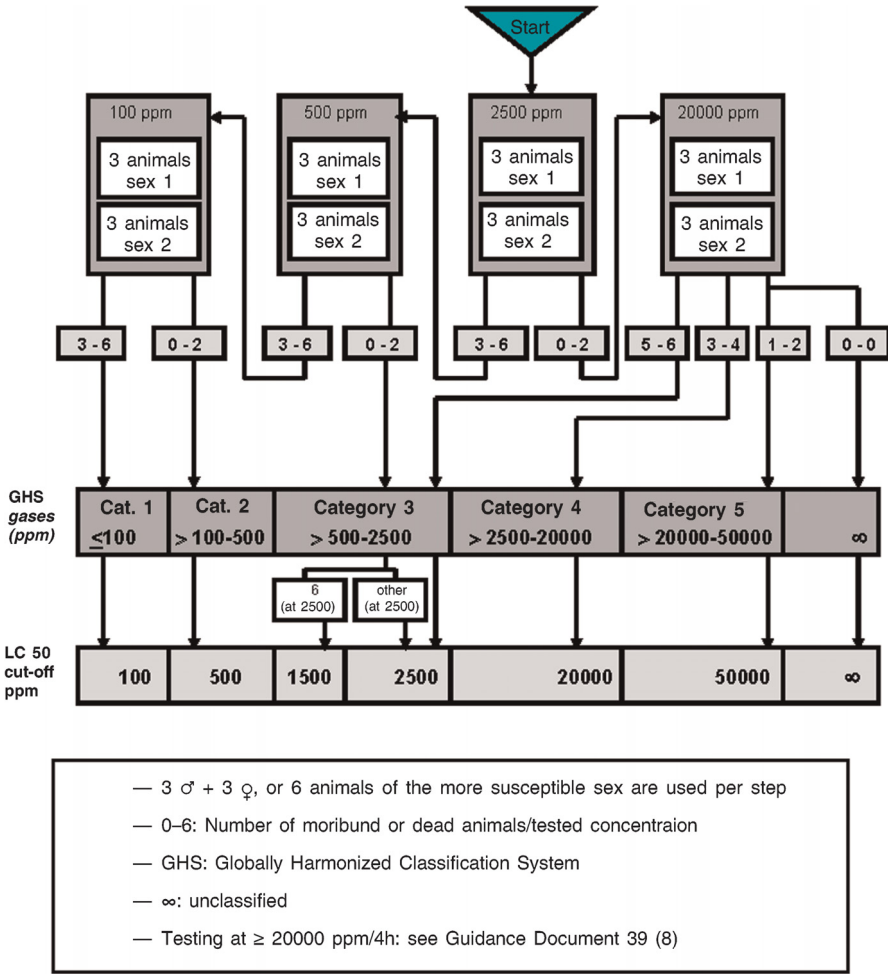
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

2.c. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

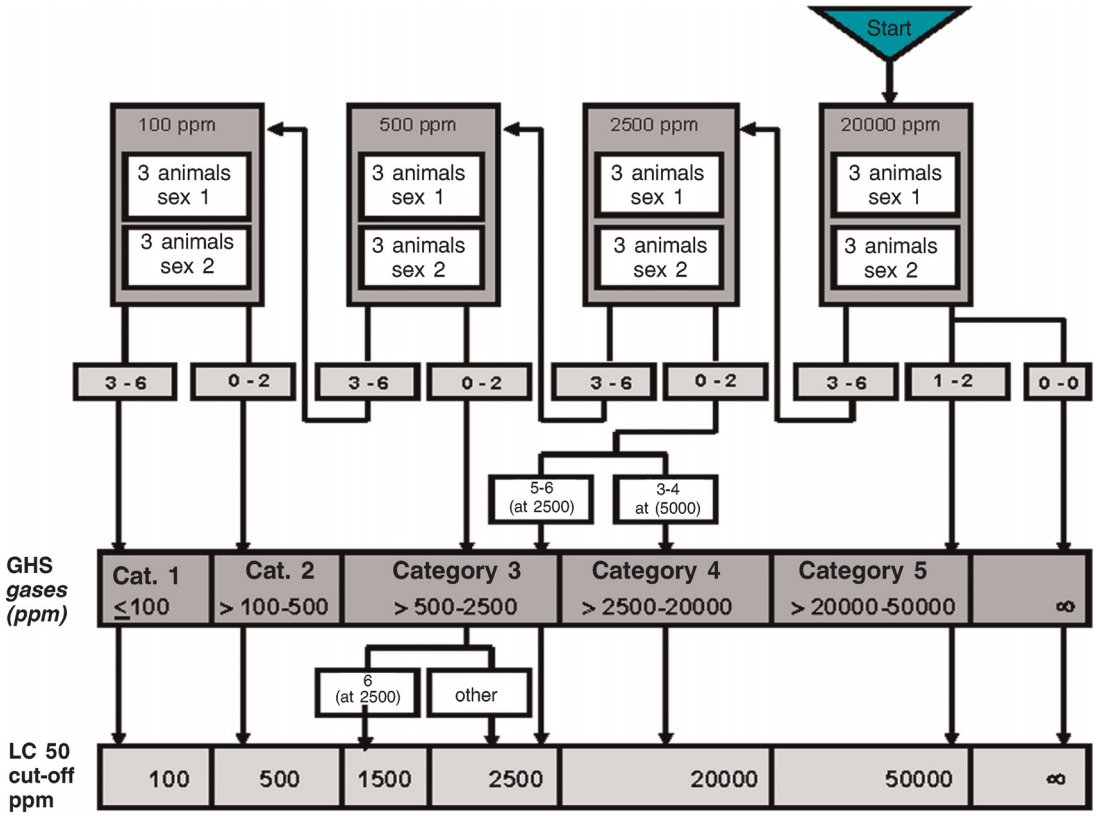
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

2.d. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

3. függelék

Az egyes kiindulási gőzkoncentrációk esetében követendő eljárás (mg/l/4 óra)

Általános megjegyzések ([1])

Az egyes kiindulási koncentrációk esetében a jelen függelékben leírt vonatkozó vizsgálati rendszer vázolja a követendő eljárást.

3.a. függelék: a kiindulási koncentráció 0,5 mg/l

3.b. függelék: a kiindulási koncentráció 2,0 mg/l

3.c. függelék: a kiindulási koncentráció 10 mg/l

3.d. függelék: a kiindulási koncentráció 20 mg/l

A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a megjelölt nyilakat követi.

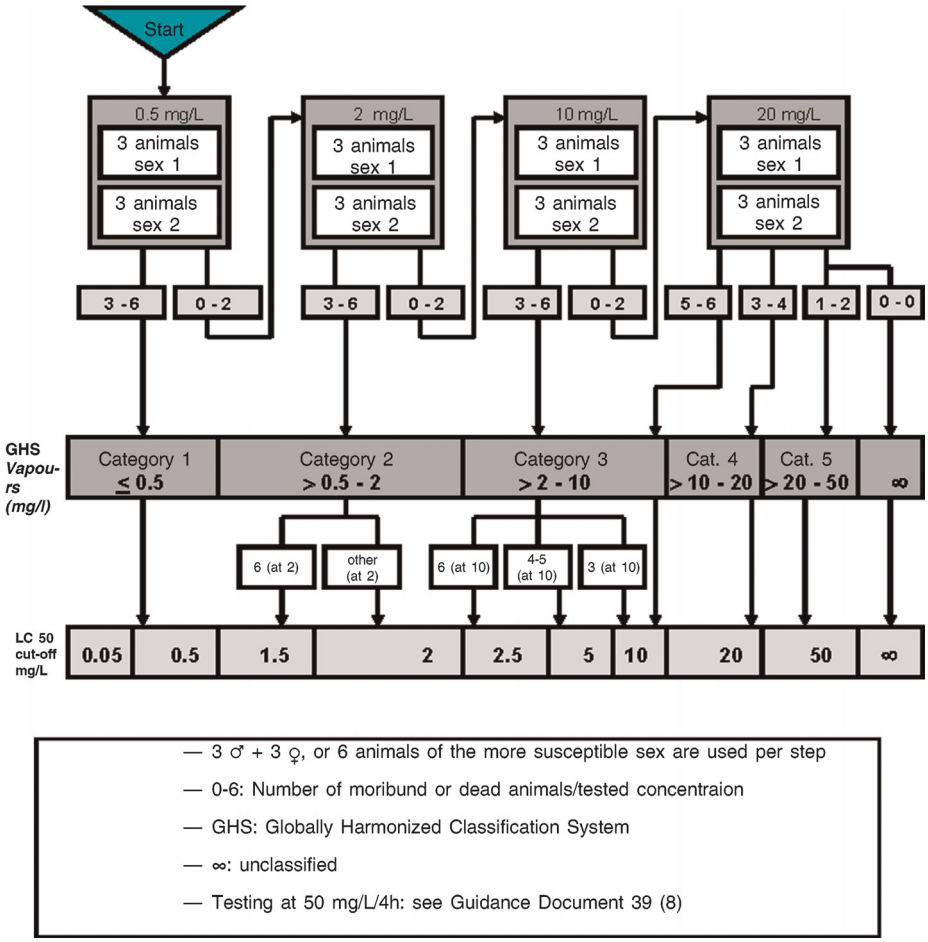
([1]) Az alábbi táblázatokban a GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) rendszerre találhatók hivatkozások. A rendszer uniós megfelelője az 1272/2008/EK rendelet. Az akut inhalációs toxicitás esetében az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szerepel az 5. kategória.

▼M4

3.a. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

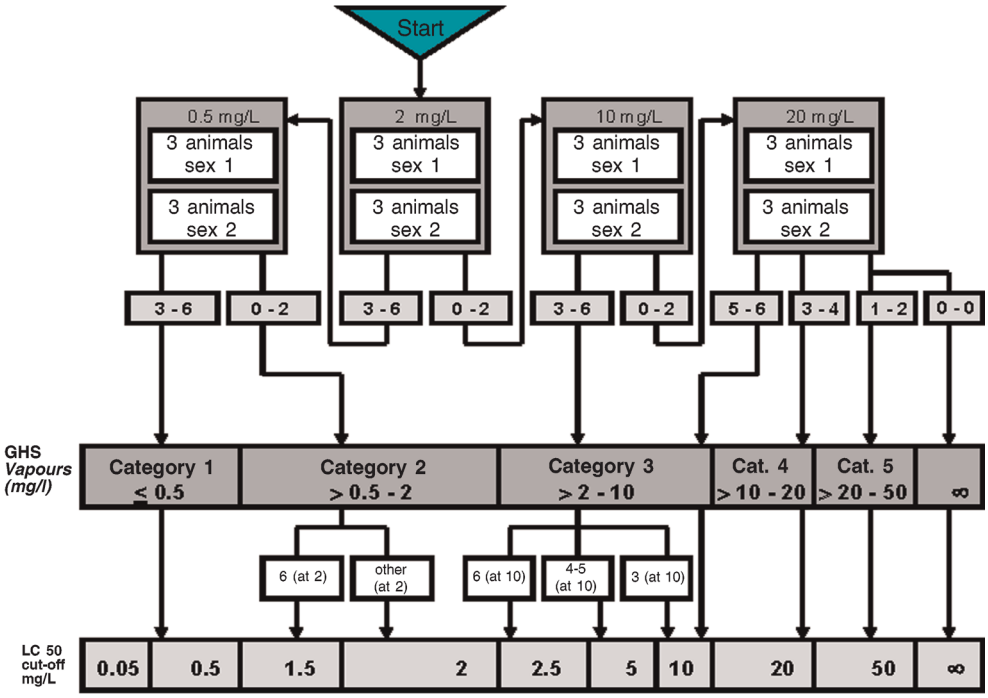
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

3.b. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

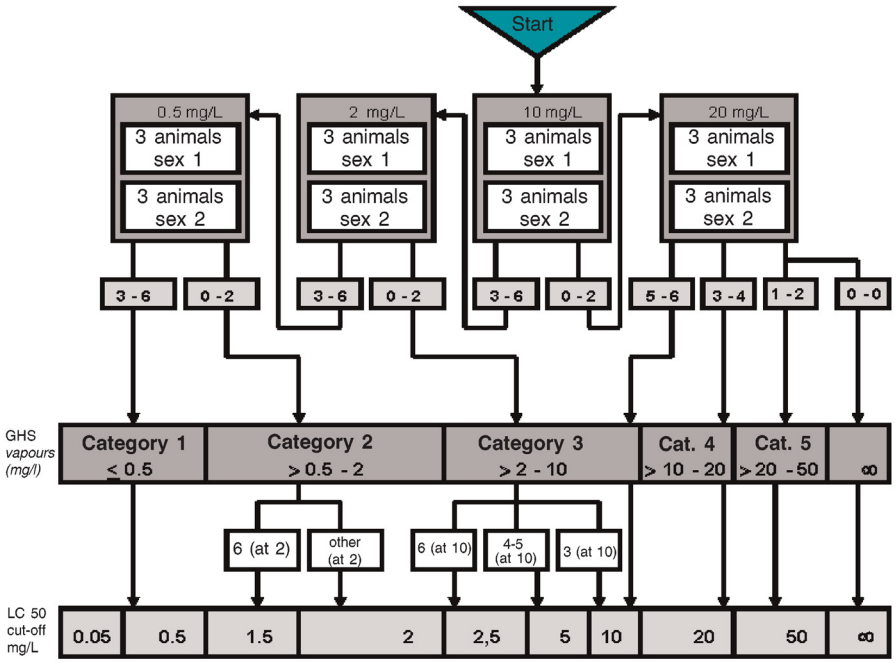
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

3.c. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

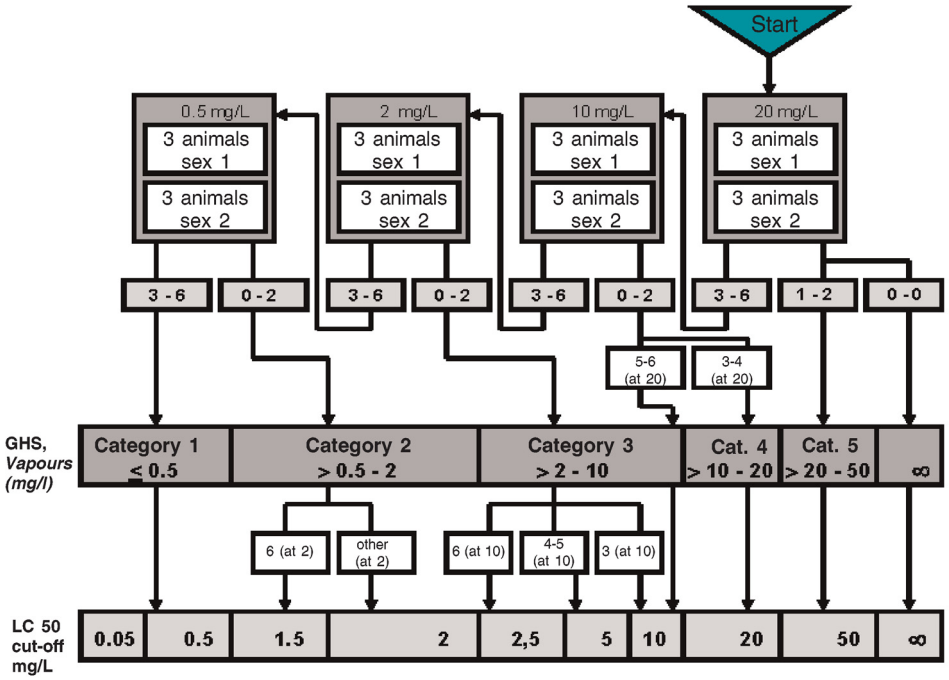
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

3.d. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼M4

4. függelék

Az egyes kiindulási aeroszolkoncentrációk esetében követendő eljárás (mg/l/4 óra)

Általános megjegyzések ([1])

Az egyes kiindulási koncentrációk esetében a jelen függelékben leírt vonatkozó vizsgálati rendszer vázolja a követendő eljárást.

4.a. függelék: a kiindulási koncentráció 0,05 mg/l

4.b. függelék: a kiindulási koncentráció 0,5 mg/l

4.c. függelék: a kiindulási koncentráció 1 mg/l

4.d. függelék: a kiindulási koncentráció 5 mg/l

A humánus módon elpusztított vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a megjelölt nyilakat követi.

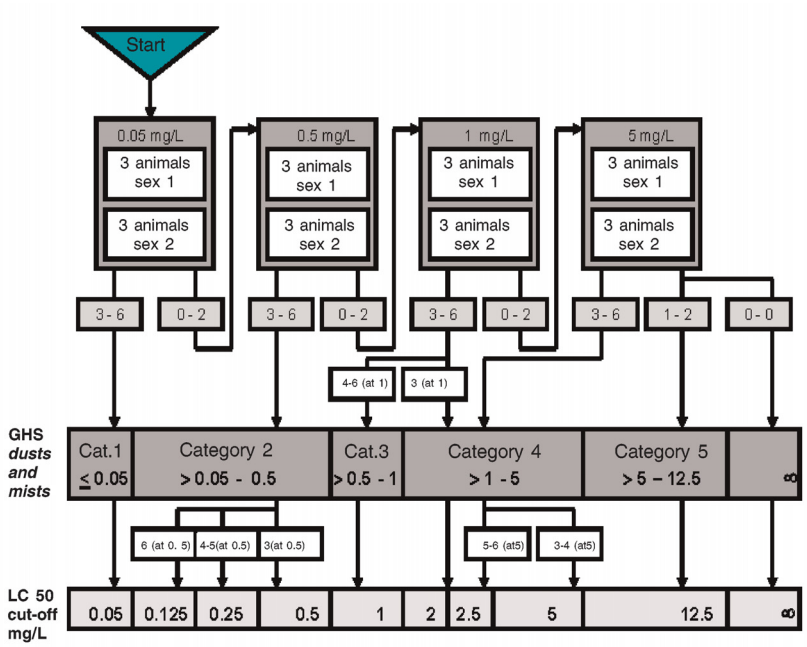
([1]) Az alábbi táblázatokban a GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) rendszerre találhatók hivatkozások. A rendszer uniós megfelelője az 1272/2008/EK rendelet. Az akut inhalációs toxicitás esetében az 1272/2008/EK rendeletben (9) nem szerepel az 5. kategória.

▼M4

4.a. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.05 mg/L/4h for vapours



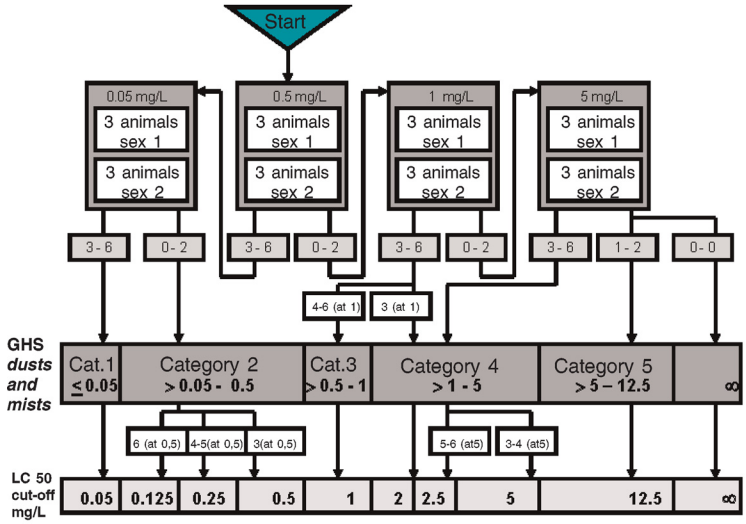
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

4.b. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for aerosols



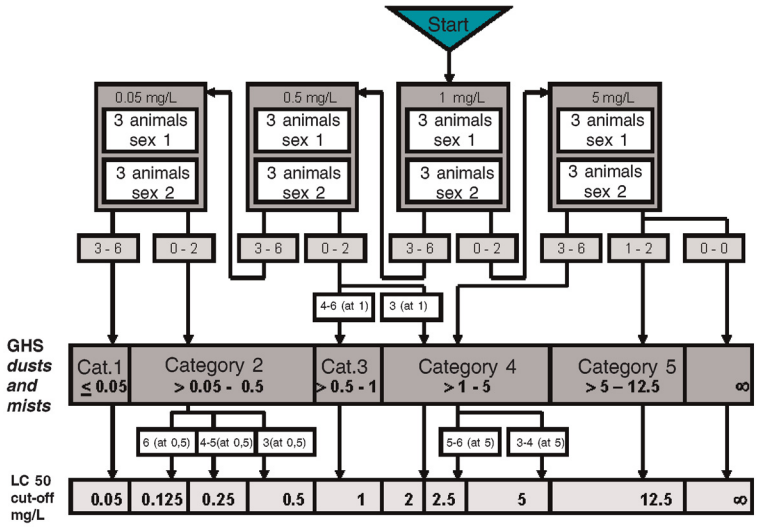
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

4.c. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

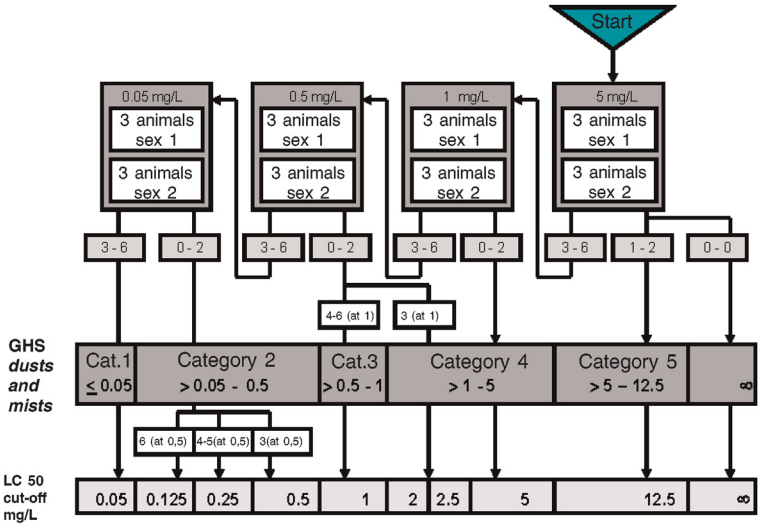
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

4.d. függelék

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)'

▼B

C. RÉSZ: AZ ÖKOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

TARTALOMJEGYZÉK

C.1.	AKUT TOXICITÁS HAL ESETÉBEN
C.2.	DAPHNIA-FAJOK AKUT IMMOBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATA
C.3.	SZAPORODÁSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT, ÉDESVÍZI ALGA ÉS CIANOBAKTÉRIUM
C.4.	A „GYORS” BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG MEGHATÁROZÁSA
I. RÉSZ	ÁLTALÁNOS
II. RÉSZ	DOC (OLDOTT SZERVES SZÉN) CSÖKKENÉSÉNEK VIZSGÁLATA (C.4-A. módszer)
III. RÉSZ.	MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT (DOC-CSÖKKENÉS) (C.4-B. módszer).
IV. RÉSZ	CO_2-FEJLŐDÉS-VIZSGÁLAT (C.4-C. módszer)
V. RÉSZ	MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS MÉRÉS (C.4-D. módszer)
VI. RÉSZ.	ZÁRTPALACK-MÓDSZER (C.4-E. módszer)
VII. RÉSZ	MITI-VIZSGÁLAT (C.4-F. módszer)
C.5.	LEBOMLÁS – BIOKÉMIAI OXIGÉNIGÉNY
C.6.	LEBOMLÁS – KÉMIAI OXIGÉNIGÉNY
C.7.	LEBOMLÁS – ABIOTIKUS LEBOMLÁS: HIDROLÍZIS A PH FÜGGVÉNYÉBEN.
C.8.	TOXICITÁS FÖLDIGILISZTÁKRA
C.9.	BIOLÓGIAI LEBOMLÁS – ZAHN–WELLENS VIZSGÁLAT
C.10.	AEROB SZENNYVÍZTISZTÍTÁS-SZIMULÁCIÓS VIZSGÁLAT: C.10-A: ELEVENISZAPOS BERENDEZÉSEK – C.10-B: BIOFILMEK
C.11.	BIOLÓGIAI LEBOMLÁS – ELEVENISZAP-LÉGZÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT
C.12.	BIOLÓGIAI LEBOMLÁS – MÓDOSÍTOTT SCAS-VIZSGÁLAT
C.13.	BIOKONCENTRÁCIÓ VIZSGÁLATA: ÁTFOLYÁSOS HAL VIZSGÁLAT
C.14.	HALIVADÉKOK NÖVEKEDÉSI VIZSGÁLATA
C.15.	RÖVID TÁVÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT HALEMBRIÓKKAL ÉS HALLÁRVÁKKAL
C.16.	HÁZIMÉH – AKUTORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
C.17.	HÁZIMÉH – AKUTKONTAKTTOXICITÁS-VIZSGÁLAT
C.18.	KÉMIAI ANYAGOK TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA EGYENSÚLYI RENDSZERBEN

▼**B**

C.19.	ADSZORPCIÓS EGYÜTTHATÓ BECSLÉSE TALAJON ÉS SZENNYVÍZISZAPON NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)
C.20.	*DAPHNIA MAGNÁ*N VÉGZETT REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT
C.21.	TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: NITROGÉN-ÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT
C.22.	TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: SZÉNÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT
C.23.	AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS A TALAJBAN
C.24.	AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS VÍZI ÜLEDÉKRENDSZEREKBEN
C.25.	AEROB MINERALIZÁCIÓ FELSZÍNI VIZEKBEN – VIZSGÁLAT A BIOLÓGIAI LEBONTÁS SZIMULÁLÁSÁRA
C.26.	*LEMNA* SP. NÖVEKEDÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLATA

▼**M4**

C.27.	SZENNYEZETT ÜLEDÉKKEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL
C.28.	SZENNYEZETT VÍZZEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL
C.29.	GYORS BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG: SZÉN-DIOXID-VIZSGÁLAT LÉGMENTESEN ZÁRT EDÉNYEKBEN (A GŐZTÉR CO_2-TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA)
C.30.	BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁS SZÁRAZFÖLDI KEVÉSSERTÉJŰEKBEN

▼B

C.1. AKUT TOXICITÁS HAL ESETÉBEN

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat célja valamely anyag akut letális toxicitásának meghatározása édesvízi halak esetében. Hasznosnak bizonyul, ha rendelkezésre állnak információk az anyag vízoldékonyságáról, gőznyomásáról, kémiai stabilitásáról, disszociációs állandóiról és biológiai lebonthatóságáról annak érdekében, hogy a legmegfelelőbb vizsgálati módszert lehessen kiválasztani (statikus, félstatikus vagy átfolyásos) a vizsgálat időtartama alatt a vizsgált anyag kielégítően állandó koncentrációinak biztosításához.

Mind a vizsgálat tervezéséhez, mind az eredmények értelmezéséhez figyelembe kell venni további információkat is (ilyenek például a szerkezeti képlet, a tisztasági fok, szennyeződések jellege és százalékos aránya, adalékanyagok jelenléte és mennyisége, az n-oktanol/-víz megoszlási koefficiens).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Az akut toxicitás valamely anyag hatásának való kitételkor (expozíció) rövid időn (napokon) belül, valamely szervezetben előidézett, észlelhető káros hatás. E vizsgálatban az akut toxicitást a közepes letális koncentrációval (LC_{50}) kell kifejezni, vagyis azzal a vízben mért koncentrációval, amely a kísérleti halak csoportjának 50 %-ánál halált okoz valamilyen folyamatos expozíciós időtartamon belül, amelyet meg kell adni.

A vizsgált anyag minden koncentrációját tömeg/térfogat (milligramm/liter) mértékegységben kell megadni. E koncentrációk tömeg/tömeg mértékegységben ($mg \cdot kg^{-1}$) is megadhatók.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Vizsgálható referenciaanyag annak bemutatására, hogy a laboratóriumi vizsgálati körülmények között nem változott-e meg jelentős mértékben a vizsgált fajok reakciója.

E vizsgálathoz nincs előírva referenciaanyag.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Végrehajtható határérték-vizsgálat 100 mg/liter koncentrációban annak bemutatására, hogy az LC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

A halakat a vízhez adott vizsgált anyag hatásának kell kitenni, koncentrációk egész tartományában, 96 órás időtartamon át. A pusztulást legalább 24 órás időközönként fel kell jegyezni, és ahol lehetséges, ki kell számítani az egyes megfigyelési időpontokban a halak 50 %-át elpusztító koncentrációkat (LC_{50}).

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A minőségi követelmények mind a határérték-vizsgálati, mind a teljes vizsgálati módszerre érvényesek.

A kontrollcsoportban a kísérlet végéig a halpusztulásnak nem szabad 10 %-nál nagyobbnak lennie (vagy maximum egy hal pusztulhat el, ha tíznél kevesebb halat használnak).

Az oldott oxigén koncentrációjának mindvégig nagyobbnak kell lennie, mint a levegőtelítettségi érték 60 %-a.

▼B

A vizsgált anyag koncentrációit a kísérlet során mindvégig a kezdeti koncentráció 80 %-án belüli értéken kell tartani.

Az olyan anyagok esetében, amelyek stabil oldatokat képezve könnyen oldódnak a vizsgált közegben, tehát azok, amelyek jelentős mértékben nem fognak párologni, lebomlani, hidrolizálni vagy abszorbeálódni, a kezdeti koncentráció a névleges koncentrációval egyenlőnek tekinthető. Bizonyítani kell, hogy a koncentrációk a vizsgálat során mindvégig megmaradnak, és a minőségi követelmények teljesülnek.

Azon anyagok esetében, amelyek:

i. a vizsgált közegben kevéssé oldhatók; vagy

ii. stabil emulziók vagy diszperziók létrehozására képesek; vagy

iii. vizes oldatokban nem stabilak,

abból kell kiindulni, hogy a kezdeti koncentráció a vizsgálat kezdetén az oldatban mért (vagy ha ez technikailag nem lehetséges, a vízoszlopban mért) koncentráció. A koncentrációt az egyensúlyba hozatal után, de a kísérleti halak behelyezése előtt kell meghatározni.

Ezen esetek közül mindegyikben további méréseket kell végrehajtani a vizsgálat során a tényleges expozíciós koncentrációk megerősítésére, vagy annak megerősítésére, hogy teljesülnek-e a minőségi követelmények.

A pH-nak nem szabad 1 egységnél nagyobb mértékben változnia.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Típusát tekintve háromféle eljárás használható:

Statikus vizsgálat:

Ez olyan toxicitásvizsgálat, amelyben a vizsgált oldat nem áramlik. (Az oldatok mindvégig változatlanok maradnak a vizsgálat végrehajtása során.)

Félstatikus vizsgálat:

Olyan, a vizsgált oldat áramlása nélküli vizsgálat, amelynél rendszeresen, adagonként ki kell cserélni a vizsgált oldatokat hosszabb időtartamok (például 24 óra) eltelte után.

Átfolyásos vizsgálat:

Olyan toxicitásvizsgálat, amelyben a vizet állandóan cserélik a vizsgálati kamrákban, a már használt vízzel együtt elszállítva a vizsgált kémiai anyagot a vizsgált közeg kicserélése érdekében.

1.6.1. **Reagensek**

1.6.1.1. *A vizsgált anyagok oldatai*

El kell készíteni a szükséges erősségű törzsoldatokat az anyagnak ionmentesített vízben vagy az 1.6.1.2. pontnak megfelelő vízben történő feloldásával.

A kiválasztott vizsgált koncentrációkat a törzsoldat hígításával kell elkészíteni. Ha nagy koncentrációkat vizsgálnak, az anyag közvetlenül a hígítóvízben feloldható.

▼B

Az anyagokat általában csak az oldhatóság határáig kell vizsgálni. Néhány anyagnál (például olyan anyagok esetében, amelyeknek kicsi a vízoldékonysága, nagy a P_{ow} értéke, vagy azok esetében, amelyek stabil diszperziót alkotnak, nem pedig valódi oldatot hoznak létre vízben) elfogadható az anyag oldhatósági határa fölötti vizsgált koncentráció használata a maximális oldható/stabil koncentráció elérésének biztosítására. Fontos azonban, hogy e koncentráció ne zavarja meg a vizsgált rendszert valamilyen más módon (például az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén).

Ultrahangos diszpergálás, szerves oldószerek, emulgeáló- vagy diszpergálószerek használhatók alacsony vízoldékonyságú anyagok törzsoldatai elkészítésének elősegítésére, vagy a vizsgált közegben az ilyen anyagok diszpergálódásának segítésére. Amikor ilyen segédanyagokat használnak, minden vizsgált koncentrációnak ugyanolyan mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia, és további kontrollhalakat kell kitenni a segédanyag ugyanolyan koncentrációja hatásának, mint amelyet a vizsgálati sorozatokban alkalmaznak. Minden ilyen segédanyag koncentrációját minimális értéken kell tartani, de semmi esetre sem szabad meghaladnia a 100 mg/liter értéket a vizsgált közegben.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell végrehajtani. Ha létezik bizonyíték a pH-érték jelentős változására, ajánlatos a vizsgálat megismétlése a pH-érték beállításával, meg kell adni az így kapott eredményeket. Ezen esetben be kell állítani a törzsoldat pH-értékét a hígítóvíz pH-értékére, kivéve ha különleges okok szólnak ellene. E célra a legkedvezőbb a HCl és az NaOH használata. Ezt a pH-korrekciót úgy kell végrehajtani, hogy ne változzon meg jelentős mértékben a vizsgált anyag koncentrációja a törzsoldatban. Ha a beállítás a vizsgált vegyület valamilyen kémiai reakcióját vagy fizikai kicsapódását okozza, ezt közölni kell a jelentésben.

1.6.1.2. *Tároló- és hígítóvíz*

Ivóvízellátó rendszerből vett (klór, nehézfémek vagy más anyagok potenciálisan káros koncentrációival nem szennyezett), jó minőségű természetes víz vagy művíz (lásd az 1. függeléket) használható. A 10 és 250 mg/l közötti keménységű ($CaCO_3$-ként meghatározva), 6,0 és 8,5 közötti pH-jú vizeket kell előnyben részesíteni.

1.6.2. **Készülék**

Minden készüléket kémiailag inert anyagból kell készíteni:

— automatikus hígító rendszer (átfolyásos vizsgálathoz),

— oxigénmérő,

— vízkeménység meghatározására szolgáló berendezés,

— megfelelő készülék a hőmérséklet szabályozásához,

— pH-mérő.

1.6.3. **Kísérleti hal**

A halaknak jó egészségi állapotban kell lenniük, és mindenfajta látható testi hibától mentesnek kell lenniük.

▼B

A kísérlethez használt fajtákat olyan gyakorlati kritériumok alapján kell kiválasztani, mint például egész évbeni könnyű beszerezhetőségük, a problémamentes tartás, a vizsgálati célokra való megfelelőség, relatív érzékenység a kémiai anyagokra és minden olyan gazdasági, biológiai vagy ökológiai tényező, amelynek bármilyen hatása lehet. A halfajták kiválasztásakor a kapott adatok összehasonlíthatóságát és a nemzetközi harmonizáció szükségességét (lásd az 1. pontban hivatkozott szakirodalmat) is szem előtt kell tartani.

A 2. függelék ismerteti az e vizsgálat végrehajtásához javasolt halfajták jegyzékét; az előnyben részesített fajták a zebradánió és a szivárványos pisztráng.

1.6.3.1. *Tartás*

A kísérleti halaknak lehetőleg egyetlen állományból kell származniuk, hasonló méretűeknek és korúaknak kell lenniük. A halakat legalább 12 napig a következő körülmények között kell tartani:

betöltés:

a rendszernek (visszaforgatás vagy átáramoltatás) és a halfajtáknak megfelelően,

víz:

lásd az 1.6.1.2. pontot,

világítás:

napi 12–16 órás megvilágítás,

oldott oxigén koncentrációja:

a levegőtelítettségi érték legalább 80 %-a,

etetés:

hetente vagy naponta háromszor, amelyet a vizsgálat kezdete előtt 24 órával befejeznek.

1.6.3.2. *Mortalitás*

A 48 órás szoktatási időtartamot követően fel kell jegyezni az elpusztult állatok számát a következő kritériumok alkalmazásával:

— ha a populáció 10 %-ánál több hal elpusztul 7 napon belül:

akkor a teljes állományt le kell selejtezni,

— ha a populáció 5 és 10 %-a pusztul el:

akkor a tartási idő 7 további nappal meghosszabbodik.

Ha további pusztulás nem történik, az állomány elfogadható, egyébként nem,

— ha a populáció kevesebb, mint 5 %-a pusztul el:

akkor az állomány alkalmazható a vizsgálathoz.

1.6.4. **Szoktatási időtartam**

Az alkalmazás előtt minden halat legalább 7 napig kell tartani olyan minőségű és hőmérsékletű vízben, mint amit a vizsgálat során fognak alkalmazni.

▼B

1.6.5. **A kísérlet végrehajtása**

A vizsgálatot megelőzheti egy előzetes vizsgálat, amely információkkal szolgál arról a koncentrációtartományról, amelyet a fő vizsgálatban kell használni.

A vizsgált sorozaton kívül vizsgált anyag nélküli kontrollvizsgálatot, és a segédanyagot tartalmazó kontrollanyag-vizsgálatot is végre kell hajtani.

A vizsgált vegyület fizikai és kémiai tulajdonságaitól függően statikus, félstatikus vagy átfolyásos vizsgálatot lehet választani, a minőségi követelmények teljesítése érdekében.

A halakat a következő módon kell kitenni az anyag hatásának:

— időtartam: 96 óra,

— állatok száma: koncentrációnként legalább 7,

— tartályok: alkalmas űrtartalmúak, a javasolt egyedsűrűség figyelembevételével,

— egyedsűrűség: 1 g hal/liter ajánlott a statikus és a félstatikus vizsgálatokhoz; az átfolyásos rendszerekhez elfogadható ennél nagyobb egyedsűrűség is,

— vizsgált koncentráció: legalább 5, egymástól 2,2-et nem meghaladó konstans tényezővel eltérő és, amennyire lehetséges, a 0–100 %-os mortalitási tartományt átfedő koncentráció,

— víz: lásd az 1.6.1.2. pontot,

— világítás: 12–16 órás megvilágítás naponta,

— hőmérséklet: a fajtáknak megfelelő (lásd a 2. függeléket), de minden esetben ± 1 °C-on belül,

— az oldott oxigén koncentrációja: a kiválasztott hőmérsékleten a levegőtelítettségi érték nem kevesebb, mint 60 %-a,

— etetés: nincs.

A halakat meg kell vizsgálni az első 2–4 óra után, és legalább 24 órás időközönként. A halak akkor tekinthetők élettelennek, ha a farokúszó érintése nem vált ki reakciót, és nem látható semmilyen légzőmozgás. Az elpusztult halakat el kell távolítani, és ezt fel kell jegyezni. Nyilvántartást kell vezetni a látható rendellenességekről (például egyensúly-vesztés, az úszási viselkedés és a légzés változásai, pigmentáció stb.).

Naponta végre kell hajtani a pH-érték, az oldottoxigén-koncentráció és a hőmérséklet méréseit.

Határérték-vizsgálat

Az e módszerben leírt eljárások segítségével végrehajtható a határérték-vizsgálat 100 mg/l koncentrációval annak bemutatására, hogy az LC_{50} nagyobb, mint e koncentráció.

Ha az anyag olyan természetű, hogy nem érhető el a vizsgált vízben a 100 mg/l-es koncentráció, a határérték-vizsgálatot a használt közegben az anyag oldhatóságával egyenlő koncentrációval (vagy a stabil diszperziót alkotó maximális koncentrációval) kell végrehajtani (lásd még az 1.6.1.1. pontot is).

▼B

A határérték-vizsgálatot 7–10 hallal kell végrehajtani úgy, hogy a kontrollcsoportban lévő halak száma ezzel azonos legyen. (A binomiális elmélet szerint, amikor 10 hal alkalmazása mellett nem tapasztaltak halálozást, akkor 99,9 %-os a megbízhatósága annak, hogy az LC_{50} nagyobb, mint a határérték-vizsgálatban használt koncentráció. 7, 8 vagy 9 hal esetében a nulla halálozás legalább 99 %-os megbízhatóságot biztosít arra, hogy az LC_{50} nagyobb, mint az alkalmazott koncentráció).

Ha pusztulás következik be, a teljes vizsgálatot végre kell hajtani. Ha szubletális hatásokat figyelnek meg, ezeket fel kell jegyezni.

2. **ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS**

Minden olyan időtartamhoz, amikor megfigyeléseket jegyeztek fel (24, 48, 72 és 96 óra), fel kell rajzolni a féllogaritmusos papírra az egyes javasolt expozíciós időtartamok során a koncentráció függvényében megállapított százalékos pusztulást.

Ha lehetséges, minden egyes megfigyelési időhöz meg kell becsülni az LC_{50}-et és a konfidenciahatárokat ($p = 0,05$) standard eljárások segítségével; ezen értékeket egy vagy legfeljebb két szignifikáns számjegyre kell kerekíteni (példák két számjegyre kerekítésre: a 173,5-ből 170; 0,127-ből 0,13; 1,21-ből 1,2 lesz).

Olyan esetekben, amikor a koncentráció/hatás görbe meredeksége túl nagy ahhoz, hogy lehetővé váljon az LC_{50} kiszámítása, elegendő ezen érték grafikus becslése.

Ha két, egymást követő koncentráció 2,2 arány mellett csak 0 és 100 %-os pusztulást ad, akkor ez a két érték elegendő azon tartomány jelzésére, amelybe az LC_{50} esik.

Ha megállapítható, hogy nem tartható fenn a vizsgált anyag stabilitása vagy homogenitása, ezt közölni kell a jelentésben, és körültekintően kell eljárni az eredmények értelmezésekor.

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a kísérleti halakkal kapcsolatos információkat (tudományos név, törzs, szállító, mindenféle előkezelés, számuk és méretük az egyes vizsgált koncentrációkban),

— a hígítóvíz eredetét és fő kémiai jellemzőit (pH, keménység, hőmérséklet),

— alacsony vízoldékonyságú anyagok esetében a törzsoldat és vizsgált oldat elkészítésének módszerét,

— minden segédanyag koncentrációját,

— a használt koncentrációk jegyzékét és a vizsgált oldatban a vizsgált anyag koncentrációinál a stabilitással kapcsolatban rendelkezésre álló minden információt,

— kémiai elemzés esetén: a használt módszereket és kapott eredményeket,

— a határérték-vizsgálat eredményeit, adott esetben,

— az alkalmazott vizsgálati eljárás kiválasztásának indokait és részleteit (például statikus, félstatikus, adagolási sebesség, átfolyási sebesség, levegőztetett-e, egyedsűrűség stb.),

▼B

— a vizsgáló berendezés leírását,

— a világítási rendszert,

— a vizsgált oldatok oldottoxigén-koncentrációit, pH-értékeit és hőmérsékleteit, minden 24 órában,

— bizonyítékot arról, hogy teljesültek a minőségi követelmények,

— táblázatot, amely mutatja a kumulatív pusztulást minden egyes koncentráció és kontroll esetében (és ha szükséges, a segédanyagot tartalmazó kontroll esetében is) minden egyes javasolt megfigyelési időpontban,

— a koncentráció/hatás görbe grafikus ábrázolását a vizsgálat végén,

— ha lehetséges, az LC_{50}-értékeket minden egyes javasolt megfigyelési időpontban (95 %-os konfidenciahatárokkal),

— az LC_{50}-értékek meghatározására használt statisztikai eljárásokat,

— ha referenciaanyagot használnak, a kapott eredményeket,

— azt a legnagyobb vizsgált koncentrációt, amely még nem okoz pusztulást a vizsgálat időtartamában,

— azt a legalacsonyabb vizsgált koncentrációt, amely 100 %-os pusztulást okoz a vizsgálat időtartamában.

4. **SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 203. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges és frissítések.

(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 toxicity of a substance to Salmo gairdneri – Static and Flow-through methods – NFT 90-303 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* Hamilton-Buchanan – *Teleostei*, *Cyprinidae*). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für 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 reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertabrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity 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, fourteenth 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) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolf, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien 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 biossay 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. Hamelink). 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

1. függelék:

Művíz

Példa megfelelő hígítóvízre

Minden kémiai anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

A víznek jó minőségű, desztillált víznek vagy 5 μScm^{-1}-nél kisebb vezetőképességű, ioncserélt víznek kell lennie.

A víz desztillálásához használt készüléknek semmilyen rézből készült alkatrészt nem szabad tartalmaznia.

Törzsoldatok:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (kalcium-klorid-dihidrát):	11,76 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (magnézium-szulfát-heptahidrát):	4,93 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
$NaHCO_3$ (nátrium-hidrogén-karbonát):	2,59 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	
KCl (kálium-klorid):	0,23 g
Vízben kell feloldani, és vízzel 1 literre feltölteni.	

A hígításhoz használt művíz

A négy törzsoldat mindegyikéből 25 ml-t kell összekeverni, és vízzel 1 literre feltölteni.

A keveréket addig kell levegőztetni, amíg az oldott oxigén koncentrációja egyenlő nem lesz a levegőtelítettségi értékkel.

A pH-nak 7,8 ± 0,2-nek kell lennie.

Ha szükséges, a pH-t NaOH-val (nátrium-hidroxiddal) vagy HCl-dal (sósavval) kell beállítani.

Az így elkészített hígítóvizet 12 óráig állni kell hagyni, és nem szabad tovább levegőztetni.

Ezen oldatban a Ca- és Mg-ionok összege 2,5 mmol/liter. A Ca:Mg ionok aránya 4:1 és az Na:K ionok aránya 10:1. Ezen oldat teljes lúgossága 0,8 mmol/liter.

A hígítóvíz elkészítésekor nem szabad megváltoztatni a víz összetételét vagy tulajdonságait.

▼B

2. függelék:

A vizsgálathoz javasolt halfajták

Javasolt fajták	Javasolt vizsgálati hőmérséklet-tartomány (°C)	A kísérleti állatok javasolt összhosszúsága (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton–Buchanan) zebradánió	20-tól 24-ig	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) amerikai cselle	20-tól 24-ig	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) ponty	20-tól 24-ig	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poecilidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlegel 1850) japán fogasponty	20-tól 24-ig	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) guppi	20-tól 24-ig	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) kékkopoltyús naphal	20-tól 24-ig	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) szivárványos pisztráng	12-től 17-ig	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) jász	20-tól 24-ig	6,0 ± 2,0

Tenyésztés

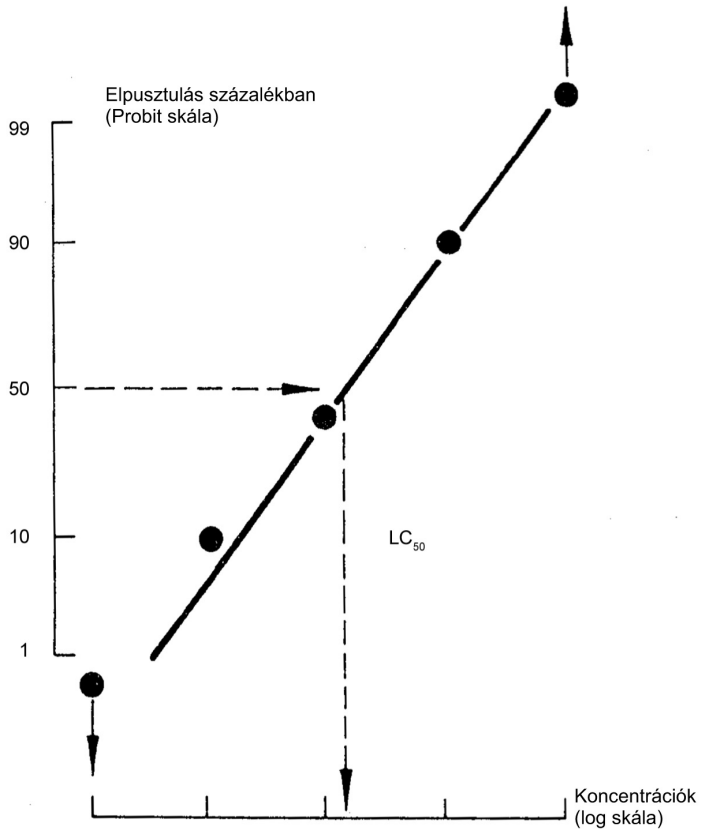
A fent felsorolt halakat könnyű tenyészteni és/vagy könnyen beszerezhetők az egész év során. Alkalmasak a tenyésztésre vagy halgazdaságokban, vagy laboratóriumban, betegség- és parazitakontrollált állapotok mellett úgy, hogy a kísérleti állatok egészségesek és ismert származásúak lesznek. E halak a világ számos részén rendelkezésre állnak.

▼B

3. függelék:

Példa koncentrációra: elpusztulás százalékban

Példa LC_{50} meghatározására féllogaritmusos papír segítségével



▼B

C.2. *DAPHNIA-FAJOK* AKUT IMMOBILIZÁCIÓS VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

Ez az akut immobilizációs vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 202 (2004) módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a módszer egy akut toxicitási vizsgálatot ír le, amely a vegyi anyagok Daphniákra gyakorolt hatását értékeli. Amennyire csak lehetett, meglévő vizsgálati módszereket alkalmaztunk (1) (2) (3).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Ezzel a módszerrel összefüggésben a következő meghatározásokat alkalmazzuk:

EC_{50}: az a becsült koncentráció, amely a Daphniák 50 %-át mozgásképtelenné teszi valamely meghatározott expozíciós időtartamon belül. Amennyiben más meghatározás kerül alkalmazásra, arról be kell számolni, a referenciájával együtt.

Mozgásképtelenség: Azokat az állatokat, amelyek a vizsgálati tartály óvatos megkeverése után 15 másodpercen belül nem képesek úszni, mozgásképtelennek kell tekinteni (még akkor is, ha a csápjaikat még tudják mozgatni).

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A fiatal Daphniákat, melyek a vizsgálat kezdetén 24 óránál fiatalabbak, a vizsgált anyag különböző koncentrációinak teszik ki 48 órás időtartamon át. Az immobilizálást 24 és 48 óra elteltével rögzítik, és összehasonlítják a kontrollértékekkel. Az eredményeket elemzik a 48 órás EC_{50} kiszámítása végett (lásd az 1.2. szakaszt a meghatározásokról). A 24 órás EC_{50} meghatározása opcionális.

1.4. INFORMÁCIÓ A VIZSGÁLATI ANYAGRÓL

Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldékonyságát és gőznyomását, és a vizsgálati oldatokban lévő anyag mennyiségi meghatározásához rendelkezni kell egy olyan megbízható analitikai módszerrel, amelynél ismert a visszanyerési hatékonyság és meghatározás korláta. A hasznos információk közé tartozik a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, vízben való stabilitása vagy fénystabilitása, a P_{ow} és a gyors biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálat eredményei (lásd C.4. módszer).

Megjegyzés: A fizikai, kémiai tulajdonságaik miatt nehezen vizsgálható anyagok vizsgálatának útmutatóját a 4. szakasz tartalmazza.

1.5. REFERENCIAANYAGOK

Az EC_{50} vizsgálata referenciaanyagra is elvégezhető a vizsgálati körülmények megbízhatóságának biztosítására. Erre a célra a nemzetközi körvizsgálatokban (1) (5) használt mérgező anyagok javasoltak ([1]). A referenciaanyagos vizsgálato(ka)t lehetőleg havonta, és évente legalább kétszer kell elvégezni.

([1]) E laboratóriumközi vizsgálatok eredményei és az ISO 6341 technikai kiigazítása szerint a kálium-dikromát ($K_2Cr_2O_7$) 24 órás EC_{50} értéke a 0,6 mg/l–1,7 mg/l tartományban található.

▼B

1.6. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük:

— A kontrollokban, beleértve az szolubilizálószert tartalmazó kontrollt, a Daphniák immobilizálási aránya nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— A vizsgálat végéig az oldott oxigén koncentrációja legyen ≥ 3 mg/l a kontrollban és a vizsgálati tartályokban.

Megjegyzés: Az első kritérium esetében a kontroll-Daphniák legfeljebb 10 %-a lehet mozgásképtelen, illetve mutathatja kór vagy stressz más jeleit, például elszíntelenedést, szokatlan viselkedést, mint például a víz felszínére szorulást.

1.7. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. **Berendezés**

A vizsgálati tartályoknak és más, a vizsgált oldatokkal érintkezésbe kerülő berendezések teljes mértékben üvegből vagy más, kémiailag inert anyagból kell készülniük. A vizsgálati tartályok rendszerint üveg kémcsövek vagy főzőpoharak; ezeket minden egyes használatot megelőzően szabványos laboratóriumi eljárással meg kell tisztítani. A vizsgálati tartályokat lazán le kell fedni, csökkentve a párolgásos vízvesztést, és megakadályozva a por oldatokba való kerülését. Az illékony anyagokat olyan, teljesen megtöltött zárt tartályokban kell vizsgálni, amelyek elegendően nagyok az oxigénhiány vagy a túl alacsony oxigénszint megakadályozásához (lásd az 1.6. szakaszt és az 1.8.3. szakasz első bekezdését).

Emellett a következő berendezések vagy azok mindegyike alkalmazandó: oxigénmérő (mikroelektródával, vagy egyéb olyan berendezéssel, amely alkalmas az oldott oxigén mérésére kis térfogatú mintákban); pH-mérő; megfelelő készülék a hőmérséklet szabályozásához; a teljes szerves szénkoncentráció (TOC) meghatározására szolgáló berendezés; a kémiai oxigénigény (KOI) meghatározására szolgáló berendezés; vízkeménység meghatározására szolgáló berendezés, stb.

1.7.2. **Vizsgált szervezetek**

A vizsgálat során a *Daphnia magna* Straus kísérleti állatfajt kell előnyben részesíteni, jóllehet más megfelelő Daphnia-fajok is (pl. *Daphnia pulex)* használhatóak. A vizsgálat kezdetén az állatoknak 24 óránál fiatalabbnak kell lenniük, és a variációs képesség csökkentése érdekében erősen javasolt, hogy ne az első szaporulatból származzanak. Egészséges törzstenyészetből kell származniuk (azaz nem szabad stressz jeleit mutatniuk, ilyen például magas halálozás, hímek és ephippiumok jelenléte, az első szaporulat késedelme, színtelen állatok, stb.). Egy adott vizsgálathoz felhasznált összes szervezet származzon ugyanabból a Daphnia-állományból létrehozott tenyészetből. Az állomány állatait olyan tenyésztési körülmények között kell tartani (fény, hőmérséklet, közeg), mint amelyeket a vizsgálatban használnak. Amennyiben a Daphniák vizsgálatban alkalmazandó tenyésztési közege különbözik a rutin Daphnia-tenyészetben használttól, a helyes gyakorlat az, ha a vizsgálat előtt akklimatizációs időszakot iktatnak be. Erre a célra a tenyésztett Daphniákat a vizsgálat kezdetét megelőzően legalább 48 órán keresztül vizsgálati hőmérsékletű hígítóvízben kell tartani.

▼B

1.7.3. **Tenyésztővíz és hígítóvíz**

Tenyésztő- és hígítóvízként természetes víz (felszíni vagy talajvíz), művíz vagy klórtalanított csapvíz fogadható el, amennyiben a Daphniák a tenyésztés, akklimatizálódás és vizsgálat időtartama alatt abban életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. Bármely olyan víz, amely megfelel az elfogadható hígítóvíz 1. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságainak, megfelel vizsgálati víznek. A vizsgálat időtartama alatt a víz minősége legyen állandó. Művíz készíthető analitikai tisztaságú reagensek meghatározott mennyiségének deionizált vagy desztillált vízhez történő hozzáadásával. Művíz példáit az (1) és (6) pont, illetve a 2. függelék adja meg. Meg kell jegyezni, hogy fémtartalmú vizsgált anyag esetében kerülendőek az ismert kelátképző anyagok, mint a 2. függelékben említett M4 és M7 közegek. A pH-érték legyen 6–9 közötti tartományban. A *Daphnia Magna* esetében 140 és 250 mg/l ($CaCO_3$-ban) közti keménység ajánlott, míg más *Daphnia-fajok* esetében alacsonyabb keménység is megfelelő lehet. A hígítóvizet a vizsgálatra történő felhasználás előtt levegőztetni lehet, hogy az oxigénkoncentráció elérje a telítettséget.

Természetes víz használatakor a minőségi paramétereket évente legalább kétszer mérni kell, illetve bármikor, ha felmerül annak a gyanúja, hogy ezek a tulajdonságok jelentős mértékben megváltozhattak (lásd az előző bekezdést és az 1. függeléket). Nehézfém-méréseket (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) is végezni kell. Klórmentesített csapvíz használata esetén kívánatos a napi klórelemzés. Amennyiben a hígítóvíz felszíni vagy talajvízforrásból származik, mérni kell a vezetőképességet, az összes szerves széntartalmat (TOC) vagy a kémiai oxigénigényt (KOI).

1.7.4. **Vizsgálati oldatok**

A kiválasztott koncentrációjú vizsgálati oldatokat rendszerint törzsoldat hígításával készítik. A törzsoldatokat lehetőleg a vizsgálati anyagnak a hígítóvízben történő feloldásával kell elkészíteni. Az oldószerek, emulgeálószerek vagy diszpergálószerek használatát lehetőleg kerülni kell. Ugyanakkor bizonyos esetekben szükség lehet ezekre a szerekre a megfelelő koncentrációjú törzsoldat készítéséhez. A megfelelő oldószerek, emulgeálószerek és diszpergálószerek példáit a (4) pont sorolja fel. A vizsgálati oldatban lévő vizsgálati anyag mindenestre nem haladhatja meg a hígítóvízben való oldhatóság határértékét.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell végezni. Ha a pH-érték nem marad a 6–9 értékek tartományában, újabb vizsgálat végezhető, amelynél a törzsoldat pH-értékét a hígítóvíz pH-értékére kell beállítani a vizsgálati anyag hozzáadása előtt. A pH-beállítást úgy kell elvégezni, hogy a törzsoldat-koncentrációja ne változzon jelentős mértékben, és a vizsgálati anyag ne lépjen kémiai reakcióba más anyaggal, vagy ne csapódjon ki. Erre a célra a HCl vagy az NaOH javasolt.

▼B

1.8. ELJÁRÁS

1.8.1. **Expozíciós körülmények**

1.8.1.1. *Vizsgálati csoportok és kontrollok*

A vizsgálati tartályokat megfelelő mennyiségű hígítóvízzel és a vizsgálati anyag oldataival kell feltölteni. A tartályokban a levegő/víz aránya legyen azonos a vizsgálati és a kontrollcsoport esetében. Ezután a Daphniákat bele kell helyezni a vizsgálati tartályokba. Minden egyes vizsgálati koncentrációban és a kontrollokban legalább 20 állatot kell használni – lehetőleg négy, egyenként öt állatot tartalmazó csoportra osztva. Állatonként legalább 2 ml vizsgálati oldatot kell biztosítani (azaz vizsgálati tartályonként 10 ml mennyiséget öt Daphniára). A vizsgálat elvégezhető félstatikus vagy átfolyásos rendszerben is, ahol a vizsgált anyag koncentrációja nem állandó.

A kezelt sorozatok mellett egy hígítóvizes kontrollcsoport-sorozatot és – adott esetben – egy, az oldószert tartalmazó kontrollcsoport-sorozatot kell beállítani.

1.8.1.2. *Vizsgálati koncentrációk*

A végleges vizsgálat koncentrációtartományának meghatározására behatároló vizsgálat végezhető, hacsak rendelkezésre nem állnak a vizsgálati anyag toxicitásra vonatkozó információk. E célból a Daphniákat a vizsgálati anyag szélesen változó koncentrációinak teszik ki. Minden egyes vizsgálati koncentrációnak öt Daphniát kell kitenni, 48 óráig vagy rövidebb ideig, és párhuzamosokra nincs szükség. Az expozíciós idő csökkenthető (pl. 24 óra vagy kevesebb), ha a behatároló vizsgálat céljainak megfelelő adatok rövidebb idő alatt megszerezhetők.

Legalább öt vizsgálati koncentrációt használjunk. Ezeket szétválasztási tényezővel mértani sorba kell beállítani, lehetőség szerint nem meghaladva a 2,2 értéket. Ötnél kevesebb koncentráció alkalmazása esetén indoklás szükséges. A legmagasabb vizsgált koncentráció eredményezzen lehetőleg 100 százalékos immobilizációt, a legalacsonyabb vizsgált koncentráció pedig lehetőleg ne okozzon megfigyelhető hatást.

1.8.1.3. *Inkubációs körülmények*

A hőmérséklet legyen 18 °C és 22 °C közötti tartományban, és minden egyes vizsgálatnál ± 1 °C eltéréssel legyen állandó. 16 órás világos, és 8 órás sötét ciklus javasolt. A teljes sötétség is elfogadható, főleg fényben instabil vizsgálati anyagok esetében.

A vizsgálati tartályokat a vizsgálat alatt nem szabad levegőztetni. A vizsgálatot a pH-érték módosítása nélkül kell végezni. A Daphniákat a vizsgálat alatt nem szabad etetni.

1.8.1.4. *Időtartam*

A vizsgálat időtartama 48 óra.

1.8.2. **Megfigyelések**

24 és 48 órával a vizsgálat megkezdését követően minden vizsgálati tartályban ellenőrizni kell a mozgásképtelen Daphniákat (lásd az 1.2. szakaszt a meghatározásokról). A mozgásképtelenség mellett minden rendellenes viselkedésről vagy jelenségről be kell számolni.

▼B

1.8.3. **Analitikai mérések**

A vizsgálat kezdetekor és a végén a kontroll(ok)ban és a vizsgálati anyag legnagyobb koncentrációjában mérni kell az oldott oxigén koncentrációját és a pH-értéket. A kontrollokban az oldott oxigén koncentrációja feleljen meg az érvényességi kritériumnak (lásd az 1.6. szakaszt). A pH-értéknek rendes körülmények között egyik vizsgálatban sem szabad 1,5 egységet meghaladó mértékben változnia. A hőmérsékletet rendszerint kontrolltartályokban vagy környezeti levegőben mérik, és a vizsgálat során lehetőleg folyamatosan rögzíteni kell, de legalább a vizsgálat kezdetekor és végén.

A vizsgálati anyag koncentrációját legalább a legnagyobb és legkisebb vizsgálati koncentrációnál kell mérni a vizsgálat kezdetekor és végén (4). Javasolt, hogy az eredmények a mért koncentrációkon alapuljanak. Ugyanakkor, ha megfelelő bizonyíték áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a vizsgált anyag koncentrációját a vizsgálat során sikerült mindvégig a névleges vagy kiindulási koncentráció ± 20 %-os sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért kiindulási értékekre is lehet alapozni.

1.9. HATÁRÉRTÉK-VIZSGÁLAT

Az e módszerben leírt eljárások segítségével 100 mg/l vizsgálati anyaggal vagy a vizsgálati közegben való oldhatósági határig (amelyik alacsonyabb) határérték-vizsgálat hajtható végre annak bizonyítására, hogy az EC_{50} nagyobb, mint e koncentráció. A határérték-vizsgálatot 20 Daphnia használatával (lehetőleg négy darab ötös csoportra osztva) kell végrehajtani úgy, hogy a kontrollcsoportban lévő állatok száma ezzel azonos legyen. Ha mozgásképtelenség következik be, a teljes vizsgálatot el kell végezni. Minden megfigyelt rendellenes viselkedést rögzíteni kell.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, minden egyes kezelési csoport és kontroll esetében feltüntetve a felhasznált Daphniák számát, és minden megfigyelt mozgásképtelenséget. A 24 órás és 48 órás immobilizált százalékokat a vizsgálati koncentrációk függvényében kell feltüntetni egy grafikonon. A görbék meredekségének és az EC_{50} 95 %-os konfidenciaszinten ($p = 0,05$) történő kiszámításához az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel elemezzük (pl. probit-elemzés, stb.) (7) (8).

Ahol az EC_{50}-számítás standard módszerei nem alkalmazhatóak a kapott adatokra, az immobilitást nem okozó legmagasabb koncentrációt és a 100 % immobilizációt eredményező legkisebb koncentrációt kell használni az EC_{50} becsléséhez (amely a két koncentráció mértani közepének számít).

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálati anyag:

— fizikai jellege és fontos fizikai-kémiai tulajdonságai,

▼B

— kémiai azonosítási adatok, beleértve a tisztaságot.

Vizsgált fajok:

— Daphniák faja és eredetük, szállító (ha ismert) és az alkalmazott tenyésztési körülmények (beleértve a forrást, táplálék fajtáját és mennyiségét, az etetés gyakoriságát).

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati tartályok leírása: a tartály típusa, az oldat térfogata, a Daphniák száma vizsgálati tartályonként, a vizsgálati tartályok száma (ismétlések) koncentrációnként,

— a törzsoldat és a vizsgált oldat elkészítésének módszere, beleértve bármilyen oldószer vagy diszpergálószer használatát, az alkalmazott koncentrációkat,

— a hígítóvíz adatai: forrás és vízminőségi jellemzők (pH-érték, keménység, Ca/Mg-arány, Na/K-arány, lúgosság, vezetőképesség, stb.); a művíz összetétele, amennyiben alkalmazták,

— inkubációs körülmények: hőmérséklet, fényintenzitás és periodicitás, oldott oxigén, pH-érték, stb.

Eredmények:

— az immobilizált vagy más káros behatást mutató (beleértve a rendellenes viselkedést) Daphniák száma és százaléka a kontrollokban és az egyes kezelt csoportokban, minden egyes megfigyelési időpontban, és a megfigyelt hatások jellegének leírása,

— ha rendelkezésre áll, a referenciaanyaggal végzett vizsgálat eredményei és dátuma,

— a névleges vizsgálati koncentrációk és a vizsgálati tartályokban lévő vizsgálati anyagok koncentrációinak meghatározására végzett valamennyi analízis eredménye; a módszer visszanyerési hatékonyságáról és a meghatározás korlátjáról is beszámolva,

— vizsgálat során végzett összes hőmérsékletre, pH-értékre és oldott oxigénre vonatkozó fizikai-kémiai mérés,

— immobilizációs EC_{50} 48 óránál, konfidenciaintervallumokkal, és a számításaikhoz használt illesztett modellek grafikonjai, a dózis-reakció-görbék meredeksége, és standard hibája; az EC_{50} meghatározásához használt statisztikai eljárások; (ha mérték, ezeket az adatokat a 24 órás immobilizálásra is meg kell adni)

— a vizsgálati módszertől való bármilyen eltérés magyarázata, illetve annak magyarázata, hogy az eltérés befolyásolta-e a vizsgálati eredményeket.

4. HIVATKOZÁSOK

(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/11. 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. p. 65–84.

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

1. függelék

AZ ELFOGADHATÓ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyagok	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	<1 µg/l
Maradék klór	<10 µg/1
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	<50 µg/1
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	<50 ng/1
Összes szerves klór	<25 ng/1

▼B

2. függelék

MEGFELELŐ VIZSGÁLATI MŰVÍZRE VONATKOZÓ PÉLDÁK

ISO vizsgálati víz (1)

Törzsoldatok (egyetlen anyag)		A művíz elkészítéséhez 1 liter vízhez a következő mennyiségű törzsoldatot kell adni
Anyagok	1 liter vízhez adott mennyiség (*)	
Kalcium-klorid $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Magnézium-szulfát $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Nátrium-bikarbonát $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Kálium-klorid KCl	0,23 g	25 ml

(*) Megfelelő tisztaságú víz, pl. deionizált, desztillált vagy fordított ozmózissal előállított víz, amelynek vezetőképessége lehetőleg nem haladja meg a 10 μS cm^{-1}-t.

Elendt M7 és M4 közeg

Akklimatizálás az Elendt M4 és M7 közeghez

Egyes laboratóriumok nehézségekbe ütköztek, amikor Daphniákat M4 és M7 közegbe próbáltak átvinni. Fokozatos akklimatizálással, azaz a saját közegből előbb 30, majd 60, végül 100 százalékos Elendt-közegbe való áthelyezéssel azonban sikerült némi sikert elérni. Az akklimatizálódás akár egy hónapig is eltarthat.

Előkészítés

Nyomelem

Először megfelelő tisztaságú (azaz deionizált, desztillált vagy reverz ozmózissal előállított) víz felhasználásával egyedi nyomelemeket tartalmazó, különféle törzsoldatokat (I) kell készíteni. Ezekből a különböző törzsoldatokból (I) egy második, egyetlen (II) törzsoldat készül, amely az összes nyomelemet tartalmazza (kombinált oldat), azaz:

I. törzsoldat(ok) (egyes anyagokból)	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatv a)	A II. kombinált törzsoldat elkészítéséhez az I. törzsoldatból az alábbi mennyiséget kell vízhez hozzáadni (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-szeres	1,0	0,25
$MnCl_2.4H_2O$	7 210	20 000-szeres	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-szeres	1,0	0,25

▼B

I. törzsoldat(ok) (egyes anyagokból)	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatv a)	A II. kombinált törzsoldat elkészítéséhez az I. törzsoldatból az alábbi mennyiséget kell vízhez hozzáadni (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-szeres	1,0	0,25
$SrCl_2.6H_2O$	3 040	20 000-szeres	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-szeres	1,0	0,25
$Na_2\ MoO_4.2H_2O$	1 230	20 000-szeres	1,0	0,25
$CuCl_2.2H_2O$	335	20 000-szeres	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-szeres	1,0	1,0
$CoCl_2.6H_2O$	200	20 000-szeres	1,0	1,0
KI	65	20 000-szeres	1,0	1,0
$Na_2\ SeO_3$	43,8	20 000-szeres	1,0	1,0
$NH_4\ VO_3$	11,5	20 000-szeres	1,0	1,0
Na_2 EDTA.$2H_2O$	5 000	2 000-szeres	—	—
$FeSO_4.7H_2O$	1 991	2 000-szeres	—	—

Mind a Na_2EDTA, mind a $FeSO_4$-oldatot külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.

Ebből:

2 l Fe-EDTA oldat		1 000-szeres	20,0	5,0

M4 és M7 közeg

Az M4 és M7 közegeket a II. törzsoldatból, a makroelemekből és a vitaminokból kell elkészíteni a következőképpen:

	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatva)	A közeg készítésekor hozzáadott II. törzsoldat mennyisége (ml/l)	
			M4	M7
II. törzsoldat (kombinált nyomelemek)		20-szoros	50	50
Makroelemek törzsoldatai (egy anyagból)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-szeres	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-szeres	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-szeres	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-szeres	1,0	1,0
$Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-szeres	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-szeres	0,1	0,1
$KH_2\ PO_4$	1 430	10 000-szeres	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-szeres	0,1	0,1

▼B

	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 közegre vonatkoztatva)	A közeg készítésekor hozzáadott II. törzsoldat mennyisége (ml/l)	
			M4	M7
Kombinált vitamintörzsoldat	—	10 000-szeres	0,1	0,1
A kombinált vitamintörzsoldat készítéséhez 3 vitamint kell 1 liter vízhez adni, a következőképpen:				
Tiamin-hidroklorid	750	10 000-szeres		
Ciano-kobalamine (B_{12})	10	10 000-szeres		
Biotin	7,5	10 000-szeres		

A kombinált vitamintörzsoldatot kis aliquot részletekben, fagyasztott állapotban kell tartani. A közeghez a vitaminokat röviddel a felhasználás előtt kell hozzáadni.

Megjegyzés: A végleges közeg elkészítésekor a sók kicsapódásának elkerülése érdekében az aliquot törzsoldatokat kb. 500–800 ml deionizált vízhez kell adni, majd a mennyiséget fel kell tölteni 1 literre.

Megjegyzés: Az M4 tényészoldatról szóló első publikáció az Elendt, B.P. (1990)-ben található. Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154., pp. 25–33.

▼M1

C.3. **SZAPORODÁSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT, ÉDESVÍZI ALGA ÉS CIANOBAKTÉRIUM**

1. **MÓDSZER**

A módszer egyenértékű az OECD TG 201 (2006) (1) jelű módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

A tudományos haladás fényében a vizsgálati módszerek időről időre felülvizsgálatra és korszerűsítésre kerülnek. Szükség volt a C.3 jelű vizsgálati módszer átdolgozására, hogy kiterjedjen további fajokra is, és hogy megfelelhessen a vegyületekkel szemben támasztott kockázatértékelési és besorolási követelményeknek. A módszer átdolgozása a kiterjedt gyakorlati tapasztalatok, az algákra ható toxicitás vizsgálatának területén végbement tudományos fejlődés és a módszer eredeti elfogadása óta folyamatban lévő széles körű hatósági alkalmazás tapasztalatai alapján történt.

1.2. DEFINÍCIÓK

E vizsgálati módszerben az alábbi definíciók és rövidítések használatosak:

„**Élőanyag**”: egy populációban jelen lévő élő anyag száraz tömege egy adott mennyiségben kifejezve; pl. mg alga/liter vizsgálati oldat. Általában az „élőanyag” tömegként van definiálva, de ebben a vizsgálatban a szó „tömeg/térfogat”-ot jelent. Szintén ebben a vizsgálatban az élőanyag tömege helyett jellemzően sejtszám, fluoreszcencia stb. mérése történik, és az „élőanyag” kifejezés használata így ezekre a helyettesítő mérőszámokra is utal.

„**Variációs együttható (CV)**”: egy paraméter változékonyságának dimenzió nélküli mérőszáma; definíció szerint a szórás és az átlag aránya. Ezt százalékos formában is ki lehet fejezni. A párhuzamos kontrolltenyészetekben az átlagos fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatóját az alábbiak szerint lehet kiszámítani:

1. Ki kell számítani az átlagos fajlagos szaporodási sebesség %-os variációs együtthatóját a naponkénti/szakaszonkénti szaporodási sebességekből a megfelelő párhuzamos tenyészetekre.

2. Ki kell számítani az 1. pontban kiszámított összes érték átlagát, ami megadja a párhuzamos kontrolltenyészetekben a naponkénti/szakaszonkénti átlagos fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatóját.

„**EC_x**”: a vizsgálati oldatban oldott vizsgált anyag olyan koncentrációja, ami meghatározott expozíciós idő alatt (ha eltér a teljes vagy szokásos kísérleti időtartamtól, akkor pontosan meg kell adni) a vizsgált organizmus x %-os (pl. 50 %) szaporodásgátlását eredményezi. A szaporodási sebességből (r), illetve a szaporulatból (y) levezetett EC-értékek egyértelmű jelölésére az „E_rC”, illetve az „E_yC” használatos.

„**Tápoldat**”: az a teljes mesterséges tenyésztő közeg, amelyben a vizsgált algák a vizsgált anyag jelenlétében szaporodnak. A vizsgált anyag feloldása általában a kísérleti oldattal történik.

„**Szaporodási sebesség (átlagos fajlagos szaporodási sebesség)**”: az élőanyag expozíciós idő alatti növekedésének logaritmusa.

▼M1

„**Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC)**”: az a legkisebb mért koncentráció, amelyben az anyagnak a kontrolltenyészethez képest észlelhető, statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) szaporodásgátló hatása van egy adott expozíciós idő alatt. Ugyanakkor minden, az LOEC-nél nagyobb koncentrációnak az LOEC-nél kapottal azonos, vagy nagyobb gátló hatást kell kifejtenie. Ha ez a két feltétel nem teljesül, az LOEC (és ennélfogva az NOEC) megválasztását teljes körűen meg kell indokolni.

„**Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC)**”: közvetlenül az LOEC alatti koncentráció.

„**Hatásváltozó**”: a toxikus hatás becslésére használt változó, amely különböző számítási módokkal az élőanyag leírására szolgáló bármelyik mért paraméterből levezethető. Ebben a módszerben a hatásváltozók a szaporodási sebesség, illetve a szaporulat, amelyek közvetlenül az élőanyag mérésével, vagy pedig az említett helyettesítő mérőszámok valamelyikének mérésével kaphatók meg.

„**Fajlagos szaporodási sebesség**”: egy mérési paraméter (ebben a vizsgálati módszerben az élőanyag mennyiségének változása) természetes alapú logaritmusainak különbségéből és a változáshoz tartozó időtartamból képzett hányadosként definiált hatásváltozó.

„**Szaporulat**”: az élőanyag vizsgálat alatti mennyiségi növekedésének a kifejezésére használt mérési változó értéke; az expozíciós idő végén mért változóérték mínusz az expozíciós idő kezdetén mért változóérték.

1.3. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

Ez a vizsgálati módszer legegyszerűbben olyan vízoldható anyagokra használható, amelyek a vizsgálati körülmények között valószínűleg a vízben maradnak. Az illékony, erősen adszorbeálódó, színes, vízben rosszul oldódó, esetleg a tápoldatban lévő tápanyagok vagy ásványi anyagok felvételére hatással lévő anyagok esetében szükség lehet a leírt módszer bizonyos módosítására (pl. zárt rendszer, a vizsgálathoz használt eszközök kondicionálása). Néhány megfelelő módosításhoz útmutatás található az irodalomban (2), (3) és (4).

1.4. A VIZSGÁLAT ELVE

A vizsgálat célja egy adott anyag által az édesvízi mikroalgákra és/vagy cianobaktériumokra gyakorolt hatások meghatározása. A vizsgált anyag exponenciálisan szaporodó organizmusokra hat egyszeres (batch) tenyészetekben, szokásosan 72 órán keresztül. A viszonylag rövid vizsgálati időtartam ellenére több generációra kiterjedő hatások vizsgálhatók.

A rendszerben fellépő hatás az, hogy csökken a szaporodás a vizsgált anyag különböző koncentrációinak kitett algatenyészetekben (kísérleti egységek). A hatás értékelése a koncentráció függvényében történik, összehasonlítva a szaporodást a párhuzamos, nem kezelt kontrolltenyészetekben észlelt szaporodással. A rendszerben a toxikus hatások teljes kifejlődéséhez (optimális érzékenység) a tenyészetek számára korlátlan exponenciális szaporodást kell biztosítani – megfelelő tápkörülmények és folyamatos világítás mellett – elegendően hosszú ideig ahhoz, hogy mérni lehessen a fajlagos szaporodási sebesség csökkenését.

▼M1

A szaporodás és szaporodásgátlás mennyiségi meghatározásához mérni kell az alga élőanyag-tömegét az idő függvényében. Az élőanyag mennyisége definíció szerint száraz tömeg/térfogat, pl. mg alga/liter tápoldat. A száraz tömeg mérése azonban bonyolult, ezért helyettesítő paraméterek használatosak. Ezek közül a sejtszám a leggyakrabban használt paraméter. További helyettesítő paraméterek lehetnek a sejttérfogat, a fluoreszcencia, az optikai sűrűség stb. A mért helyettesítő paraméterek és az élőanyag-tömeg közötti átszámítási tényezőt ismerni kell.

A kísérlet végpontja a szaporodás gátlása, az élőanyag-tömeg expozíciós idő alatti növekedésének logaritmikusaként kifejezve (átlagos fajlagos szaporodási sebesség). A kísérleti oldatsorozattal mért átlagos fajlagos szaporodási sebességekből meg kell határozni azt a koncentrációt, amely a szaporodási sebességet adott x %-os (pl. 50 %-os) mértékben gátolja, és azt E_rC_x-ként (pl. E_rC_{50}) kell kifejezni.

E módszernek az EU szabályozási keretén belül történő alkalmazásához az eredményeket a 2.2 pontban leírt okokból kifolyólag az átlagos fajlagos szaporodási sebesség alapján kell kiszámítani. Ebben a vizsgálati módszerben használt másik hatásváltozó a szaporulat, amely szükséges lehet néhány országban az adott hatósági előírások teljesítéséhez. A szaporulat definíció szerint az expozíciós idő végén és az expozíciós idő kezdetén meglévő élőanyag tömegének különbsége. A kísérleti oldatsorozatban mért szaporulatból meghatározásra kerül az a koncentráció, amely a szaporulatot adott x %-os (pl. 50 %-os) mértékben gátolja, és azt E_yC_x-ként (pl. E_yC_{50}) kell kifejezni.

Emellett statisztikai módszerekkel meghatározható az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC) és az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC).

1.5. INFORMÁCIÓK A VIZSGÁLT ANYAGRÓL

A kísérleti körülmények kialakításához hasznosak lehetnek egyes információk a vizsgált anyagról, mint pl. szerkezeti képlet, tisztaság, fényérzékenység, stabilitás a kísérleti körülmények között, fényabszorpciós tulajdonságok, pK_a és az átalakulási vizsgálatok eredményei, beleértve a biológiai lebonthatóságot vízben.

A vízben való oldhatóságot, az oktanol/víz megoszlási hányadost (P_{ow}) és a vizsgált anyag gőznyomását ismerni kell, valamint rendelkezésre kell állnia egy, a kísérleti oldatban jelen lévő anyag mennyiségi meghatározására alkalmas validált módszernek, dokumentált visszanyerési hatásfokkal és kimutatási határral.

1.6. REFERENCIAANYAG

A vizsgálati eljárás ellenőrzéseként a kísérlet elvégezhető referenciaanyaggal (referenciaanyagokkal), például a nemzetközi körvizsgálatban (4) használt 3,5-diklór-fenollal. A kálium-bikromát szintén használható referenciaanyagként, zöldalgák esetében. Tanácsos legalább kétszer egy évben kísérletet végezni a referenciaanyaggal.

1.7. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez a következő kritériumoknak kell teljesülniük:

▼M1

— A kontrolltenyészetekben a élőanyag mennyiségének exponenciálisan kell növekednie, legalább 16-szorosára a 72-órás kísérleti idő alatt. Ez 0,92 nap^{-1}-es fajlagos szaporodási sebességnek felel meg. A leggyakrabban használt fajoknál a szaporodási sebesség rendszerint jelentősen nagyobb ennél (lásd 1. függelék). Ez a kritérium az 1. függelékben felsoroltaknál lassabban szaporodó fajok alkalmazása esetében nem feltétlenül teljesül. Ebben az esetben a kísérleti időt meg kell hosszabbítani, hogy legalább 16-szoros szaporodást kapjunk a kontrolltenyészetekben úgy, hogy a szaporodás mindvégig exponenciális marad a kísérlet ideje alatt. A kísérlet ideje lerövidíthető (de legalább 48 órának kell lennie), hogy a korlátlan exponenciális szaporodás a kísérlet alatt végig fennálljon, feltéve hogy megmarad a legalább 16-szoros szaporodás.

— A szakaszonkénti (0–1., 1–2. és 2–3. nap a 72 órás kísérletnél) fajlagos szaporodási sebesség átlagos variációs együtthatója a kontrolltenyészeteknél (lásd 1.2. pont, „variációs együttható”) nem haladhatja meg a 35 %-ot. A szakaszonkénti fajlagos szaporodási sebesség kiszámítására vonatkozóan lásd a 2.2.1. pont második bekezdését. Ez a kritérium a párhuzamos kontrolltenyészetekre számított variációs együttható átlagértékére vonatkozik.

— Az átlagos fajlagos szaporodási sebesség variációs együtthatója a kísérleti idő alatt a párhuzamos kontrolltenyészetekben semmikor sem haladhatja meg a 7 %-ot a *Pseudokirchneriella subcapitata* fajjal és *Desmodesmus subspicatus* fajjal folytatott vizsgálatokban. A többi, kevésbé gyakran vizsgált faj esetében ez az érték nem lehet nagyobb 10 %-nál.

1.8. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.8.1. **Felszerelés**

A tápoldatokkal érintkezésbe kerülő kísérleti eszközöknek és más felszereléseknek teljes egészében üvegből, vagy kémiailag semleges más anyagból kell készülniük. Alaposan át kell mosni őket, biztosítandó, hogy szerves vagy szervetlen szennyezések ne befolyásolhassák az algák szaporodását, vagy a tápoldat összetételét.

A kísérleti eszközök általában olyan méretű üveglombikok, amelyek a vizsgálat során végzett mérésekhez megfelelő térfogatú tenyészetet képesek befogadni, és biztosítják a kívánt mértékű CO_2-átadást a környezeti levegőből (lásd az 1.8.9. pont második bekezdését). Figyelni kell arra, hogy a folyadéktérfogat elegendő legyen az analitikai meghatározások elvégzéséhez (lásd az 1.8.11. pont ötödik bekezdését).

Ezentúl szükséges néhány, vagy az összes az alábbi eszközök közül:

— Tenyésztőberendezés: tenyésztőszekrény vagy -fülke ajánlott, amelyekben a választott inkubációs hőmérsékletet ± 2 °C pontossággal tartható.

— Fénymérő berendezés: fontos megjegyezni, hogy a fényerő mérési módszere, és főleg az érzékelő (kollektor) típusa hatással lesz a mért értékre. A mérésekhez gömb alakú (4 π) érzékelő (amely a mérési sík alatti és feletti bármely szögből érkező közvetlen és visszavert fényre reagál), vagy félgömb alakú (2 π) érzékelő (amely a mérési sík feletti bármely szögből érkező fényre reagál) használata preferált.

▼M1

— Az alga élőanyag-tömegének meghatározására alkalmas berendezés: az ilyen élőanyag mérésére a leggyakrabban használt helyettesítő módszer, a sejtszámlálás elvégezhető elektronikus részecskeszámláló, Bürker-kamrával ellátott mikroszkóp, vagy áramlásos citométer segítségével. Más helyettesítő paraméterek mérhetők áramlásos citométerrel, fluoriméterrel, spektrofotométerrel vagy kolorimméterrel. Célszerű kiszámítani a sejtszám és a száraz tömeg közötti átszámítási tényezőt. Spektrofotométer használata esetén szükséges lehet legalább 4 cm fényúttal rendelkező küvetták használatára, hogy a módszer kis élőanyag-koncentrációknál is használható méréseket szolgáltasson.

1.8.2. **Vizsgált organizmusok**

A nem kitapadó mikroalgák és cianobaktériumok több faja használható. Az 1. függelékben felsorolt törzsekről már bizonyították, hogy megfelelően használhatók ennek a vizsgálati módszernek az eljárásai során.

Más faj használata esetén a törzset és/vagy az eredetet dokumentálni kell. Igazolni kell, hogy a vizsgálathoz kiválasztott alga exponenciális szaporodása a kísérlet ideje alatt mindvégig fennmarad az adott körülmények között.

1.8.3. **Tápoldat**

Két választható tápoldat, az OECD-tápoldat és az AAP-tápoldat ajánlott. Ezeknek a tápoldatoknak az összetétele a 2. függelékben látható. Figyelembe kell venni, hogy a két tápoldat kiindulási pH-értéke és pufferkapacitása (a pH-növekedés szabályozása) eltérő. Ennek megfelelően az alkalmazott tápoldattól függően a vizsgálati eredmények különbözőek lehetnek, kiváltképp disszociáló anyagok vizsgálata során.

Bizonyos célokhoz (pl. fémek és kelátképző szerek vizsgálatakor, vagy ha a kísérlet különböző pH-értékeken történik) a tápoldat módosítására lehet szükség. A módosított tápoldat használatát részletesen ismertetni és indokolni kell (3)(4).

1.8.4. **Kiindulási élőanyag-koncentráció**

A kiindulási élőanyagnak minden vizsgált tenyészetben ugyananynyinak és megfelelően kevésnek kell lennie, hogy exponenciálisan növekedhessen végig az expozíciós idő alatt, a tápanyagok elfogyásának veszélye nélkül. A kiindulási élőanyag mennyisége nem lépheti túl a 0,5 mg száraz tömeg/l értéket. Az alábbi kiindulási sejtkoncentrációk ajánlottak:

Pseudokirchneriella subcapitata:	$5 \cdot 10^3 - 10^4$	sejt/ml
Desmodesmus subspicatus	$2–5 \times 10^3$	sejt/ml
Navicula pelliculosa	10^4	sejt/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	sejt/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \cdot 10^4 - 10^5$	sejt/ml

1.8.5. **A vizsgált anyag -koncentrációi**

Az a koncentrációtartomány, amelyben a hatások valószínűleg fellépnek, koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatok eredményei alapján állapítható meg. A végleges meghatározó vizsgálathoz legalább öt, 3,2-nél nem nagyobb kvóciensű mértani sorozat szerinti koncentrációt kell kiválasztani. Olyan anyagok esetében, ahol a koncentráció-hatás görbe lapos, nagyobb kvóciens használata lehet indokolt. A koncentrációsorozatnak lehetőleg az algaszaporodási sebesség 5–75 %-os gátlását okozó tartományt kell lefednie.

▼M1

1.8.6. **Párhuzamos tenyészetek és kontrolltenyészetek**

A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy minden vizsgált koncentrációra három párhuzamos tenyészetet tartalmazzon. Ha az NOEC meghatározása nem követelmény, a vizsgálat ettől eltérő lehet úgy, hogy a koncentrációk száma nagyobb lesz, az egy koncentrációhoz tartozó párhuzamos tenyészetek száma pedig kisebb. A párhuzamos kontrolltenyészetek számának legalább háromnak kell lennie, és ideálisan kétszer annyinak, mint az egyes vizsgált koncentrációkhoz tartozó párhuzamos tenyészetek száma.

Külön oldatsorozatot lehet készíteni a vizsgált anyag koncentrációinak analitikai meghatározásához (lásd az 1.8.11. pont negyedik és hatodik bekezdését).

Ha a vizsgált anyag oldhatóvá tételéhez oldószert kell használni, akkor a vizsgálatnak további kontrolltenyészeteket is tartalmaznia kell, amelyekben az oldószernek ugyanabban a koncentrációban kell jelen lennie, mint a vizsgált tenyészetekben.

1.8.7. **Az oltótenyészet elkészítése**

A tápoldattal 2–4 nappal a kísérlet kezdete előtt oltótenyészetet kell készíteni, hogy a vizsgált algák hozzászokjanak a kísérleti körülményekhez, és hogy exponenciális szaporodási fázisban legyenek a kísérleti oldatok beoltásakor. Az alga élőanyag-mennyiségét úgy kell beállítani, hogy a kísérlet kezdetéig az exponenciális szaporodás érvényesüljön az oltótenyészetben. Az oltótenyészetet a kísérleti tenyészetekkel megegyező körülmények között kell inkubálni. Mérni kell az élőanyag mennyiségének növekedését az oltótenyészetben, ellenőrizendő, hogy a vizsgált törzsnek az adott tenyésztési körülmények közötti szaporodása a megfelelő tartományon belül marad-e. Az algatenyésztési eljárás egy példája a 3. függelékben található. Elkerülendő a kísérlet alatt az egyidejű sejtosztódást, szükség lehet esetleg az oltótenyészet egy második szaporítási lépésére is.

1.8.8. **A kísérleti oldatok elkészítése**

Minden kísérleti oldatnak azonos koncentrációban kell tartalmaznia a tápoldatot és a vizsgált algák kiindulási élőanyag-tömegét. A kiválasztott koncentrációjú kísérleti oldatokat rendszerint a vizsgált anyag törzsoldatának, a tápoldatnak és az oltótenyészetnek az összekeverésével kell előállítani. A törzsoldatokat általában a vizsgált anyagnak a kísérleti oldattal való feloldásával kell elkészíteni.

Oldószerek (pl. aceton, tercier butilalkohol és dimetil-formamid) használhatók hordozóanyagként a vízben rosszul oldódó anyagoknak a kísérleti oldatba juttatásához (2)(3). Az oldószer-koncentráció nem haladhatja meg a 100 µl/l–t, és az oldószert a kísérletsorozatban használt minden tenyészethez (beleértve a kontrolltenyészeteket is) azonos koncentrációban hozzá kell adni.

1.8.9. **Inkubáció**

A kísérleti lombikokat légáteresztő dugóval kell lezárni. A lombikokat rázás után a tenyésztőberendezésbe kell helyezni. A kísérlet folyamán az algáknak lebegniük kell, és elő kell segíteni a CO_2-átadást. Ebből a célból folyamatos rázást vagy keverést kell alkalmazni. A tenyészeteket 21–24 °C tartományon belüli hőmérsékleten kell tartani, ± 2 °C-os pontossággal szabályozva. Az 1. függelékben nem szereplő fajok, pl. a trópusi fajok esetében nagyobb hőmérséklet lehet megfelelő, feltéve hogy az érvényességi kritériumok teljesülnek. Ajánlott a lombikok véletlenszerű elrendezése majd naponkénti áthelyezése az inkubátorban.

▼M1

A kísérlet során a kontrolloldatban a pH nem nőhet 1,5 egységnél többel. Fémek, és a kísérlet pH-ja körüli értéken részlegesen disszociáló vegyületek esetében szükséges lehet a pH-eltolódás korlátozása a reprodukálható és jól definiált eredmények érdekében. A 0,5 pH-egységnél kisebb eltolódás biztosítása technikailag kivitelezhető és a környezeti levegőből az oldatba történő CO_2-bevitel megfelelő sebességének biztosításával, például a rázás intenzitásának növelésével, elérhető. Másik lehetőség a CO_2-igény csökkentése a kiindulási élőanyag mennyiségének vagy a kísérlet idejének csökkentésével.

A felületnek, ahol a tenyészetek inkubálása történik, folytonos egyenletes fluoreszcens megvilágítást (pl. „hideg-fehér” vagy „nappali” fény) kell kapnia. Az alga- és cianobaktériumtörzsek fényigénye eltérő. A fényerőt úgy kell megválasztani, hogy az megfeleljen a vizsgált organizmusnak. A javasolt zöldalga-fajokra a kísérleti oldatok szintjén a fényerőt a 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ tartományból kell kiválasztani, a megfelelő érzékelővel a fotoszintetikusan hatékony, 400–700 nm-es hullámhossz-tartományban mérve. Néhány faj, főként az *Anabaena flos-aquae* jól növekszik kisebb fényerő mellett, és a nagyobb fényerő károsíthatja. Ezekre a fajokra a 40–60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ tartományba eső átlagos fényerőt kell választani. (A luxban kalibrált fénymérő berendezéseknél a hideg fehér fényre megadott 4 440–8 880 luxos tartomány felel meg az ajánlott 60–120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$-es fényerőnek). A fényerő az inkubációs területen ± 15 %-nál jobban nem térhet el az átlagtól.

1.8.10. **A kísérlet időtartama**

A kísérlet hossza szokásos esetben 72 óra. Használható azonban rövidebb vagy hosszabb kísérleti időtartam is, feltéve, hogy az 1.7. pontban előírt összes érvényességi kritérium teljesül.

1.8.11. **Mérések és analitikai meghatározások**

Az alga élőanyag-mennyiségét a kísérlet ideje alatt minden lombikban legalább naponta meg kell határozni. Ha a mérések a kísérleti oldatból pipettával vett kis térfogatú mintákkal történnek, ezeket a mintákat nem kell visszajuttatni a lombikba.

Az élőanyag mennyiségének mérése mikroszkópos manuális sejtszámlálással vagy elektronikus részecskeszámlálással (sejtszámlálás és/vagy élőanyag térfogata) történik. Alternatív eljárások, pl. áramlásos citometria, *in vitro* vagy *in vivo* klorofillfluoreszcencia (6)(7), vagy optikai sűrűség mérése is használható, feltéve, ha igazolni lehet az élőanyag-tömeggel fennálló kielégítő korrelációt az élőanyag-tömegnek a kísérletben előforduló tartományában.

Az oldatok pH-ját a kísérlet kezdetén és végén meg kell mérni.

Amennyiben az alkalmazott koncentrációtartományban a vizsgált anyag meghatározásához rendelkezésre áll analitikai módszer, akkor a kísérleti oldatokat elemezni kell a kiindulási koncentrációk ellenőrzése, illetve annak ellenőrzése céljából, hogy a kísérletben használandó koncentrációk mindvégig fennállnak-e a kísérlet során.

▼M1

Elegendő lehet a vizsgált anyag egy alsó és felső koncentráció-határértékének, valamint a várható EC_{50} érték körüli koncentrációjának a mérése a kísérlet kezdetén és végén, ha valószínű, hogy a kísérlet során a koncentráció kevesebb mint 20 %-kal tér el a névleges értéktől. Ha nem valószínű, hogy a koncentrációk a névleges érték 80–120 %-án belül maradnak, ajánlott az összes kísérleti koncentráció mérése a kísérlet kezdetén és végén. Illékony, instabil és erősen adszorbeálódó anyagoknál további mintavétel ajánlott 24 óránként végzendő elemzéshez a kísérlet folyamán mindvégig, hogy az anyagveszteség még jobban meghatározható legyen. Ilyen anyagoknál további párhuzamos tenyészetek szükségesek. A vizsgált anyag koncentrációjának meghatározását minden esetben elegendő csak egyetlen párhuzamos tenyészet lombikjából elvégezni az egyes kísérleti koncentrációkra (vagy a párhuzamos tenyészetek egyesítésével készített mintából).

A kifejezetten a vizsgálat folyamán előálló kísérleti koncentrációk méréséhez készített oldatokat a kísérlethez használtakkal megegyező módon kell kezelni, azaz ezeket is be kell oltatni algával és a kísérleti körülményekkel azonos körülmények között inkubálni kell. Ha az oldott anyag koncentrációját kell mérni, szükséges lehet az algák eltávolítása az oldatból. Az elválasztást lehetőleg az algák kiülepedéséhez elegendő, de kis fordulatszámú centrifugálással kell végezni.

Ha egyértelmű, hogy a vizsgált anyag koncentrációja kielégítő módon a névleges koncentráció vagy a mért kezdeti koncentráció ± 20 %-án belül marad a kísérlet során, akkor az eredmények értékelése alapulhat a névleges értéken vagy a mért kezdeti koncentráció értékén. Ha a névleges vagy a mért kezdeti koncentrációtól való eltérés nagyobb mint ± 20 %, akkor az eredmények értékelésének alapja a kísérlet alatti koncentrációk mértani átlaga, vagy a vizsgált anyag koncentrációjának csökkenését leíró modell (3)(8).

Az algaszaporodás gátlásának vizsgálata dinamikusabb vizsgálati rendszer, mint a legtöbb hasonló, a vízi toxicitást mérő rövid időtartamú vizsgálat. Ennek következtében a tényleges kísérleti koncentrációkat esetleg nehezen lehet meghatározni, főleg kis koncentrációk esetén, és ha a vizsgált anyag abszorbeálódik. Ilyen esetekben az, ha a vizsgált anyag a növekvő élőanyagban való adszorpciója miatti eltűnik az oldatból, nem jelenti azt, hogy eltávozott a vizsgált rendszerből. A kísérlet eredményeinek elemzése során ellenőrizni kell, hogy a vizsgált anyag koncentrációjának a vizsgálat során történő csökkenése együtt jár-e a szaporodásgátlás csökkenésével. Ha ez a helyzet áll fenn, mérlegelni lehet egy olyan megfelelő modell alkalmazását, amely leírja a vizsgált anyag koncentrációjának csökkenését (8). Ha ez nem áll fenn, akkor az eredmények elemzését megfelelő lehet a kiindulási (névleges vagy mért) koncentrációkra alapozni.

1.8.12. **További vizsgálatok**

Az oltótenyészet normális és egészséges fenotípusának ellenőrzésére, illetve a kísérlet végén az algák esetleges abnormális fenotípusának (ami lehet a vizsgált anyag hatása) megállapítására mikroszkópos vizsgálatokat célszerű végezni.

▼M1

1.8.13. **Határérték-vizsgálat**

Bizonyos körülmények között, például amikor egy előzetes vizsgálat azt jelzi, hogy a vizsgált anyagnak nincs toxikus hatása 100 $mg \cdot l^{-1}$ koncentrációig, vagy a kísérleti oldatban való oldhatósága határáig (amelyik a kettő közül kisebb), határérték-vizsgálat végezhető, amely egy kontrollcsoport és egy kezelt csoport (100 $mg \cdot l^{-1}$-es vagy az oldhatósági határral megegyező koncentrációval) szaporodási viselkedésének összehasonlítását jelenti. Határozottan ajánlott ezt a kísérletben használt koncentráció mérésével alátámasztani. A határérték-vizsgálatra érvényes az összes korábban leírt kísérleti körülmény és érvényességi kritérium, kivéve, hogy a kezelt párhuzamos tenyészetek számának legalább hatnak kell lennie. A kontroll- és a kezelt csoport hatásváltozóit az átlagok összevetésére használható statisztikai analízissel (pl. Student-féle t-próba) lehet elemezni. Ha a két csoport szórásnégyzetei nem egyenlőek, akkor egyenlőtlen szórásnégyzetekre korrigált t-próbát kell végezni.

1.8.14. **Elváltozás erősen színezett anyagok esetén**

A besugárzást (fényerő) az e vizsgálati módszerben meghatározott legfelsőbb tartományban, vagyis 120μE m^{-2} s^{-1} vagy e fölött kell elvégezni.

A fényutat a kísérleti oldatok mennyiségének a csökkentésével (5–25 ml tartományban) le kell rövidíteni.

Megfelelő keverési eljárással (például mérsékelt rázással) kell biztosítani, hogy a vizsgált algatenyészet felszíne gyakran legyen kitéve erős sugárzásnak.

2. **ADATOK**

2.1. A SZAPORODÁSI GÖRBÉK SZERKESZTÉSE

A kísérleti lombikokban lévő élőanyag mennyiségét ki lehet fejezni a mérésre használt helyettesítő paraméter (pl. sejtszám, fluoreszcencia) mértékegységében is.

Táblázatba kell foglalni a vizsgált tenyészetekben és a kontrolltenyészetekben a becsült élőanyag-koncentrációkat, a vizsgált anyag koncentrációival és a legalább egész órákra kerekített mérési időpontokkal együtt, és ezek alapján kell megszerkeszteni a szaporodási görbéket. Ebben az első szakaszban használható akár logaritmikus, akár lineáris skála, a logaritmikus skála azonban kötelező, és általában jobban megjeleníti a kísérleti időszak alatt a szaporodási viselkedésben bekövetkező eltéréseket. Megjegyzendő, hogy logaritmikus ábrázolás esetén az exponenciális szaporodás egyenes vonalat ad, és hogy a vonal meredeksége adja meg a fajlagos szaporodási sebességet.

A görbék segítségével meg kell vizsgálni, hogy a kontrolltenyészetek a vizsgálat során mindvégig exponenciálisan szaporodtak-e, a várt sebességgel. Kritikusan meg kell vizsgálni minden adatpontot és a görbék lefutását, valamint ellenőrizni kell az adatsorokat és eljárásokat a lehetséges hibák tekintetében. Főleg azokat az adatok igényelnek ellenőrzést, melyeknél az eltérés valószínűleg szisztematikus hibából ered. Ha nyilvánvaló, hogy eljárási hiba történt, illetve ennek nagy a valószínűsége, akkor az adott adatpontot érvénytelenként meg kell jelölni, és ki kell zárni a további statisztikai elemzésből. (Ha a két vagy három párhuzamos tenyészetből az egyik lombik algakoncentrációja nulla, az azt jelezheti, hogy a lombik nem megfelelően lett beoltva, vagy megtisztítva). Az érvénytelenként elvetett adatpontoknál az elvetést egyértelműen indokolni kell a mérési jegyzőkönyvben. Csak eljárási hiba (ritka) lehet elfogadható indok, egyszerű pontatlanság nem. Az érvénytelen adatpontok azonosítására szolgáló statisztikai módszerek csak korlátozottan használhatóak az ilyen típusú problémákra, és nem helyettesítik a szakértői megítélést. Az érvénytelen adatpontokat (ilyenként megjelölve) célszerű megtartani az adatpontok között, feltüntetve azokat a későbbi grafikus vagy táblázatos megjelenítések során.

▼M1

2.2. HATÁSVÁLTOZÓK

A vizsgálat célja a vizsgált anyag által az alga szaporodására gyakorolt hatás meghatározása. Ez a vizsgálati módszer két hatásváltozót ír le, mivel a tagországoknak különböző preferenciáik és szabályozási igényeik vannak. Ahhoz, hogy a vizsgálati eredmények minden tagországban elfogadhatóak legyenek, a hatásokat ki kell értékelni az alább leírt mindkét hatásváltozóval (a) és b)).

a) Átlagos fajlagos szaporodási sebesség: ez a hatásváltozó az élőanyag tömegének a kísérlet alatt bekövetkező logaritmikus növekedése alapján számítható, egy napra vetítve.

b) Szaporulat: ez a hatásváltozó a kísérlet végén mérhető élőanyag-tömeg mínusz a kiindulási élőanyag-tömeg.

E módszernek az EU szabályozási keretén belül történő alkalmazásához az eredményeket az alább leírt okokból kifolyólag az átlagos fajlagos szaporodási sebesség alapján kell kiszámítani. Meg kell jegyezni, hogy e két hatásváltozóval számított toxicitásértékek nem hasonlíthatóak össze, és a vizsgálati eredmények felhasználása során a kettő közötti különbségnek tudatában kell lenni. Az átlagos fajlagos szaporodási sebességen alapuló EC_x értékek (E_rC_x) a két megközelítés matematikai alapjának következtében általában nagyobbak a szaporulaton alapuló eredményeknél (E_yC_x), ha e vizsgálati módszer kísérleti feltételei teljesülnek. Ez nem a két hatásváltozó érzékenysége közötti eltérésként értelmezendő, egyszerűen az értékek matematikailag eltérőek. Az átlagos fajlagos szaporodási sebesség koncepciója az algák korlátozás nélküli tenyészetekben történő általános exponenciális szaporodási sémáján alapszik, ahol a toxicitás mértéke a szaporodási sebességre gyakorolt hatások alapján becsülhető, függetlenül a kontrolltenyészet fajlagos szaporodási sebességének abszolút értékétől, a koncentráció-hatás görbe meredekségétől, vagy a kísérlet időtartamától. Ezzel szemben a „szaporulat” hatásváltozón alapuló eredmények függenek az említett többi változótól. Az E_yC_x függ az egyes vizsgálatokban használt algafajok fajlagos szaporodási sebességétől és a legnagyobb fajlagos szaporodási sebességétől, ami a fajok, sőt még különböző algatörzsek között is eltérő lehet. Ez a hatásváltozó nem használható az algafajok, de még a különböző törzsek mérgező anyagokkal szembeni érzékenységének összehasonlítására sem. Noha tudományos szempontból a toxicitás becsléséhez az átlagos fajlagos szaporodási sebesség használata preferált, e vizsgálati módszer a szaporulaton alapuló toxicitásbecsléseket is tartalmazza, hogy kielégítse a néhány országban érvényben lévő hatósági előírásokat.

2.2.1. **Átlagos szaporodási sebesség**

Az adott időszakra vonatkozó átlagos fajlagos szaporodási sebesség az egyes kontrolltenyészetekre és kezelt tenyészetekre az élőanyag mennyiségének logaritmikus növekedéseként számítható ki a következő egyenletből:

$$\mu_{i\text{-}j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \ (\text{nap}^{-1})$$

ahol:

μ_{i-j} az átlagos fajlagos szaporodási sebesség *i*-től *j* időpontig

X_i az élőanyag mennyisége *i* időpontban

X_j az élőanyag mennyisége *j* időpontban.

▼M1

Minden kezelt és kontrollcsoportra ki kell számítani egy átlagot a szaporodási sebességre, valamint meg kell becsülni a szórásnégyzetet.

Az átlagos fajlagos szaporodási sebességet ki kell számolni a teljes kísérleti időszakra (általában 0–3. nap), kezdeti értékként a névlegesen beoltott élőanyagot, nem pedig a mért kezdeti értéket használva, mert ilyen módon általában nagyobb pontosság érhető el. Ha az élőanyag mérésére használt mérőeszköz lehetővé teszi az oltó élőanyag kis mennyiségének megfelelően pontos meghatározását (pl. áramlásos citométer), akkor használható a mért kezdeti élőanyag-koncentráció. A szakaszonkénti szaporodási sebességet is meg kell állapítani a vizsgálat minden egyes napjára vonatkozóan (0–1., 1–2. és 2–3. nap), ugyanúgy számítva, mint a fajlagos szaporodási sebességet, és meg kell vizsgálni, hogy a kontrolltenyészet szaporodási sebessége állandó marad-e (lásd érvényességi kritériumok, 1.7. pont). Az első napon kapott, a teljes átlagos fajlagos szaporodási sebességnél szignifikánsan kisebb fajlagos szaporodási sebesség késési (lag) fázist jelez. Míg a késési (lag) fázis az előtenyészet megfelelő adagolásával minimalizálható és gyakorlatilag kiküszöbölhető a kontrolltenyészetekben, addig a vizsgált anyagnak kitett tenyészetekben a késési (lag) fázis a kezdeti toxicitás-stressz utáni helyreállást, vagy pedig a vizsgált anyagnak az expozíció elején történő elveszése (beleértve az élőanyagba történő szorpciót) miatti kisebb gátló hatást jelezhet. Ebből következően a szakaszonkénti szaporodási sebesség használható a vizsgált anyagnak a kísérlet során mutatott hatásainak az értékeléséhez. A szakaszonkénti szaporodási sebesség és az átlagos szaporodási sebesség közötti lényeges különbségek az állandó exponenciális szaporodástól való eltérést jelzik, és azt, hogy a szaporodási görbék alapos vizsgálata indokolt.

A szaporodási sebesség százalékos gátlása az egyes kezelt párhuzamos tenyészetekre vonatkozóan az alábbi egyenletből számítható ki:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

ahol:

$\%I_r$: átlagos szaporodási sebesség százalékos gátlása

μ_C: átlagos szaporodási sebesség átlaga (μ) a kontrollcsoportban

μ_T: átlagos szaporodási sebesség átlaga a kezelt párhuzamos tenyészetben.

Ha a kísérleti oldatok oldószer felhasználásával készülnek, oldószer nélküli kontrolltenyészetek helyett oldószeres kontrolltenyészeteket kell használni a százalékos gátlás számításakor.

2.2.2. **Szaporulat**

A szaporulatot az egyes kontrolltenyészetekre és kezelt tenyészetekre úgy kell kiszámítani, hogy a kísérlet végén mért élőanyag-tömegből kivonjuk a kiindulási élőanyag-tömeget. Minden kísérleti koncentrációra és kontrolltenyészetre vonatkozóan ki kell számítani a szaporulatra egy átlagot, valamint meg kell becsülni a szórásnégyzetet. Az egyes kezelt párhuzamos tenyészetekre a szaporulatra vonatkozó százalékos gátlás ($\%\ I_y$) az alábbiak szerint számítható ki:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼M1

ahol:

% I_y: százalékos szaporulatgátlás

Y_C: a szaporulat átlaga a kontrollcsoportban

Y_T: a szaporulat értéke a kezelt párhuzamos tenyészetekben.

2.3. A KONCENTRÁCIÓ-HATÁS GÖRBE SZERKESZTÉSE

A százalékos szaporodásgátlást ábrázolni kell a vizsgált anyag koncentrációjának (logaritmus) függvényében, és alaposan meg kell vizsgálni a görbét, figyelmen kívül hagyva azokat az adatpontokat, amelyek az első szakaszban érvénytelenként lettek megjelölve. Egy egyenest kell illeszteni az adatpontokra kézzel vagy számítógépes interpolációval, ami egy első benyomást ad a koncentráció-hatás összefüggésről, majd ezután kifinomultabb módszert, lehetőleg számítógépes statisztikai módszert kell használni. Az adatok tervezett felhasználásának, minőségének (pontosságának) és mennyiségének, valamint a rendelkezésre álló adatelemző eszközök függvényében lehet úgy dönteni (és néha jól meg lehet indokolni), hogy ezen a szinten befejeződik az adatelemzés és a meghatározó értékek, azaz az EC_{50} és az EC_{10} (és/vagy EC_{20}) egyszerűen leolvashatók a kézzel illesztett görbéről (lásd még alább a stimulációs hatásokról szóló pontot). A következők indokolhatják a statisztikai módszer mellőzését:

— Az adatok nem megfelelőek ahhoz, hogy számítógépes módszerrel további, még megbízhatóbb eredmény szülessen, mint a szakértői megítéléssel – ilyen esetekben néhány számítógépes program nem is képes megbízható megoldást adni (az iteráció nem konvergál stb.).

— Stimulációs szaporodási viselkedés nem kezelhető pontosan a rendelkezésre álló számítógépes programokkal (lásd alább).

2.4. STATISZTIKAI ELJÁRÁSOK

A cél kvantitatív koncentráció-hatás összefüggés előállítása regresszióanalízissel. Használható súlyozott lineáris regresszió, a hatásadatok például probit, logit vagy Weibull egységekbe történő lineáris transzformációja után (9), de célszerű előnyben részesíteni a nem lineáris regressziós technikákat, amelyek jobban kezelik az elkerülhetetlen adatszabálytalanságokat és az egyenletes eloszlástól való eltéréseket. Akár a nulla gátlás, akár a teljes gátlás közelében a transzformáció megsokszorozhat bizonyos szabálytalanságokat, ami hibás elemzést eredményezhet (9). Meg kell jegyezni, hogy a transzformációval kapott probit, logit vagy Weibull egységeket használó szabványos elemzési módszerek kvantált adatok (pl. halálozás vagy túlélés) használatára vannak tervezve, és a szaporodási adatokkal vagy az élőanyagra vonatkozó adatokkal való alkalmazásukhoz módosítani kell őket. Az EC_x értékek folytonos adatokból történő meghatározására szolgáló speciális eljárásokat lásd az irodalomban, (10), (11) és (12). A nem lineáris regresszió használatáról a 4. függelékben található részletesebb információ.

▼M1

Az EC_x értékek pontbecsléseinek kiszámításához a koncentráció-hatás összefüggést kell használni minden elemzendő hatásváltozóra. Lehetőség szerint minden ilyen becsléshez meg kell határozni a 95 %-os megbízhatósághoz tartozó határokat. A hatásváltozók regressziós modellhez való illeszkedésének jóságát grafikusan vagy statisztikai módszerrel kell megállapítani. A regresszióanalízist az egyedi párhuzamos tenyészetekkel kapott adatokkal kell elvégezni, nem pedig a kezelt csoportok átlagaival. Ha azonban a nem lineáris görbeillesztés bonyolult vagy nem sikerül az adatok túl nagy szórása miatt, a problémát meg lehet kerülni a csoportátlagok regresszió-analízisével, ami egy gyakorlati mód a feltehető érvénytelen adat-pontok hatásának csökkentésére. Ennek a lehetőségnek a használatát a szokásos eljárástól való eltérésként fel kell tüntetni a mérési jegy-zőkönyvben, hivatkozva arra, hogy a görbeillesztések az egyedi párhuzamos tenyészeteknél kapott adatokkal nem adtak jó eredményt.

Az EC_{50} becsült értékeit és a megbízhatósági határokat visszatevéses mintavétellel („bootstrap” módszer) együtt alkalmazott lineáris interpolációval (13) is megkaphatjuk, ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem használhatók a kapott adatokkal.

Az LOEC és ennélfogva az NOEC becsléséhez is, illetve a vizsgált anyag által a szaporodási sebességre gyakorolt hatásnak a becs-léséhez szórásnégyzet-elemzési (ANOVA) eljárások segítségével össze kell hasonlítani a kezelt csoport átlagait. Ezután az egyes koncentrációk átlagát össze kell hasonlítani a kontrolltenyészetek átlagával megfelelő többszörös adat-összehasonlító vagy trendelemző módszer segítségével. A Dunnett- vagy a Williams-féle módszer használható lehet erre a célra (14)(15)(16)(17)(18). Meg kell állapítani, hogy fennáll-e a szórásnégyzetnek az ANOVA módszerben feltételezett homogenitása. Ez történhet grafikusan vagy formális próbával (18). A Levene- és Bartlett-féle próbák megfelelőek ehhez. Ha a szórásnégyzet homogenitásának követelménye nem teljesül, az néha az adatok logaritmikus transzformációjával korrigálható. Ha a szórásnégyzet rendkívül heterogén és transzformációval nem korrigálható, akkor fontolóra kell venni az olyan módszerekkel végzett elemzést, mint például a redukáló Jonkheere trendpróbák (step-down Jonkheere trend tests). Az NOEC meghatározásához további útmutatás is található az irodalomban (12).

Az újabb keletű tudományos eredmények az NOEC-koncepció elhagyásának ajánlásához és az EC_x regresszión alapuló pontbecsléssel történő meghatározásával való helyettesítéséhez vezettek. Ehhez az algavizsgálathoz még nem állapítottak meg megfelelő x értéket. A 10–20 %-os tartomány azonban megfelelőnek tűnik (a választott hatásváltozótól függően), és célszerű mind az EC_{10}-et, mind az EC_{20}-at megadni a mérési jegyzőkönyvben.

2.5. SZAPORODÁSSTIMULÁCIÓ

Kis koncentrációk mellett néha szaporodásstimuláció (negatív gátlás) figyelhető meg. Ezt vagy a hormesis (kétfázisú reagálás) jelensége („toxikus anyag által kiváltott stimuláció”), vagy a vizsgált anyaggal együtt az alkalmazott ásványi sókat tartalmazó tápoldatba került szaporodásserkentő tényezők okozhatják. Megjegyzendő, hogy a szervetlen tápanyagok hozzáadásának nem lehet semmilyen közvetlen hatása, mert a kísérleti oldatnak a kísérlet folyamán végig feleslegben kell tartalmaznia a tápanyagot. Kis dózisú stimuláció gyakran figyelmen kívül hagyható az EC_{50} kiszámítása során, hacsak mértéke nem rendkívül nagy. Ha azonban rendkívül nagy mértékű, vagy pedig kis x értékre kell EC_x-et számítani, akkor speciális eljárásokra lehet szükség. Lehetőség szerint kerülni kell a stimulációs hatások törlését az adat-elemzésből, és ha a rendelkezésre álló görbeillesztő szoftver nem képes kezelni a kisebb mértékű stimulációkat, akkor visszatevéses mintavétellel („bootstrap” módszer) együtt alkalmazott lineáris interpoláció használható. Ha a stimuláció rendkívül nagy, akkor mérlegelni lehet hormesismodell alkalmazását (19).

▼M1

2.6. NEM A TOXIKUS ANYAG ÁLTAL KIVÁLTOTT SZAPORODÁSGÁTLÁS

A fényt abszorbeáló anyagok a szaporodási sebesség csökkenését okozhatják, hiszen az árnyékolás csökkenti a kapott fény mennyiségét. Az ilyen jellegű fizikai hatásokat a kísérleti körülmények módosításával el kell választani a toxikus hatásoktól, és az előbbit külön kell dokumentálni. Útmutatás az irodalomban található, (2) és (3).

3. **DOKUMENTÁCIÓ**

3.1. MÉRÉSI JEGYZŐKÖNYV

A mérési jegyzőkönyvnek az alábbiakat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— fizikai jelleg és a vonatkozó fizikai és kémiai tulajdonságok, beleértve a vízoldhatósági határértéket is,

— kémiai azonosítás, beleértve a tisztaságot is.

Vizsgált fajok:

— a törzs, a szállító vagy az eredet, és az alkalmazott tenyésztési körülmények.

Kísérleti körülmények:

— a kísérlet kezdetének időpontja és a kísérlet időtartama,

— a kísérlet kivitelezésének leírása: kísérleti eszközök, a tenyészetek mennyisége, az élőanyag sűrűsége a vizsgálat kezdetén,

— a tápoldat összetétele,

— kísérleti koncentrációk és párhuzamos tenyészetek (pl. párhuzamos tenyészetek száma, kísérleti koncentrációk száma és az alkalmazott mértani sor),

— a kísérleti oldatok készítésének leírása, beleértve az oldószerek használatát stb.,

— tenyésztőkészülék,

— fényerő és -minőség (fényforrás, homogenitás),

— hőmérséklet,

— kísérleti koncentrációk: a névleges kísérleti koncentrációk és a lombikokban lévő vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására szolgáló analízisek eredménye. A vizsgálati mátrixra vonatkozóan a mérési jegyzőkönyvben fel kell tüntetni a módszer visszanyerési hatékonyságát és a mennyiségi meghatározás határértékét,

— minden eltérés ettől a vizsgálati módszertől,

— az élőanyag tömegének meghatározási módszere, valamint a mért paraméter és a száraz tömeg közötti korreláció bizonyítéka.

Eredmények:

— pH-értékek minden kezelés kezdetén és végén,

— az élőanyag tömege minden lombikban és minden mérési pontban, valamint az élőanyag mérésének módszere,

▼M1

— szaporodási görbék (az élőanyag mennyiségének ábrázolása az idő függvényében),

— számított hatásváltozók minden kezelt párhuzamos tenyészetre, átlagokkal és variációs együtthatókkal a párhuzamos tenyészetekre,

— a koncentráció-hatás összefüggés grafikus ábrázolása,

— toxicitásbecslés a hatásváltozókra, pl. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} és a kapcsolódó megbízhatósági intervallumok. Az LOEC és az NOEC, ha ezek kiszámítása megtörtént, és a meghatározásukhoz használt statisztikai módszer,

— az ANOVA módszer használata esetén a kimutatható hatás mértéke (pl. a legkisebb szignifikáns különbség),

— bármilyen észlelt szaporodásstimuláció a kezelt rendszerekben,

— bármilyen más észlelt hatás, például az algák morfológiai változása,

— az eredmények tárgyalása, beleértve az ettől a vizsgálati módszertől való eltérés eredményeképpen a vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatásokat.

4. **IRODALOM**

(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

1. függelék

A vizsgálathoz bizonyítottan alkalmas törzsek

Zöldalgák

— *Pseudokirchneriella subcapitata*, (régebbi elnevezéssel *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

— *Desmodesmus subspicatus* (régebbi elnevezéssel *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Kovamoszatok

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Cianobaktériumok

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

A törzsek eredete

Az ajánlott törzsek egyfajú algatenyészetként beszerezhetőek az alábbi törzsgyűjteményekből (ábécésorrendben):

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

UK

Sammlung von Algenkulturen

Albrecht-von-Haller-Institut

Universität Göttingen

Nikolausberger Weg 18

D-37073 Göttingen

GERMANY

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

A javasolt fajok fenotípusa és jellemzői

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Fenotípus	Hajlott, csavart egyedi sejtek	Ovális, főként egyedi sejtek	Pálcák	Ovális sejtekből álló fonalak	Pálcák
Méret (hossz × szélesség) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Sejttérfogat (μm^3/sejt)	40–60 (1)	60–80 (1)	40–50 (1)	30–40 (1)	2,5 (2)
Sejt száraz tömege (mg/sejt)	$2–3 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$3–4 \times 10^{-8}$	$1–2 \times 10^{-8}$	$2–3 \times 10^{-9}$
Szaporodási sebesség (3) (nap^{-1})	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

(1) Elektronikus részecskeszámlálóval mérve
(2) A méretből számítva
(3) Leggyakrabban tapasztalt szaporodási sebesség OECD-tápoldatban kb. 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ fényintenzitásnál és 21 °C-on.

Egyedi ajánlások a vizsgálathoz ajánlott fajok tenyésztésére és kezelésére

Pseudokirchneriella subcapitata és Desmodesmus subspicatus

Ezeket a zöldalgákat általában könnyű fenntartani különféle tápoldatokban. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ. A sejtek általában különállóak, és a sejtsűrűség könnyen mérhető elektronikus részecskeszámlálóval vagy mikroszkóppal.

Anabaena flos-aquae

Törzstenyészet fenntartására számos tápoldat használható. Különösen fontos, hogy megújításkor elkerüljük az egyszeres (batch) tenyészet túlfutását az exponenciális fázison, mert azután már nehéz helyreállítani a tenyészetet.

Az *Anabaena flos-aquae* fonaltelepekben fejlődik. Ezek mérete a tenyésztési körülményekkel változik. Mikroszkópos vagy elektronikus részecskeszámlálóval végzett élőanyag-meghatározáshoz fontos lehet ezeknek a telepeknek a feltörése.

Részminták ultrahangos kezelése használható a láncok feltörésére, hogy csökkenjen a sejtszámlálás változékonysága. A fonalak rövidebb szakaszokra töréséhez szükségesnél hosszabb ultrahangos kezelés roncsolhatja a sejteket. Az ultrahangos kezelés intenzitásának és hosszának minden kezelésnél azonosnak kell lennie.

A változékonyság kompenzálásának elősegítése céljából elegendően nagy számú mezőben kell a számlálást végezni a hemocitométerben (legalább 400 sejt). Ez növeli a mikroszkópos sűrűségmeghatározás megbízhatóságát.

Elektronikus részecskeszámláló használható az *Anabaena* teljes sejttérfogatának meghatározásához, a sejtfonalak óvatos ultrahangos széttörése után. Az ultrahang energiáját úgy kell beállítani, hogy elkerüljük a sejtek roncsolását.

Örvénykeverő segítségével vagy hasonló alkalmas módszerrel biztosítani kell, hogy a lombikok beoltására alkalmazott algaszuszpenzió megfelelően el legyen keverve és homogén legyen.

▼M1

A lombikokat kb. 150/perc fordulatszámú körpályás, vagy lengőmozgású rázóasztalra kell helyezni. Más megoldásként szakaszosan keverés is használható az *Anabaena* összetapadási hajlamának csökkentésére. Ha összetapadás történik, ügyelni kell arra, hogy az élőanyag-mérésekhez szükséges minták reprezentatívak legyenek. Az összetapadt algák szétválasztásához erőteljes keverés lehet szükséges a mintavétel előtt.

Synechococcus leopoliensis

A törzstenyészet fenntartására különféle tápoldatok használhatók. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ.

A *Synechococcus leopoliensis* különálló pálca alakú sejtek formájában szaporodik. A sejtek nagyon kicsik, ami megnehezíti az élőanyag-meghatározáshoz szükséges mikroszkópos sejtszámlálást. Jól használhatók a kb. 1 μm méretű részecskék számlására alkalmas elektronikus részecskeszámlálók. *In vitro* fluorometriai mérések szintén alkalmazhatóak.

Navicula pelliculosa

A törzstenyészet fenntartására különféle tápoldatok használhatók. A megfelelő tápoldatról a tenyészetgyűjteményektől szerezhető be információ. Figyelni kell arra, hogy a tápoldatban lennie kell szilikátnak.

A *Navicula pelliculosa* bizonyos körülmények között telepeket hozhat létre. A lipidtermelés következtében az algasejtek néha hajlamosak rétegekben összegyűlni a felszínen. Ilyen körülmények között az élőanyag mennyiségének meghatározásához leveendő minták esetében speciális intézkedések szükségesek ahhoz, hogy a minták reprezentatívak legyenek. Erőteljes rázás, pl. örvénykeverő használata lehet szükséges.

▼**M1**

2. függelék

Tápoldatok

A következő két tápoldat egyike használható:

OECD-tápoldat: Az OECD TG 201 jelű eredeti tápoldat, megfelel az ISO 8692-nek is.

Az USA Környezetvédelmi Hatóságának (EPA) AAP-tápoldata, megfelel az ASTM-nek is.

Ezeknek a tápoldatoknak az elkészítése során laboratóriumi reagenseket vagy analitikai tisztaságú vegyszereket, és ionmentesített vizet kell használni.

Az AAP-tápoldat (USA EPA) és OECD TG 201 jelű tápoldat összetétele.

Komponens	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
$MgCl_2•6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2•2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4•7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3•6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA•2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2•4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2•6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4•2(H_2O)$	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	

(*) Az EDTA/vas mólarány kissé nagyobb 1-nél. Ez megakadályozza a vas kicsapódását, és ugyanakkor a kelátképződés a nehézfém-ionokkal a lehető legkisebb lesz.

A *Navicula pelliculosa* kovamoszattal végzett vizsgálat során mindkét tápoldathoz $Na_2SiO_3•9H_20$-t kell adni úgy, hogy a koncentráció 1,4 mg Si/l legyen.

A tápoldat pH-ját akkor kell mérni, amikor egyensúly van az oldat karbonáttartalma és a környezeti levegőben lévő CO_2 parciális nyomása között. Közelítő összefüggés a 25 °C-on mért pH és a moláris bikarbonátkoncentráció között:

$$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

15 mg $NaHCO_3$/l-rel pH_{eq} = 7,5 (EPA-tápoldat), és 50 mg $NaHCO_3$/l-rel pH_{eq} = 8,1 (OECD-tápoldat).

A kísérleti oldatok elemi összetétele

Kémiai elem	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

Az OECD-tápoldat elkészítése

Tápanyagok	Koncentráció a törzsoldatban
1. törzsoldat: makrotápanyagok	
NH_4Cl	1,5 g•l^{-1}
$MgCl_2$•$6H_2O$	1,2 g•l^{-1}
$CaCl_2$•$2H_2O$	1,8 g•l^{-1}
$MgSO_4$•$7H_2O$	1,5 g•l^{-1}
KH_2PO_4	0,16 g•l^{-1}
2. törzsoldat: vas	
$FeCl_3$•$6H_2O$	64 mg•l^{-1}
Na_2EDTA•$2H_2O$	100 mg•l^{-1}
3. törzsoldat: nyomelemek	
H_3BO_3	185 mg•l^{-1}
$MnCl_2$•$4H_2O$	415 mg•l^{-1}
$ZnCl_2$	3 mg•l^{-1}
$CoCl_2$•$6H_2O$	1,5 mg•l^{-1}
$CuCl_2$•$2H_2O$	0,01 mg•l^{-1}
Na_2MoO_4•$2H_2O$	7 mg•l^{-1}
4. törzsoldat: bikarbonát	
$NaHCO_3$	50 g•l^{-1}
Na_2SiO_3•$9H_2O$	

A törzsoldatokat membránszűréssel (átlagos pórusátmérő 0,2 μm) vagy autoklávban (120 °C, 15 perc) sterilizálni kell. Az oldatokat 4 °C-on, sötét helyen kell tárolni.

A 2. és 4. törzsoldatokat nem szabad autoklávban kezelni, hanem membránszűréssel kell őket sterilizálni.

▼M1

Készítsük el a tápoldatot az 1–4. törzsoldatokból vett megfelelő térfogatok és víz összekeverésével:

Adjunk kb. 500 ml sterilizált vízhez:

— 10 ml-t az 1. törzsoldatból,

— 1 ml-t az 2. törzsoldatból,

— 1 ml-t az 3. törzsoldatból,

— 1 ml-t az 4. törzsoldatból.

Töltsük fel az oldatot 1 000 ml-re sterilizált vízzel.

Várjuk meg, hogy a tápoldat egyensúlyba kerüljön a környezetben lévő CO_2-vel, szükség esetén buborékoltassunk át az oldaton steril, szűrt levegőt néhány órán keresztül.

Az AAP-tápoldat elkészítése

A1.1. Adjunk az A1.2.1–A1.2.7. pontokban felsorolt törzsoldatok mindegyikéből 1–1 ml-t kb. 900 ml ionmentesített vagy desztillált vízhez, majd hígítsuk fel 1 literre.

A1.2. A makrotápanyagok törzsoldatainak készítéséhez oldjuk fel az alábbiakat 500 ml ionmentesített vagy desztillált vízben. Az A1.2.1., A1.2.2., A1.2.3. és A1.2.4. pontokban szereplő reagensek egyesíthetők egy törzsoldatba.

A1.2.1. $NaNO_3$ – 12,750 g.

A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g.

A1.2.4. *Mikrotápanyagok törzsoldata*– (lásd 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. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ Lásd az A1.1. megjegyzést.

A1.1. megjegyzés: Csak kovamoszatfajokhoz alkalmazandó. Beadható közvetlenül (202,4 mg) vagy törzsoldat formájában úgy, hogy 20 mg/l Si legyen a tápoldatban a végkoncentráció.

A1.3. A mikrotápanyagok törzsoldatának elkészítéséhez oldjuk fel az alábbiakat 500 ml ionmentesített vagy desztillált vízben:

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.

[Dinátrium(etilén-dinitrilo)tetraacetát].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005 mg. Lásd az A1.2. megjegyzést.

A1.2. megjegyzés: Csak kovamoszatfajok törzstenyészetének tápoldatában alkalmazandó.

A1.4. Állítsuk be a pH-t 7,5 ± 0,1 értékre 0,1 *N* vagy 1,0 *N* NaOH-dal vagy HCl-dal.

A1.5. Szűrjük a tápközeget steril edénybe, vagy 0,22 μm-os membránszűrőn ha részecskeszámlálót használunk, vagy 0,45 μm-os szűrőn ha nem részecskeszámlálót használunk.

A1.6. Felhasználásig tároljuk a tápoldatot sötét helyen, kb. 4 °C-on.

▼M1

3. függelék

Példa algatenyésztési eljárására

Általános megjegyzések

A következő eljáráson alapuló tenyésztés célja algatenyészetek előállítása toxicitásvizsgálatokhoz.

Az algatenyészetek bakteriális fertőződésének elkerülése érdekében megfelelő módszereket kell használni. Tiszta (axenikus) tenyészetek kívánatosak lehetnek, de egyfajú algatenyészeteket kell létrehozni és felhasználni.

Minden beavatkozást steril körülmények között kell végezni, elkerülendő a baktériumokkal, vagy más algákkal történő szennyeződést.

Eszközök és anyagok

Lásd „Vizsgálati módszer: Felszerelés”.

Eljárások algatenyészetek előállításához

Tápoldatok készítése:

A tápoldat minden tápsóját tömény törzsoldatként készítjük, és sötét hideg helyen tároljuk. Ezeket az oldatokat szűréssel vagy autoklávban sterilizálni kell.

A tápoldat a megfelelő mennyiségű törzsoldat desztillált vízhez való hozzáadásával készül, ügyelve arra, hogy ne történjen befertőződés. Szilárd táptalajhoz 0,8 % agart kell adni.

Törzstenyészet:

A törzstenyészetek kicsi algatenyészetek, melyeket rendszeresen friss tápoldatba juttatunk, hogy kiindulási anyagként szolgáljanak a vizsgálathoz. Ha a tenyészeteket nem használjuk rendszeresen, agarral töltött ferde kémcsövekben szélesztjük őket. Ezeket a tenyészeteket legalább kéthavonta egyszer átvisszük friss táptalajra.

A törzstenyészetek kitenyésztése a megfelelő táptalajt (térfogat kb. 100 ml) tartalmazó Erlenmeyer-lombikokban történik. Ha az algákat 20 °C-on, folyamatos megvilágítás mellett inkubáljuk, heti átoltás szükséges.

„Öreg” tenyészetből olyan mennyiségét kell átvinni steril pipettával a friss táptalajt tartalmazó lombikba, hogy a gyorsan szaporodó fajok esetén a kezdeti koncentráció 100-szor kisebb legyen, mint az „öreg” tenyészetben.

A faj szaporodási sebessége a szaporodási görbéből határozható meg. Ha ez ismert, akkor megbecsülhető az a sűrűség, amelynek elérésekor a tenyészetből át kell vinni az új tápoldatba. Ezt azelőtt kell elvégezni, mielőtt a tenyészet eléri a pusztulási fázist.

Előtenyészet:

Az előtenyészet célja, hogy a vizsgálathoz használt tenyészet beoltásához megfelelő mennyiségű algát adjon. Az előtenyészetet a kísérleti körülmények között inkubáljuk és akkor használjuk fel, amikor még exponenciálisan szaporodó fázisban van, szokásosan 2–4 napos inkubációs időszakot követően. A deformált vagy abnormális sejteket tartalmazó algatenyészeteket ki kell selejtezni.

▼M1

4. függelék

Adatelemzés nem-lineáris regresszióval

Általános szempontok

Az algaszaporodási és más mikrobiológiai szaporodási vizsgálatokban a hatás – az élőanyag növekedése – természeténél fogva folyamatos, azaz metrikus változó – folyamatsebesség, ha a szaporodási sebességet használjuk, illetve annak idő szerinti integrálja, ha az élőanyag tömegét választjuk. Mindkettő olyan nem kezelt, párhuzamos kontrollmintákban fellépő, megfelelő hatás átlagához van viszonyítva, amelyek maximálisan reagáltak az adott körülményekre – az algás vizsgálatoknál ezek közül meghatározó tényező a fény és a hőmérséklet. A rendszer statisztikai eloszlású, azaz homogén, és az élőanyag kontiniumnak tekinthető, nem pedig önálló sejteknek. Ilyen rendszereknél a jellemző hatás szórásnégyzet-eloszlása kizárólag a kísérleti tényezőktől (amelyeket jellemzően a log/normál vagy a normál hibaeloszlás ír le) függ. Ezzel szemben, a jellemző biológiai kísérletek kvantált adatokkal szolgálnak, amelyeknél az önálló organizmusok tűréséről (ami jellemzően binomiális eloszlású) gyakran feltételezik, hogy az a meghatározó komponens a szórásnégyzetben. A kontrollmintában fellépő hatások ekkor nullával, vagy a háttérszinttel egyenlőek.

Egyszerű esetben a normált vagy relatív válasz, r, monoton csökken 1-től (nulla gátlás) 0-ig (100-százalékos gátlás). Megjegyzendő, hogy minden hatással együtt jár egy belső hiba, és hogy a megjelenő negatív gátlások csak véletlen hiba eredményeként számolhatók.

Regresszióanalízis

Modellek

A regresszióanalízis célja, hogy egy matematikai regressziós függvény, Y = f (C), vagy még gyakrabban F (Z), ahol Z = log C, formájában mennyiségileg leírja a koncentráció-hatás görbét. A függvény inverze, a $C = f^{-1} (Y)$, segítségével kiszámíthatók az EC_x értékek, köztük az EC_{50}, EC_{10} és EC_{20}, valamint ezekre a 95 %-os megbízhatósághoz tartozó határok. Több egyszerű matematikai függvény bizonyítottan jól leírja az algákkal végzett szaporodásgátlási vizsgálatokban kapott koncentráció-hatás összefüggéseket. Ilyen függvény például a logisztikai egyenlet, az aszimmetrikus Weibull-egyenlet, és a log/normál eloszlási függvény, amelyek mind szigmoid görbék, melyek aszimptotikusan közelítenek 1-hez, ha C → 0-hoz, illetve 0-hoz, ha C → a végtelenhez.

Újabban ajánlott a folytonos küszöbérték-függvényre alapuló modellek (mint pl. a Kooijman-modell a „populációnövekedés gátlására”, Kooijman és mtsai, 1996) használata, akár az aszimptotikus modellek alternatívájaként. Ez a modell feltételezi, hogy egy adott küszöbérték, EC0+, alatt a koncentrációknak nincs hatása, és ennek a küszöbértéknek a meghatározása a koncentráció-hatás görbe egy, a kezdőpontban nem differenciálható egyszerű folyamatos függvény segítségével történő extrapolációjával és a koncentrációtengely metszésével történik.

Megjegyzendő, hogy az analízis lehet a legkisebb négyzetek összegének módszere (állandó szórásnégyzetet feltételezve), vagy a súlyozott legkisebb négyzetek módszere, ha a szórásnégyzet heterogenitása kompenzálva van.

▼M1

Eljárás

Az eljárás a következő: választani kell egy megfelelő függvényt, az Y = f (C)-t, és nem lineáris regresszióval rá kell illeszteni az adatpontokra. Lehetőség szerint az egyes lombikokból származó méréseket használjuk, ne pedig a párhuzamos minták átlagait, hogy a lehető legtöbb információt nyerjük ki az adatokból. Ha viszont a szórásnégyzet értéke nagy, akkor a gyakorlati tapasztalatok azt mutatják, hogy a párhuzamos minták átlagai szilárdabb matematikai becslést eredményezhetnek (amelyet csak kevéssé befolyásolnak az adatokban meglévő véletlen hibák), mint a minden egyes megtartott adatpont használata.

Az illesztett görbe és a mért adatok megszerkesztése után meg kell vizsgálni, hogy a görbe illeszkedése megfelelő-e. A különbségek elemzése különösen hasznos eszköz lehet erre a célra. Ha a koncentráció-hatás pontokra való illesztéshez választott függvény nem írja le jól a teljes görbét, vagy annak egy adott, alapvetően fontos részét – mint például a kis koncentrációknál jelentkező hatásokat – akkor egy másik illesztési megoldást kell választani, a szimmetrikus helyett például aszimmetrikus görbét, mint pl. a Weibull-függvényt. Negatív gátlás esetén probléma lehet például a logaritmikus/normál eloszlási függvénnyel, ekkor szintén egy másik regressziófüggvényt kell használni. Az ilyen negatív értékek nullával vagy kis pozitív számmal történő helyettesítése nem ajánlott, mert torzítja a hibaeloszlást. Célravezetőbb lehet másik illesztést használni az érintett szakaszokra – például arra, ahol a szaporodásgátlás kis mértékű –, egy adott $EC_{low\ x}$ érték meghatározása céljából. Az illesztési egyenletből ki kell számítani (inverz számítással, $C = f^{-1}(Y)$) az EC_x jellemző pontértékeit, és a mérési jegyzőkönyvben meg kell adni legalább az EC_{50}-re és egy vagy két $EC_{low\ x}$-re kapott értékeket. A gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy az algás vizsgálatok pontossága általában elfogadhatóan pontos becslést tesz lehetővé 10 %-os gátlási szinten, ha van elég adatpont – kivéve, ha zavaró tényezőként stimuláció fordul elő kis koncentrációknál. Az EC_{20}-becslés pontossága gyakran lényegesen jobb, mint az EC_{10}-é, mert az EC_{20} rendszerint a koncentráció-hatás görbe középső, közelítőleg lineáris szakaszára esik. A szaporodásstimuláció miatt néha nehéz az EC_{10}-et értelmezni. Összefoglalva, noha az EC_{10} általában kielégítő pontossággal meghatározható, mindig ajánlott az EC_{20} feltüntetése is a mérési jegyzőkönyvben.

Súlyozó tényezők

A tapasztalati szórásnégyzet általában nem állandó, és rendszerint tartalmaz egy proporcionális tagot, ezért előnyös rutinszerűen súlyozott regressziót végezni. Az ilyen analízishez használt súlyozó tényezők általában fordítottan arányosak a szórásnégyzettel:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Sok regresszióelemző programban lehetőség van a súlyozott regresszióanalízisre úgy, hogy a súlyozó tényezők egy táblázatban vannak felsorolva. Kényelmi szempontból a súlyozó tényezőket célszerű normálni, megszorozva őket $n/\sum w_i$ -vel (ahol n az adatpontok száma), hogy az összegük egyenlő legyen 1-gyel.

A hatásváltozók normálása

A kontrollmintával kapott hatások átlagával történő normálás elvi problémákat vet fel és meglehetősen bonyolult szórásnégyzet-szerkezethez vezethet. Ha a szaporodásgátlás százalékos meghatározásához a kapott hatásértékeket elosztjuk a kontrollmintával kapott hatások átlagával, további hibát viszünk be, amit a kontrollminta átlagának hibája okoz. Ha ez a hiba nem elhanyagolhatóan kicsi, akkor a regresszióhoz és a megbízhatósági határokhoz használt súlyozó tényezőket korrigálni kell a kontrollminták kovarianciájával (17). Megjegyzendő, hogy nagyon fontos a kontrollmintákkal kapott hatásértékek becsült átlagának a pontossága, hogy a lehető legkisebb legyen a relatív hatás általános szórásnégyzete. Ez a szórásnégyzet a következő:

▼M1

az i alsó index az i-dik koncentrációkat, a 0 alsó index pedig a kontrollmintákat jelöli

$$Y_i = \text{Relatív hatás} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

szórásnégyzettel:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i/\partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i/\partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

és mivel

$$(\partial Y_i/\partial r_i) = 1/r_0 \text{ and } (\partial Y_i/\partial r_0) = r_i/r_0^2$$

normál eloszlású adatoknál és m_i és m_0 párhuzamos mintákkal:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

a relatív hatás, Y_i, teljes szórásnégyzete így a következő:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \bullet \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

A kontrollminták átlagának hibája fordítottan arányos az átlagolt párhuzamos kontrollminták számának négyzetgyökével, és néha indokolt lehet régebbi adatokat is felhasználni és így nagy mértékben csökkenteni a hibát. Más megoldásként mellőzhető az adatok normálása és az illesztést az abszolút hatásértékekre kell elvégezni, beleértve a kontrollminta hatásadatait is, de ekkor újabb paraméterként be kell vezetni a kontrollminta hatásértékét, amelyre nem lineáris regresszióval el kell végezni az illesztést. A szokásos 2-paraméteres regresszióegyenlet esetén ehhez a módszerhez 3 paraméter illesztése szükséges, és így több adatpontot igényel, mint az előre beállított kontrollminta-hatás segítségével normált adatokon végzett nem lineáris regresszió.

Inverz megbízhatósági intervallumok

A nem lineáris regresszió megbízhatósági intervallumainak inverz becsléssel történő kiszámítása meglehetősen bonyolult és a szokásos statisztikai számítógépes programcsomagokban ez a lehetőség nem is áll rendelkezésre. A körülbelüli megbízhatósági határok megkaphatók szokásos nem lineáris regressziós programmal, a paraméterek megváltoztatásával (Bruce and Versteeg, 1992), ami a matematikai egyenletnek az átírását jelenti a kívánt pontbecslésekkel, pl. az EC_{10}-zel és az EC_{50}-nel mint megbecsülendő paraméterekkel. (Legyen a függvény $I = f(\alpha, \beta, \text{koncentráció})$ és a definiáló egyenletek, $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ és $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ felhasználásával helyettesítsük be az $f(\alpha, \beta, \text{koncentráció})$ függvényt egy ekvivalens $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentráció})$ függvénnyel.

Közvetlenebb számítás (Andersen és mtsai, 1998) végezhető az eredeti egyenlet megtartásával és az r_i és r_0 átlagok körüli Taylor-sorfejtés felhasználásával.

Újabban a visszatevéses mintavételes (bootstrap) módszerek váltak népszerűvé. Ezek a módszerek mért adatokat, és véletlenszám-generátor által irányított gyakori mintavételt használnak a tapasztalati szórásnégyzet eloszlásának becslésére.

Irodalom

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. A „GYORS” BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG MEGHATÁROZÁSA

I. RÉSZ ÁLTALÁNOS

1.1. BEVEZETÉS

Ez a leírás hat vizsgálati módszert ismertet, amelyek lehetővé teszik a kémiai anyagok szűrését a biológiailag könnyen végbemenő lebonthatóság szempontjából, valamely aerob vizes közegben.

a) Oldottszervesszén- („Dissolved Organic Carbon” = DOC) csökkenés (C.4-A. módszer);

b) Módosított OECD vizsgálat – DOC-csökkenés (C.4-B. módszer);

c) Szén-dioxid-fejlődés-vizsgálat (CO_2) (módosított Sturm-féle vizsgálat) (C.4.-C. módszer);

d) Manometrikus respirometria (C.4-D. módszer);

e) Zárt palack (C.4-E. módszer);

f) MITI (Ministry of International Trade and Industry – Japán) (C.4-F. módszer).

A módszer leírásának I. része ismerteti mind a hat vizsgálathoz tartozó általános és közös tételeket és megjegyzéseket. Az egyes módszerekre sajátosan jellemző tételek a II–VII. részben találhatók. A függelékek fogalommeghatározásokat, képleteket és iránymutató anyagokat tartalmaznak.

Egy 1988-ban, az OECD-országok laboratóriumaiban végrehajtott körvizsgálat azt mutatta, hogy a módszerek egymással egyező eredményeket adnak. Azonban a vizsgált anyag fizikai jellemzőitől függően a módszerek közül az egyik vagy a másik előnyben részesíthető.

1.2. A MEGFELELŐ MÓDSZER KIVÁLASZTÁSA

A legmegfelelőbb módszer kiválasztásához lényegesek a kémiai anyag oldhatóságára, gőznyomására és adszorpciós jellemzőire vonatkozó információk. Rendszerint ismerni kell a kémiai szerkezetet vagy a képletet a paraméterek, mint például a ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (lásd az 1. és 2. függeléket) elméleti értékeinek kiszámítására és/vagy mért értékeinek ellenőrzésére.

Azon vizsgált anyagok, amelyek vízben legalább 100 mg/l mértékben oldhatók, a fenti módszerek közül bármelyikkel kiértékelhetők, feltéve hogy nem illékonyak, és nem adszorbeálódnak. Az 1. táblázat tartalmazza a megfelelő módszereket azon kémiai anyagokhoz, amelyek vízben gyengén oldhatók, illékonyak vagy adszorbeálódnak. A 3. függelék írja le azt a módot, ahogyan a vízben gyengén oldható és illékony anyagok kezelhetők. Mérsékelten illékony kémiai anyagok a DOC-csökkenés módszerével vizsgálhatók, ha elegendő gáztér van a vizsgálati tartályokban (amelyeket megfelelően le kell zárni). Ezen esetben abiotikus kontrollt kell alkalmazni minden lehetséges fizikai veszteség figyelembevételére.

▼B

1. táblázat

A vizsgálati módszerek alkalmazhatósága

Vizsgálat	Analitikai módszer	Alkalmas olyan anyagokhoz, amelyek:		
		rosszul oldódnak	illékonyak	adszorbeálódnak
DOC- csökkenés	Oldott szerves szén	—	—	+/–
Módosított OECD-vizsgálat	Oldott szerves szén	—	—	+/–
CO_2-fejlődés-vizsgálat	Respirometria: CO_2-fejlődés	+	—	+
Manometrikus respirometria	Manometrikus respirometria: oxigénfogyasztás	+	+/–	+
Zárt palack	Respirometria: oldott oxigén	+/–	+	+
MITI-vizsgálat	Respirometria: oxigénfogyasztás	+	+/–	+

A kapott eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgált anyag tisztaságára vagy relatív arányaira vonatkozó információkra, különösen kismértékű lebonthatóság vagy szélsőséges eredmények esetén.

Nagyon hasznosnak bizonyulhatnak a vizsgált anyag baktériummal szembeni toxicitására vonatkozó információk (4. függelék), ezek lényegesek lehetnek az alacsony biológiai lebomlási értékek megfelelő értelmezéséhez.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Az eljárás ellenőrzéséhez a normál vizsgálatsorozattal egyidejűleg megfelelő lombik segítségével olyan referenciaanyagokat kell megvizsgálni, amelyek kielégítik a biológiailag gyors lebonthatóság kritériumait.

Alkalmas kémiai anyagok az anilin (frissen desztillált), a nátrium-acetát és a nátrium-benzoát. E referenciaanyagok közül mindegyik lebomlik ezen módszerekben, még akkor is, ha szándékosan nem történt inokulum-hozzáadás.

Javasolt olyan referenciaanyagot keresni, amely biológiailag gyorsan lebontható, de amelyhez szükség van valamilyen inokulum hozzáadására. A kálium-hidrogén-ftalátot javasolták, de további bizonyítékot kell beszerezni, mielőtt ezt elfogadnánk referenciaanyagként.

A respirometriás vizsgálatokban a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció miatt hatással lehetnek az oxigénfelvételre (lásd a 2. és 5. függeléket).

I.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyagot ásványianyag-tápoldatban fel kell oldani vagy szuszpendálni, és aerob állapotok mellett, sötétben vagy diffúz fényben be kell oltani és inkubálni. A vizsgált oldatban az oltóanyagnak tulajdonítható DOC mennyiségét a vizsgált anyagnak tulajdonítható DOC-mennyiséggel összehasonlítva a lehető legalacsonyabban kell tartani. Figyelembe kell venni az inokulum endogén aktivitását egyidejűleg végzett vakpróbák segítségével, amelyek esetében az oldat csak inokulumot tartalmaz, de vizsgált anyagot nem, jóllehet, az anyag jelenlétében a sejtek endogén aktivitása nem fog pontosan megegyezni az endogén kontrollban jelentkező aktivitással. Egyidejűleg vizsgálni kell valamely referenciaanyagot az eljárások működésének ellenőrzésére.

▼B

Általában a lebomlást az olyan paraméterek meghatározása követi, mint például a DOC, a CO_2-képződés és az oxigénfelvétel, és elegendően gyakori időközönként méréseket kell végrehajtani a biológiai lebomlás kezdete és vége megállapításának lehetővé tételére. Automata respirométer alkalmazása esetén a mérés folyamatos. Más paramétereken kívül esetenként a DOC-ot is mérni kell, de ezt a mérést rendszerint csak a vizsgálat kezdetén és végén kell elvégezni. Specifikus kémiai elemzés is használható a vizsgált anyag elsődleges lebomlásának kiértékelésére és a képződött valamennyi közbenső anyag koncentrációjának meghatározására (kötelező a MITI-vizsgálatban).

A vizsgálat általában 28 napig tart. Azonban a vizsgálat befejezhető a 28. nap előtt, ha a biodegradációs görbe elért egy platót legalább három meghatározás során. A vizsgálatok 28 napon túlra is meghosszabbíthatók, amikor a biodegradációs görbe azt mutatja, hogy a biológiai lebomlás elkezdődött, de a plató (a vízszintes szakasz) elérése a 28. napig nem történt meg.

I.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

I.5.1. **Reprodukálhatóság**

A biológiai lebomlás természete és az inokulumként használt baktériumpopulációk sokfélesége miatt a meghatározásokat legalább kétszer kell végrehajtani.

Általános tapasztalat, hogy minél nagyobb a vizsgált oldószerhez kezdetben hozzáadott mikroorganizmusok koncentrációja, annál kisebb lesz az ismétlések közötti eltérés (szórás). A körvizsgálatok azt is bemutatták, hogy nagy eltérések lehetnek a különböző laboratóriumok által nyert eredmények között, de általában megegyezés tapasztalható a biológiailag könnyen lebontható vegyületeknél.

I.5.2. **A vizsgálat érvényessége**

A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha a vizsgálat végén vagy a „tíznapos ablak” végén, az adott esettől függően, a platónál a vizsgált kémiai anyag eltávolításakor a vizsgálat megismétlésével kapott értékek szélső értékeinek különbsége kisebb mint 20 %, és ha a referenciaanyag százalékos lebomlása 14 nap alatt elérte a könnyű biológiai lebonthatóság szintjét. Ha ezek közül a feltételek közül valamelyik nem teljesül, meg kell ismételni a vizsgálatot. A módszerek szigorúsága miatt az alacsony értékek nem jelentik szükségképpen azt, hogy a vizsgált anyag biológiailag nem lebontható a környezeti feltételek mellett, hanem azt jelzi, hogy további vizsgálatokra lesz szükség a biológiai lebonthatóság meghatározására.

Ha valamely toxicitási vizsgálatban, amely mind a vizsgált anyagot, mind a referenciaanyagot tartalmazza, 35 %-nál kisebb lebomlás (a DOC alapján) vagy 25 %-nál kisebb lebomlás (a ThOD vagy $ThCO_2$ alapján) történt 14 nap alatt, a vizsgált kémiai anyagról feltételezhető, hogy annak gátló hatásai vannak (lásd a 4. függeléket is). A vizsgálatsorozatot meg kell ismételni, ha lehetséges, a vizsgált kémiai anyag kisebb koncentrációja és/vagy az inokulum nagyobb koncentrációja, de 30 mg szilárd anyag/liternél nem nagyobb koncentráció használatával.

I.6. ÁLTALÁNOS ELJÁRÁSOK ÉS ELŐKÉSZÜLETEK

A 2. táblázat foglalja össze a vizsgálatokra érvényes általános körülményeket. A kifejezetten az egyes vizsgálatokhoz tartozó készülékek és egyéb kísérleti körülmények leírása később, az adott vizsgálathoz tartozó címszó alatt olvasható.

▼B

2. táblázat:

Vizsgálati körülmények

Vizsgálat	DOC-csökkenés	CO_2-fejlődés	Manometrikus respirometria	Módositottt OECD-vizsgálat	Zárt palack	MITI (I)
A vizsgálat anyag koncentracioja						
mg/l			100		2-10	100
mg DOC/1	10-40	10-20		10-40		
MG ThOD/1			50-100		5-10	
Az inoklum koncentrációja (sejt/l, megközelítő érték	≤ 30 mg/l SS vagy ≤ 100 ml kifolyó szennyvíz/liter (10^7 – 10^8)			0,5 ml másodlagos szennyvíz/l (10^5)	≤ 5 ml kifolyó szennyvíz/l (10^4 – 10^6)	30 mg/l SS (10^7 - 10^8)
Elemek koncentrációja ásványi oldószerben (mg/l-ben)						
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					Lehetőleg 7,0
Hőmérséklett	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = Dissolved organic Carbon (oldott szerves szén)

ThoD = Theoretical Oxygen Demand (elméleti oxigénigény)

SS = Suspended Solids (Szuszpendált szilárd anyagok)

I.6.1. **Hígítóvíz**

Toxikus anyagok (például Cu^{++} ionok) gátló hatással járó koncentrációitól mentes ioncserélt vagy desztillált vizet kell használni. E víznek nem szabad a vizsgált anyag által bevitt szerves széntartalom 10 %-ánál többet tartalmaznia. A vizsgált víz nagy tisztaságára a nagy vakpróbaértékek kiküszöböléséhez van szükség. A szennyeződés származhat a saját szennyeződésekből, valamint az ioncserélő műgyantákból és a baktériumból vagy algából származó roncsolt anyagból is. Minden egyes vizsgálatsorozathoz csak egyetlen adag vizet kell használni, amelyet előzőleg DOC-elemzéssel kell ellenőrizni. Ilyen ellenőrzésre nincs szükség a zárt palack vizsgálathoz, de a víz oxigénfogyasztásának alacsonynak kell lennie.

▼B

I.6.2. **Az ásványianyag-tápoldat törzsoldatai**

A vizsgált oldatok elkészítéséhez megfelelő koncentrációjú ásványianyag-tápoldatokat tartalmazó törzsoldatokat kell készíteni. A következő törzsoldatok használhatók (különböző hígítási arányokkal) a DOC-csökkenés, a módosított OECD, a CO_2-fejlődési, a manometrikus respirometriás és a zártpalackos vizsgálati módszerekhez.

A hígítási arányok és a MITI-vizsgálat során alkalmazandó ásványianyag-tápoldat elkészítése az adott vizsgálatok leírásában olvasható.

Törzsoldatok:

A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai tisztaságú reagensek segítségével.

a)	Kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4	8,50g
	Dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4	21,75g
	Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, $Na_2HPO_4 . 2 H_2O$	33,40g
	Ammónium-klorid, NH_4Cl	0,50g
	Ezen anyagokat fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre. Az oldat pH-jának 7,4-nek kell lennie.	
b)	Kalcium-klorid, vízmentes, $CaCl_2$	27,50g
	or vagy kalcium-klorid-dihidrát, $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	36,40g
	Ezen anyagokat fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	
c)	Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4 . 7 H_2O$	22,50g
	Ezt az anyagot fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	
d)	Vas(III)-klorid-hexahidrát, $FeCl_3 . 6H_2O$	0,25g
	Ezt az anyagot fel kell oldani vízben, és kiegészíteni 1 literre.	

Megjegyzés: azért, hogy ne kelljen közvetlenül a használat előtt előkészíteni ezen oldatot, hozzá kell adni literenként egy csepp tömény HCl-ot vagy 0,4 gramm etilén-diamin-tetra-ecetsav-dinátrium-sót (EDTA).

I.6.3. **Kémiai anyagok törzsoldatai**

Ha az oldhatóság túllépi az 1 g/litert, akkor fel kell oldani szükség szerint 1–10 gramm vizsgált vagy referenciaanyagot ioncserélt vízben, és ezt ki kell egészíteni 1 literre. Egyébként a törzsoldatokat ásványianyag-tápoldatban kell elkészíteni, vagy közvetlenül az ásványianyag-tápoldathoz kell hozzáadni a vizsgált anyagot. A kevésbé oldható kémiai anyagok kezelésének módját a 3. függelék tartalmazza, de a MITI-vizsgálat (C.4-F. módszer) esetében sem oldószereket, sem pedig emulgálószereket nem kell használni.

▼B

I.6.4. **Inokulum**

Az inokulum különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztítóból kifolyt víz (nem klórozott), felszíni víz és talaj, vagy ezek vegyesen. A DOC-csökkenés, a CO_2-fejlődés és a manometrikus respirometriás vizsgálatok esetében, ha eleveniszapot használnak, azt döntően háztartási szennyvizet befogadó szennyvíztisztító telepből vagy egységből kell venni. Más forrásokból származó inokulumokkal kapcsolatban bebizonyosodott, hogy ezek az eredmények nagyobb szórását adják. A módosított OECD- és a zártpalack-vizsgálat esetében több hígított inokulumra van szükség, iszappehely nélkül, és az előnyben részesített forrás a háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telepből vagy egységből származó szennyvíz. A MITI-vizsgálathoz az inokulum több forrásból származik, ezek ismertetése e vizsgálat leírásában olvasható.

I.6.4.1. *Eleveniszapból származó inokulum*

Az eleveniszap-mintát frissen kell összegyűjteni valamely, döntő részben háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység levegőztetőtartályából. Ha szükséges, el kell távolítani a durva részecskéket azáltal, hogy finom szűrőn keresztül szűrik át a vizsgált mintát, ezután aerob módon kell tárolni az iszapot.

Másik szóba jöhető megoldás: a durva részecskék eltávolítása után az iszapot ülepíteni vagy centrifugálni kell (például 1 100 g mellett 10 percen át). A felülúszó folyadékot el kell távolítani. Az iszap mosható ásványianyag-tápoldatban. A koncentrált iszapot az ásványianyag-tápoldatban kell szuszpendáltatni, a 3–5 gramm szuszpendált szilárd anyag/liter koncentráció elérése érdekében, majd levegőztetni kell, amíg szükséges.

Az iszapot megfelelően működő hagyományos üzemből kell venni. Ha az iszapot nagysebességű szennyvíztisztító telepről kell begyűjteni, vagy az vélhetően tartalmaz gátlószereket, mosni kell az iszapot. Alapos keverés után le kell ülepíteni vagy centrifugálni kell az újraszuszpendált iszapot, el kell távolítani a felülúszó folyadékot, és újra kell szuszpendáltatni a mosott iszapot további ásványianyag-tápoldatban. Ezt az eljárást addig kell ismételni, amíg az iszap többlet szubsztráttól vagy gátlószertől mentesnek nem tekinthető.

A teljes újraszuszpendálódás elérése után, vagy nem kezelt iszap esetében közvetlenül a használat előtt kell mintát venni a szuszpendált szilárd részecskék száraz tömegének meghatározására.

További alternatíva az eleveniszap homogenizálása (3–5 gramm szuszpendált szilárd anyag/liter). Az iszapot mechanikus keverőgépben 2 percen át közepes fordulatszámmal kell keverni. Le kell ülepíteni a megkevert iszapot 30 percig, vagy ha szükséges, hosszabb ideig, és le kell szűrni a folyadékot 10 ml/l ásványianyag-tápoldatot tartalmazó inokulumként való használatra.

I.6.4.2. *Egyéb inokulumforrások*

E források döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos kezelt szennyvízéből származhatnak. Friss mintákat kell gyűjteni, és azokat levegővel érintkezve tartani a szállítás során. A mintákat 1 órán át kell ülepedni hagyni, vagy durva szűrőpapíron át kell szűrni, a leszűrt kezelt szennyvizet vagy filtrátumot levegővel érintkezve kell tartani. Ásványianyag-tápoldat literenként legfeljebb 100 ml ilyen típusú inokulum használható.

▼B

További inokulumforrás a felszíni víz. Ebben az esetben megfelelő felszíni vízmintát kell begyűjteni, például folyóból, tóból, és a felhasználásig levegővel érintkezve kell tartani. Ha szükséges, az inokulumot szűréssel vagy centrifugálással lehet sűríteni.

I.6.5. **Az inokulum előkondicionálása**

Az inokulum előkondícionálható a kísérleti körülményekhez, de nem adaptálható előre a vizsgált anyaghoz. Az előkondicionálás az eleveniszapnak ásványianyag-tápoldatban vagy másodlagos szennyvízben 5–7 napon keresztüli, a vizsgálati hőmérsékleten végrehajtott levegőztetéséből áll. Az előkondicionálás esetenként javítja a vizsgálati módszerek pontosságát a vakpróba értékek csökkentésével. Szükségtelennek tekinthető a MITI-inokulum előkondicionálása.

I.6.6. **Abiotikus kontrollok**

Amikor szükséges, ellenőrizni kell a vizsgált anyag esetleges abiotikus lebomlását inokulumot nem tartalmazó, steril kontrollokban a DOC-csökkenés, oxigénfelvétel vagy szén-dioxid-fejlődés meghatározásával. A sterilizáció membránszűrés útján (0,2 – 0,45 mikrométer) vagy megfelelő koncentrációjú, alkalmas toxikus anyag hozzáadásával történik. Ha membránszűrést alkalmaznak, aszeptikusan kell mintákat venni a steril körülmények megőrzése érdekében. Ha előzőleg még nem zártuk ki a vizsgált anyag adszorpcióját, akkor azon vizsgálatoknak, amelyek a DOC csökkenéseként mérik a biológiai lebomlást, különösen eleveniszap inokulummal, tartalmazniuk kell beoltott és toxikus anyagot tartalmazó abiotikus kontrollt.

I.6.7. **A lombikok száma**

Az egyes vizsgálatsorozatokban használandó lombikok számát az egyes vizsgálatok leírásai ismertetik.

A következő típusú lombikokat kell használni:

— vizsgált szuszpenzió: vizsgált anyagot és inokulumot tartalmaz,

— inokulum-vakpróba: csak inokulumot tartalmaz,

— eljáráskontroll: referenciaanyagot és inokulumot tartalmaz,

— abiotikus steril kontroll: steril, csak vizsgált anyagot tartalmaz (lásd az I.6.6. pontot),

— adszorpciós kontroll: vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizáló szert tartalmaz,

— toxicitáskontroll: vizsgált anyagot, referenciaanyagot és inokulumot tartalmaz.

A vizsgált szuszpenzióban és az inokulum-vakpróbában a meghatározásnak feltétlenül egyidejűleg kell történnie. A többi lombikban is ajánlott egyidejűleg elvégezni a meghatározásokat.

Ez azonban nem mindig lehetséges. Gondoskodni kell arról, hogy elegendő minta vagy mért érték álljon rendelkezésre a „tíznapos ablakban” a százalékos csökkenés kiértékelésének lehetővé tételére.

▼B

I.7. ADATOK ÉS KIÉRTÉKELÉS

A D_t (százalékos lebomlás) számításához mind a vizsgálati tartályokban, mind az inokulum-vakpróbában a paraméter kétszeri mérésének átlagát kell használni. A képleteket a későbbiekben ismertetett, az egyes vizsgálatokkal foglalkozó szakaszok tartalmazzák. A lebomlás folyamata grafikus ábrázolásban látható, és bemutatásra kerül a „tíznapos ablak". Ki kell számítani és megadni a jelentésben a „tíznapos ablak" végén, a platónál vagy a vizsgálat végén elért százalékos csökkenés mértékét, az adott esetnek megfelelően.

A respirometriás vizsgálatokban a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció miatt hatással lehetnek az oxigénfelvételre (lásd a 2. és 5. függeléket).

I.7.1. **DOC-meghatározás segítségével mért lebomlás**

A D_t százalékos lebomlást minden alkalommal, amikor mintavétel történt, külön kell kiszámítani a vizsgált anyagot tartalmazó lombikokhoz a kettős DOC-mérések átlagértékeit használva, hogy megítélhető legyen a vizsgálat érvényessége (lásd az I.5.2. pontot). A következő egyenlet szolgál ennek kiszámítására:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

ahol:

D_t = százalékos lebomlás a t időpontban,

G_o = a beoltott, a vizsgált anyagot tartalmazó ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk kezdeti átlagértéke (mg DOC/l),

C_t = a beoltott, a vizsgált anyagot tartalmazó ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban (mg DOC/l),

C_{bo} = a vakpróba beoltott ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk kezdeti átlagértéke (mg DOC/l),

C_{bt} = a vakpróba beoltott ásványianyag-tápoldatban a DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban (mg DOC/1).

Minden koncentráció mérése kísérleti úton történik.

I.7.2. **Specifikus analízis segítségével mért lebomlás**

Amikor rendelkezésre állnak specifikus analitikai adatok, a következő képletből lehet kiszámítani az elsődleges biológiai lebomlást:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

ahol:

D_t = % lebomlás t időpontban, általában a 28. napon,

S_a = a vizsgált anyag maradékmennyisége a vizsgálat végén a beoltott közegben, (mg),

S_b = a vizsgált anyag maradékmennyisége a vakpróbában olyan vízzel/táptalajjal végrehajtott vizsgálat után, amelyhez csak a vizsgált anyagot adtuk hozzá (mg).

▼B

I.7.3. **Abiotikus lebomlás**

Abiotikus steril kontroll használatakor a következő képlet segítségével kell kiszámítani a százalékos abiotikus bomlást.

$$\% \text{ abiotikus bomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

ahol:

$C_{s(o)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a 0. napon

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a t-dik napon

I.8. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— a vizsgált és referenciaanyagokat és azok tisztaságát,

— a vizsgálati körülményeket,

— az inokulumot: minősége és a mintavétel helyszíne(i), koncentrációja és minden előkondícionáló kezelés,

— a szennyvízben jelen lévő ipari hulladék arányát és minőségét, ha ismert,

— a vizsgálati időtartamot és hőmérsékletet,

— rosszul oldható vizsgált anyagok esetében a végrehajtott kezelést,

— az alkalmazott vizsgálati módszert: az eljárás minden változtatását tudományosan meg kell indokolni,

— az adatlapot,

— minden megfigyelt gátlási jelenséget,

— minden megfigyelt abiotikus lebomlást,

— specifikus analitikai adatokat, ha rendelkezésre állnak,

— köztes anyagok analitikai adatait, ha rendelkezésre állnak,

— a százalékos lebomlásnak az idő függvényében ábrázolt görbéjét a vizsgált és referenciaanyagokhoz elkészítve; a lappangási fázist, lebomlási fázist, tíznapos ablakot és a meredekséget világosan jelezni kell (1. függelék). Ha a vizsgálat megfelelt az érvényességi követelményeknek, a vizsgált anyagot tartalmazó lombikok lebomlási százalékainak átlagértéke használható a görbe elkészítéséhez,

— a százalékos csökkenést a „tíznapos ablak” után és a platón vagy a vizsgálat végén.

II. RÉSZ **DOC (OLDOTT SZERVES SZÉN) CSÖKKENÉSÉNEK VIZSGÁLATA (**C.4-A. Módszer)

II.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Egyetlen szervesszén-forrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–40 mg DOC/l) tartalmazó, beoltott ásványianyag-tápoldat mért mennyiségét sötétben vagy szórt fényben 22 ± 2 °C hőmérsékleten kell levegőztetni.

▼B

A lebomlást 28 napos időtartam során gyakori időközönként végrehajtott DOC-elemzés követi. A biológiai lebomlás mértékét a DOC-koncentrációjának csökkenéséből (az inokulum-vakpróba figyelembevételével) a kezdetben jelen lévő koncentráció százalékában kell kiszámítani. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő kémiai analízisből is kiszámítható.

II.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

II.2.1. **Készülék**

a) Kúpos lombikok, például 250 ml-től 2 l-ig, a DOC-analízishez szükséges térfogattól függően;

b) kúpos lombikok fogadására alkalmas rázógép, amelyet vagy termosztáttal kell felszerelni, vagy klimatizált helyiségben kell használni; követelmény, hogy az aerob állapotok minden lombikban fenntarthatók legyenek;

c) szűrőkészülék, alkalmas membránokkal;

d) DOC-analizátor;

e) oldott oxigén meghatározására szolgáló készülék;

f) centrifuga.

II.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

II.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztítóból kifolyt víz, felszíni víz és talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

II.2.4. **A lombikok előkészítése**

Példa: 800 ml-es adagokban 2 literes kúpos lombikokba ásványianyag-tápoldatot kell bevinni, ezekhez a vizsgált és referenciaoldatok törzsoldataiból elegendő mennyiséget kell hozzáadni úgy, hogy 10–40 mg DOC/l-rel egyenlő koncentrációt kapjanak. A pH-értéket ellenőrizni kell, és ha szükséges, 7,4-re kell beállítani. A lombikokat eleveniszappal vagy más forrásból származó inokulummal kell beoltani (lásd az I.6.4. pontot) úgy, hogy 30 mg szuszpendált szilárd anyag/liternél nem nagyobb végleges koncentrációt kapjanak. Ezenkívül inokulumkontrollokat kell készíteni ásványianyag-tápoldatban, vizsgált vagy referenciaanyagok nélkül.

Ha szükséges, használni lehet egy tartályt a vizsgált anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére olyan oldat oltásával, amely az ásványianyag-tápoldatban, mind a vizsgált, mind valamely referenciaanyag hasonló koncentrációit tartalmazza.

Ezenkívül, ha szükséges, egy további, steril lombik is alkalmazható az anyag nem beoltott oldatának segítségével annak ellenőrzésére, hogy lebomlott-e abiotikusan a vizsgált anyag (lásd az I.6.6. pontot).

▼B

Ha a vizsgált anyagról gyanítható, hogy jelentős mértékben adszorbeálódik az üvegen, iszapban stb., akkor előzetes vizsgálatot kell végezni az adszorpció valószínű mértékének és a kísérlet alkalmasságának meghatározására (lásd az 1. táblázatot). Elő kell készíteni egy, a vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizálószert tartalmazó lombikot.

Minden lombikban ki kell pótolni a térfogatot 1 literre ásványianyag-tápoldattal, és keverés után mintát kell venni mindegyikből a DOC kezdeti koncentrációjának meghatározására (lásd a 2. függelék 4. pontját). Le kell fedni a lombikok nyílását például alufóliával úgy, hogy szabad légcsere jöhessen létre a lombik és a környezete között. Ezután a lombikokat rázógépbe kell helyezni, és el kell kezdeni a vizsgálatot.

II.2.5. **Lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: adszorpciós kontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

II.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

A kísérlet során mindvégig kétszer kell meghatározni a DOC koncentrációit minden egyes lombikban olyan ismert időközönként, amely elegendően gyakori meghatározást biztosít ahhoz, hogy megállapítható legyen a „tíznapos ablak” kezdete és a százalékos csökkenés a „tíznapos ablak” végén. A vizsgált szuszpenzióból csak az egyes meghatározásokhoz szükséges minimális mennyiséget kell kivenni.

Mintavétel előtt, ha szükséges, a lombikokban pótolni kell az elpárolgott veszteséget, megfelelő mennyiségű hígítóvíz (I.6.1.) hozzáadásával. Az ásványianyag-tápoldatot alaposan meg kell keverni a mintavétel előtt, és gondoskodni kell arról, hogy a tartályok falához hozzátapadt anyag mintavétel előtt feloldódjon vagy szuszpendálódjon. Közvetlenül a mintavétel végrehajtása után szűrésre van szükség membránszűrővel vagy centrifugálással (lásd a 2. függelék 4. pontját). A szűrt vagy centrifugált mintákat még ugyanazon a napon kell analizálni, ellenkező esetben 2–4 °C hőmérsékleten kell tárolni maximum 48 órán át vagy –18 °C alatti hőmérsékleten hosszabb időtartamig.

II.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

II.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Ki kell számítani a százalékos lebomlást a t időpontban az 1.7.1. (DOC-meghatározás), és választható módon az 1.7.2. (specifikus analízis) pontban megadottaknak megfelelően.

Minden eredményt fel kell jegyezni a megadott adatlapokon.

▼B

II.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Lásd az I.5.2. pontot.

II.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

II.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

DOC-CSÖKKENÉS VIZSGÁLATA

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a közegben, t_0: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. **SZÉNANALÍZIS**

Szénanalizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgált kémiai anyag + inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, átlag $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, átlag $C_{b(t)}$					

▼B

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vakpróba-inokulum vizsgált anyag nélkül	3	c_1					
		c_2					
		c, átlag $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, átlag $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ALAPADATOK KIÉRTÉKELÉSE**

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős eltérés van közöttük.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

7. **ABIOTIKUS KONTROLL** (választható)

	Idő (nap)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

	A vizsgált kémiaianyag-maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Steril kontroll	S_b	

▼B

	A vizsgált kémiaianyag-maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Beoltott vizsgált közeg	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III. RÉSZ **MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT (DOC-CSÖKKENÉS)** (C.4-B. Módszer)

III.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Egyetlen szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–40 mg DOC/l) tartalmazó beoltott ásványi oldószer mért mennyiségét sötétben vagy szórt fényben 22 ± 2 °C hőmérsékleten kell levegőztetni.

A lebomlást egy 28 napos időtartam során gyakori időközönként végrehajtott DOC-elemzés követi. A biológiai lebomlás mértékét a DOC koncentrációjának csökkenéséből, (az inokulum-vakpróba figyelembevételével) a kezdetben jelen lévő koncentráció százalékában kell kiszámítani. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő kémiai analízisből is kiszámítható.

III.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

III.2.1. Készülék

a) Kúpos lombikok, például 250 ml-től 2 l-ig, a DOC-analízishez szükséges térfogattól függően;

b) rázógép a kúpos lombikok behelyezésére, amelyet vagy termosztáttal kell felszerelni, vagy klimatizált helyiségben kell használni, követelmény, hogy az aerob állapotok minden lombikban fenntarthatók legyenek;

c) szűrőkészülék, alkalmas membránokkal;

d) DOC-analizátor;

e) oldott oxigén meghatározására szolgáló készülék;

f) centrifuga.

III.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

E módszer literenként csak 0,5 ml kezelt szennyvizet használ inokulumként, ezért lehetséges, hogy meg kell erősíteni a közeget nyomelemekkel és növekedési faktorokkal. Ez a következő oldatok mindegyikéből 1 ml hozzáadásával történik 1 liter végső közeghez:

▼B

Nyomelemoldat:

Mangán-szulfát-tetrahidrát, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Borsav, H_3BO_3	57,2 mg
Cink-szulfát-heptahidrát, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Ammónium-heptamolibdát $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Fe-keLát ($FeC1_3$ etiléndiamin-tetra-ecetsav)	100,0 mg
Ezen anyagokat fel kell oldani, és kipótolni 1 000 ml-re hígítóvízzel	
Vitaminoldat:	
Élesztőkivonat	15,0 mg

Az élesztőkivonatot fel kell oldani 100 ml vízben. Sterilizálni kell 0,2 mikrométer pórusméretű membránon keresztülvezetve, vagy frissen kell elkészíteni.

III.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos, kezelt szennyvízéből származik. Lásd az I.6.4.2. és az I.6.5. pontot.

A felhasznált mennyiség 0,5 ml/liter ásványianyag-tápoldat.

III.2.4. **A lombikok előkészítése**

Példa: 800 ml-es adagokban 2 literes kúpos lombikokba ásványianyag-tápoldatot kell bevinni, ezekhez a vizsgált- és referenciaoldatok törzsoldataiból elegendő mennyiséget kell hozzáadni úgy, hogy 10–40 mg DOC/l-rel egyenlő koncentrációt kapjanak. Ellenőrizni kell a pH-értéket, és ha szükséges, 7,4-re kell beállítani. A lombikokat kezelt szennyvízzel kell beoltani (lásd az I.6.4.2. pontot) 0,5 ml/l koncentráció mellett.

Ezenkívül inokulumkontrollokat kell készíteni ásványianyag-tápoldatban, vizsgált- vagy referenciaanyagok nélkül.

Ha szükséges, használni lehet egy tartályt a vizsgált kémiai anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére olyan oldat oltásával, amely az ásványi közegben, mind a vizsgált, mind valamely referenciaanyag hasonló koncentrációit tartalmazza. Ezenkívül, ha szükséges, egy további, steril lombik is alkalmazható az anyag nem beoltott oldatának segítségével annak ellenőrzésére, hogy lebomlott-e abiotikusan a vizsgált anyag (lásd az I.6.6. pontot).

Ha a vizsgált anyagról gyanítható, hogy jelentős mértékben adszorbeálódik az üvegen, iszapban stb., akkor előzetes vizsgálatot kell végezni az adszorpció valószínű mértékének és a kísérlet alkalmasságának meghatározására (lásd az 1. táblázatot). Elő kell készíteni egy, a vizsgált anyagot, inokulumot és sterilizálószert tartalmazó lombikot.

Minden lombikban ki kell pótolni a térfogatot 1 literre ásványianyag-tápoldattal, és a keverés után mintát kell venni minden egyes lombikból a DOC kezdeti koncentrációjának meghatározására (lásd a 2. függelék 4. pontját). Le kell fedni a lombikok nyílását például alufóliával úgy, hogy szabad légcsere jöhessen létre a lombik és a környezete között. Ezután a lombikokat rázógépbe kell helyezni, és el kell kezdeni a vizsgálatot.

▼B

III.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: adszorpciós kontroll

8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

III.2.6. **A vizsgálat végrehajtása**

A vizsgálat során mindvégig kétszer kell meghatározni a DOC koncentrációit minden egyes lombikban olyan ismert időközönként, amely elegendően gyakori meghatározást biztosít ahhoz, hogy megállapítható legyen a „tíznapos ablak" kezdete és a százalékos csökkenés a „tíznapos ablak" végén. A vizsgált szuszpenzióból csak az egyes meghatározásokhoz szükséges minimális mennyiséget kell kivenni.

Mintavétel előtt, ha szükséges, a lombikokban pótolni kell az elpárolgott veszteséget megfelelő mennyiségű hígítóvíz (1.6.1.) hozzáadásával. Az ásványianyag-tápoldatot alaposan meg kell keverni a mintavétel előtt, és gondoskodni kell arról, hogy a tartályok falához hozzátapadt anyag mintavétel előtt feloldódjon vagy szuszpendálódjon. Közvetlenül a mintavétel végrehajtása után szűrésre van szükség membránszűrővel vagy centrifugálással (lásd a 2. függelék 4. pontját). A szűrt vagy centrifugált mintákat még ugyanazon a napon kell analizálni, ellenkező esetben 2–4 ºC hőmérsékleten kell azt tárolni maximum 48 órán át vagy –18 ºC alatti hőmérsékleten hosszabb időtartamig.

III.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

III.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Ki kell számítani a százalékos lebomlást a t időpontban az I.7.1. (DOC meghatározás), és választható módon az I.7.2. (specifikus analízis) pontban megadottaknak megfelelően.

Minden eredményt fel kell jegyezni a megadott adatlapokon.

III.3.2. Az eredmények érvényessége

Lásd az I.5.2. pontot.

III.3.3. Vizsgálati jelentés

Lásd az I.8. pontot.

III.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

MÓDOSÍTOTT OECD-VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

▼B

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a médiumban: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. SZÉNANALÍZIS

Szénanalizátor:

	Lombik száma		DOC n nap után (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgált kémiai anyag + inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, átlag $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, átlag $C_{b(t)}$					
Vakpróba-inokulum vizsgált anyag nélkül	3	c_1					
		c_2					
		c, átlag $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, átlag $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **ALAPADATOK KIÉRTÉKELÉSE**

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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

Lombik száma		% lebomlás n nap után				
		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				
Átlag (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős eltérés van közöttük.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

7. **ABIOTIKUS KONTROLL** (választható)

	Idő (nap)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) steril kontrollban	$C_{s(o)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

	A vizsgált kémiaianyag-maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás
Steril kontroll	S_b	
Beoltott vizsgált közeg	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV. RÉSZ CO_2-FEJLŐDÉS-VIZSGÁLAT (C.4-C. módszer)

IV.l. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Kizárólagos szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (10–20 mg DOC vagy TOC/l) tartalmazó, definiált térfogatú beoltott ásványianyag-tápoldatot szabályozott átfolyási sebesség mellett, szén-dioxid-mentes levegő átvezetésével, sötétben vagy szórt fényben levegőztetni kell. A lebomlást 28 napon át kell követni a termelt szén-dioxid meghatározásával, amelyet bárium- vagy nátrium-hidroxidban kell elnyeletni, és amelyet a maradék hidroxid titrálásával vagy szervetlen szénként kell mérni. A vizsgált anyagból előállított szén-dioxid-mennyiséget (a vakpróba-inokulumból származó mennyiség figyelembevételével helyesbítve) a $ThCO_2$ százalékaként kell kifejezni. A biológiai lebomlás mértéke az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő DOC-analízisből is kiszámítható.

▼B

IV.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

IV.2.1. **Készülék**

a) 2–5 literes lombikok, mindegyik egy, csaknem a tartály aljáig érő levegőztető csővel, és egy kivezető nyílással ellátva;

b) mágneses keverők, a rosszul oldódó kémiai anyagok kiértékelésekor;

c) gázabszorpciós üvegek;

d) a légáram szabályozására és mérésére szolgáló készülék;

e) szén-dioxid kivonására alkalmas berendezés a szén-dioxid-mentes levegő elkészítéséhez; más lehetőségként gázpalackokból származó CO_2-mentes oxigén és CO_2-mentes nitrogén keveréke használható a megfelelő arányokban (20 % O_2: 80 % N_2);

f) készülék a szén-dioxid meghatározására, vagy titrimetriás méréshez vagy szervetlenszén-analízishez;

g) membránszűrő készülék (választható);

h) DOC-analizátor.

IV.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

IV.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különböző forrásokból szerezhető be: lehet eleveniszap; kezelt szennyvíz; felszíni víz; talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

IV.2.4. **A lombikok előkészítése**

A következő térfogatok és tömegek jelzik a 3 liter szuszpenziót tartalmazó 5 literes lombikokhoz tartozó értékeket. Ennél kisebb térfogatú lombikok használatakor megfelelően módosítani kell az értékeket, de gondoskodni kell arról, hogy pontosan mérhető legyen a fejlődött szén-dioxid.

Minden egyes 5 literes lombikba önteni kell 2 400 ml ásványianyag-tápoldatot. Hozzá kell adni megfelelő mennyiségű előkészített eleveniszapot (lásd az I.6.4.1. és I.6.5. pontot) úgy, hogy a végleges 3 literes beoltott keverékben 30 mg/l-nél nem nagyobb szuszpendált szilárdanyag-koncentrációt kapjanak. Más megoldás: először hígítani kell az előkészített iszapot úgy, hogy 500–1 000 mg/l szuszpenziót kapjanak az ásványianyag-tápoldatban, mielőtt hozzáadnánk egy aliquot részt az 5 literes lombik tartalmához a 30 mg/l-es koncentráció elérésére; ez utóbbi eljárás nagyobb pontosságot biztosít. Használhatók más inokulumforrások is (lásd az 1.6.4.2. pontot).

A szén-dioxidnak a rendszerből történő eltávolítása érdekében a beoltott keverékeket CO_2-mentes levegővel kell levegőztetni egy éjszakán át.

▼B

Az ismételt vizsgálatokhoz alkalmazandó lombikokhoz a vizsgált anyagot és a referenciaanyagot külön-külön kell hozzáadni, ismert töménységű törzsoldatok formájában, úgy, hogy a hozzáadott anyagokkal együtt 10–20 mg DOC vagy TOC/l-koncentrációkat kapjanak; néhány lombikhoz nem adnak hozzá kémiai anyagot, hanem meghagyják azokat inokulumkontrollnak. A rosszul oldódó vizsgált anyagokat közvetlenül kell a lombikokba bevinni tömeg vagy térfogat alapján, vagy azokat a 3. függelékben ismertetett módon kell kezelni.

Ha szükséges, használható egy lombik a vizsgált kémiai anyag esetleges gátló hatásának ellenőrzésére, e lombikba mind a vizsgált, mind a referenciaanyagokat ugyanolyan koncentrációkban kell bevinni, mint ahogy azok a többi lombikban jelen vannak.

Ezenkívül, ha szükséges, egy steril lombik használható annak ellenőrzésére, hogy lebomlik-e abiotikusan a vizsgált kémiai anyag; ehhez az anyag nem beoltott oldatát kell használni (lásd az I.6.6 pontot). A sterilizáció megfelelő koncentrációjú toxikus anyag hozzáadásával történik.

Mindhárom lombikban ki kell egészíteni a szuszpenzió térfogatát 3 literre előzőleg CO_2-mentes levegővel levegőztetett ásványianyag-tápoldat hozzáadásával. Tetszés szerint minták vehetők DOC-analízishez (lásd a 2. függelék 4. pontját) és/vagy a specifikus analízishez. Az abszorpciós üvegeket a lombikok levegőkivezető nyílásához kell csatlakoztatni.

Ha bárium-hidroxidot használnak, három abszorpciós üveget kell sorba csatlakoztatni, amelyek közül mindegyik 100 ml 0,0125 M bárium-hidroxid-oldatot tartalmaz, minden egyes 5 literes lombikhoz. Az oldatnak kicsapódott szulfáttól és karbonáttól mentesnek kell lennie, és közvetlenül a használat előtt meg kell határozni a koncentrációját. Ha nátrium-hidroxidot használnak, csatlakoztatni kell két abszorpciós csapdát, amelyek közül a második ellenőrzésre szolgál annak bemutatására, hogy minden szén-dioxid abszorbeálásra került az elsőben. A szérumos üvegekéhez hasonló záróelemmel ellátott üvegek alkalmasak e célra. Mindkét üvegbe 200 ml 0,05 M nátrium-hidroxidot kell bevinni, amely elegendő a vizsgált anyag teljes lebomlásakor fejlődő teljes szén-dioxid mennyiségének abszorbeálására. A nátrium-hidroxid-oldat, még ha frissen elkészített is, nyomokban tartalmazni fog karbonátokat; ezt a vakpróbában lévő karbonátmennyiség levonásával korrigálni kell.

IV.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot is.

IV.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

A kísérlet kezdetén CO_2-mentes levegőt kell belevezetni a szuszpenziót tartalmazó tartályokba 30–100 ml/perc átfolyási sebesség mellett. Szabályos időközönként mintákat kell venni a szén-dioxid-abszorbensből a CO_2-tartalom elemzésére. Az első 10 nap során ajánlatos az elemzéseket minden második vagy harmadik napon elvégezni, és ezután minden 5. napon a 28. napig azért, hogy meghatározható legyen a „tíznapos ablak”.

▼B

A 28. napon mintákat kell venni (tetszés szerint) a DOC- és/vagy a specifikus analízis céljából, meg kell mérni a szuszpenzió pH-ját, és bele kell tenni 1 ml tömény sósavat minden egyes lombikba; a lombikokat egész éjszakán át a vizsgált szuszpenziókban jelen lévő szén-dioxid eltávolítása érdekében szellőztetni kell. A 29. napon kell végrehajtani a fejlődött szén-dioxid utolsó elemzését.

A CO_2-mérések napjain el kell választani a lombikhoz legközelebbi bárium-hidroxid abszorbciós üveget, és titrálni kell a hidroxid-oldatot 0,05 M HCl-dal, indikátorként fenolftaleint használva. A többi abszorbciós üveget eggyel közelebb kell tenni a lombikhoz, és el kell helyezni egy új, 100 ml friss 0,0125 M bárium-hidroxidot tartalmazó abszorbciós üveget a sor legtávolabbi végére. Titrálást kell végezni szükség szerint, például amikor jelentős csapadékképződés látható az első abszorpciós üvegben, és mielőtt ennek bármilyen bizonyítéka lenne látható a második üvegen, vagy legalább hetente. Más megoldásként, abszorbensként NaOH-t használva, fecskendővel kis térfogatú nátrium-hidroxid-oldat-mintát kell venni (az elemzéshez használt szénanalizátor jellemzőitől függően) a lombikhoz legközelebbi abszorbciós üvegből. A mintát be kell fecskendezni a szénelemző készülék IC-részébe a fejlődött szén-dioxid közvetlen elemzéséhez.

A második abszorpciós csapda tartalmát csak a vizsgálat végén kell elemezni az összes szén-dioxid-átvitel figyelemb evételével.

IV.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

IV.3.1. **Eredmények kiértékelése**

A titráláskor az abszorberben megkötődött CO_2-mennyiséget a következő összefüggés adja meg:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

ahol:

V = az abszorberben a 100 ml titrálásához használt HCl térfogata (ml),

C_B = bárium-hidroxid-oldat koncentrációja (M),

C_A = a sósavoldat koncentrációja (M),

ha a C_B értéke 0,0125 M és a C_A értéke 0,05 M, 100 ml bárium-hidroxid esetében a titráláshoz felhasznált térfogat 50 ml, és a CO_2 tömegét a következő összefüggés adja meg:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{titráláshoz használt HC1} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Így tehát ebben az esetben a titrált HCl-térfogatnak megfelelően a fejlődött CO_2 mennyisége (mg) közötti szorzótényező 1,1.

Ki kell számítani az egyedül az inokulumból és az inokulumból plusz a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 tömegét a megfelelő titrálási értékek segítségével, ezek különbsége a kizárólag a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 mennyisége.

Például, ha kizárólag az inokulum esetében 48 ml kell a titráláshoz és az inokulum plusz vizsgált anyaghoz együttesen 45 ml, akkor

a CO_2 inokulum esetében = 1,1 x (50 – 48) = 2,2 mg

▼B

a CO_2 inokulum plusz vizsgált anyag esetében = 1,1 x (50 – 45) = 5,5 mg

tehát a vizsgált anyagból fejlődött CO_2 mennyisége 3,3 mg.

A százalékos biológiai lebomlás a következő összefüggésből számító ki:

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{fejlődött mg } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg hozzáadott vizsgált anyag}}$$

vagy

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{\text{fejlődött mg } CO_2 \times 100}{\text{vizsgálatban hozzáadott mg TOC} \times 3,67}$$

az átváltási arány 3,67 (44/12) a szén és a szén-dioxid között.

Ki kell számítani a százalékos lebomlást minden egyes időintervallum után a mérés végrehajtásának időpontjáig az egyes napokhoz kiszámított $ThCO_2$ értékek százalékának összeadásával.

Nátrium-hidroxid abszorberek esetében ki kell számítani a fejlődött szén-dioxid-mennyiséget, IC-ben (szervetlen szén) (mg) kifejezve, megszorozva az IC koncentrációját az abszorbensben az abszorbens térfogatával.

A százalékos lebomlást a következő összefüggésből lehet kiszámítani:

$$\% ThCO_2 = \frac{\text{mg IC a vizsgált anyagot tartalmazó lombikból – mg IC a vakpróbából}}{\text{vizsgált anyagként hozzáadott TOC}} \times 100$$

A DOC csökkenését (választható) az I.7. pontban leírtaknak megfelelően lehet kiszámítani. Ezt és minden más eredményt a megadott adatlapokra kell feljegyezni.

IV.3.2. **Eredmények érvényessége**

A vizsgálat kezdetén az ásványianyag-tápoldatban lévő vizsgált anyag szuszpenzió IC-tartalmának a TC 5 %-ánál kevesebbnek kell lennie, és a vizsgálat végén az inokulum-vakpróbában a teljes CO_2-fejlődésnek általában nem szabad 40 mg/l oldószernél nagyobbnak lennie. Ha 70 mg CO_2/l-nél nagyobb értékeket kapnak, alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszert.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

IV.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

IV.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

SZÉN-DIOXID-FEJLŐDÉS-VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

▼B

Kezdeti koncentráció a médiumban: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

A lombik tartalmához hozzáadott szén teljes mennyisége: … mg C

$ThCO_2$: … mg CO_2

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. **SZÉN-DIOXID-FEJLŐDÉS ÉS -LEBONTHATÓSÁG**

Idő (nap)	A vizsgálatban képződött CO_2 (mg)		A vakpróbában képződött CO_2 (mg)		Képződött CO_2 összesen (mg), a vizsgált anyag és a vakpróba különbségeinek átlaga		$\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	átlag	3 / 4	átlag	1	2	1	2	átlag
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Idő (nap)	Vakpróba mg/liter	Vizsgált anyag mg/liter
0	(C_{bo})	(C_o)
28 (*)	(C_{bt})	(C_t)

(*) vagy az inkubációs periódus végén.

▼B

$$\% \text{ DOC csökkenés } = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_o - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS** (választható)

$$\% \text{ abiotikus bomlás } = \frac{CO_2 - \text{fejlődés steril kontrollban 28 nap után [mg]}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

V. RÉSZ **MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS MÉRÉS** (C.4-D. Módszer)

V.l. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Kizárólagos szerves szénforrásként a vizsgált anyag ismert koncentrációját (100 mg/l vizsgált anyag, legalább 50–100 mg ThOD/liter létrehozásához) tartalmazó, mért térfogatú, beoltott ásványianyag-tápoldatot kell keverni zárt lombikban, állandó hőmérsékleten (± 1 °C vagy ennél kisebb eltérés mellett) legfeljebb 28 napig. Meg kell határozni az oxigénfogyasztást vagy a respirométer-palackban az állandó gáztérfogat fenntartásához szükséges (elektrolízis útján előállított) oxigénmennyiség mérésével, vagy a készülékbeli térfogat- vagy nyomásváltozás (vagy a kettő valamilyen kombinációjának) vizsgálatával. A fejlődött szén-dioxidot kálium-hidroxid-oldatban vagy valamilyen más alkalmas abszorbensben nyeletik el. A vizsgált anyag által felvett oxigén (az egyidejűleg vizsgált vakpróba-inokulum által felvett mennyiség figyelembevételével helyesbítve) mennyiségét a ThOD vagy a COD százalékaként kell kifejezni. Tetszés szerint az elsődleges biológiai lebomlás is kiszámítható az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő specifikus elemzésből, és elvégezhető a végső biológiai lebomlás DOC-analízise.

V.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

V.2.1. **Készülék**

a) alkalmas respirométer;

b) termosztát, amely ± 1 °C vagy ennél nagyobb pontossággal képes a hőmérséklet fenntartására;

c) membránszűrő készülék (választható);

d) szénanalizátor (választható).

V.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

10 ml (a) oldatot 800 ml hígítóvízzel kell összekeverni, 1 ml (b)–(d) oldatot kell hozzáadni, majd 1 literre hígítóvízzel kiegészíteni.

V.2.3. **Inokulum előkészítése és előkondicionálása**

Az inokulum különböző forrásokból szerezhető be: lehet eleveniszap; kezelt szennyvíz; felszíni víz; talaj vagy ezek vegyesen.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontot.

V.2.4. **A lombikok előkészítése**

A vizsgált és referenciaanyagból külön lombikokban oldatokat készítenek ásványianyagtápoldatban, a törzsoldatok felhasználásával úgy, hogy az oldatok koncentrációja általában 100 mg anyag/liter legyen, ami legalább 50–100 mg ThOD/liter-értéknek felel meg.

▼B

Ki kell számítani a ThOD-t az ammóniumsók képződése alapján, kivéve ha nitrifikáció várható, ebben az esetben a számításnak a nitrátképződésen (lásd a 2. függelék 2. pontját) kell alapulnia.

A pH-értékeket meg kell határozni, és ha szükséges, be kell állítani azokat 7,4 ± 0,2-re.

A rosszul oldódó anyagok hozzáadására későbbi fázisban kerül sor (lásd alább).

Ha meg kell határozni a vizsgált anyag toxicitását, akkor egy másik oldatot kell elkészíteni ásványianyag-tápoldatban, amely ugyanolyan koncentrációkban tartalmazza mind a vizsgált, mind a referenciaanyagokat, mint az egyes oldatok.

Ha mérni kell a fizikai-kémiai okokra visszavezethető oxigénfelvételt, akkor el kell készíteni általában egy 100 mg ThOD/liter koncentrációjú oldatot, amelyet megfelelő toxikus anyag hozzáadásával sterilizálnak (lásd az I.6.6. pontot).

A szükséges térfogatú vizsgált, illetve referenciaoldatokat legalább két lombikba kell szétosztani. Ezenkívül további lombikokba csak ásványianyag-tápoldatot kell tenni (inokulum kontrollvizsgálathoz), illetve, ha szükséges, az összekevert vizsgált/referenciaoldatot és a steril oldatot.

Ha a vizsgált anyag rosszul oldódik, akkor azt közvetlenül e szakaszban tömeg vagy térfogat alapon kell az edénybe bevinni, vagy a 3. függelékben leírt módon kell azt kezelni. Káliumhidroxidot, nátronmész-pasztillákat vagy más abszorbenseket kell adagolni a CO_2-abszorbciós üvegekbe.

V.2.5. **A lombikok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

1. és 2. lombik: vizsgált szuszpenzió

3. és 4. lombik: inokulum-vakpróba

5. lombik: eljáráskontroll

Ajánlott és amikor szükséges:

6. lombik: abiotikus steril kontroll

7. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az 1.6.7. pontot is.

V.2.6. **A kísérlet végrehajtása**

Miután a lombikok elérték a kívánt hőmérsékletet, azokat be kell oltani a megfelelő előkészített eleveniszappal vagy más inokulumforrással úgy, hogy a kapott szuszpendált szilárd anyag koncentrációja ne legyen 30 mg/l-nél nagyobb. Össze kell szerelni a berendezést, elindítani a keverőt, és ellenőrizni a légmentes záródást, majd meg kell kezdeni az oxigénfelvétel mérését. Rendszerint semmilyen további figyelemre nincs szükség, a mért érték leolvasásán és azokon a napi ellenőrzéseken kívül, amelyek során meg kell mérni, hogy fennmaradt-e a megfelelő hőmérséklet és a megfelelő keverés.

Az oxigénfelvételt a rendszeres és gyakori időközönként leolvasott értékekből lehet kiszámítani a berendezés gyártója által megadott módszerek segítségével. Az inkubálás végén, általában a 28. napon, meg kell mérni a lombikok tartalmának pH-ját, különösen akkor, ha alacsony vagy (nitrogéntartalmú vegyületek esetében) meghaladja a $ThODNH_4$ értékét.

▼B

Ha szükséges, a respirométer-palackokból a mérés elején és végén, a DOC- vagy a specifikus kémiai elemzés végrehajtására mintát kell venni (lásd a 2. függelék 4. pontját). A mérés kezdetén végrehajtott mintavételkor gondoskodni kell arról, hogy ismert legyen a palackban maradó vizsgált szuszpenzió térfogata. Amikor a nitrogént tartalmazó vizsgált anyag oxigént vesz fel, meg kell határozni a nitrit és a nitrát koncentrációjának növekedését a 28 nap alatt, a nitrifikáció következtében elfogyasztott oxigén figyelembevételével (5. függelék).

V.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

V.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

El kell osztani valamely adott időt követően (az ugyanennyi idő után a vakpróbainokulum-kontroll által felvett oxigén figyelembevételével helyesbített) a vizsgált kémiai anyagra vonatkozó oxigénfelvételt (mg) a felhasznált vizsgált anyag tömegével. Ezzel megkapják a mg oxigén/mg vizsgált anyag hányadosaként kifejezett BOD-t, vagyis

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ uptake by test chemical} - \text{mg } O_2 \text{ uptake by blank})}{(\text{vizsgált anyag lombikban [mg]})}$$

O_2 [mg]) / (vizsgált anyag lombikban [mg])

A százalékos biológiai lebomlás kiszámítható a következő összefüggések valamelyikéből:

$$\%\ \text{biológiai lebomlás} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg anyag})}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2 \text{ anyag})} \times 100$$

vagy:

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg anyag})}{\text{COD}(\text{mg}O_2 \text{ anyag})} \times 100$$

Meg kell jegyezni, hogy e két módszer nem ad szükségképpen azonos értéket; az első módszer használatát kell előnyben részesíteni.

Nitrogéntartalmú vizsgált anyagokhoz a megfelelő ThOD-t kell használni (NH_4 vagy NO_3) annak megfelelően, hogy várható-e nitrifikáció, vagy sem (lásd a 2. függelék 2. pontját). Ha előfordul nitrifikáció, de az nem teljes, ki kell számítani egy, a nitrifikálással elfogyasztott oxigént figyelembe vevő korrekciós tényezőt a nitrit és nitrát koncentrációjában létrejövő változásokból (5. függelék).

Amikor a szerves szén és/vagy a specifikus kémiai analízis mellett döntenek, ki kell számítani a százalékos lebomlást az I.7. pontban leírt módon.

Minden eredményt fel kell jegyezni a mellékelt adatlapokra.

V.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum-vakpróba oxigénfelvétele általában 20–30 mg O_2/liter, és nem szabad, hogy 60 mg/liternél nagyobb legyen 28 nap alatt. 60 mg/liternél nagyobb értékek esetében alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszereket. Ha a pH-érték kívül van a 6–8,5-ös tartományon, és a vizsgált anyag által felvett oxigén kevesebb mint 60 %, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgált anyag kisebb koncentrációjával.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

▼B

V.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

V.4. **ADATLAP**

Példa az adatlapra.

MANOMETRIKUS RESPIROMETRIÁS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/liter

Kezdeti koncentráció a médiumban, C_o: … mg/liter

Térfogat a vizsgálólombikban (V): … ml

ThOD vagy COD: … mg O_2/mg vizsgált anyag (NH_4, NO_3)

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciókeverékben: … mg/l

5. **OXIGÉNFELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG**

		Idő (nap)											
		0		7		14			21			28	
O_2-felvétel (mg), vizsgált anyag	1												
	2												
	a, átlag												
O_2-felvétel (mg) vakpróba	3												
	4												
	b, átlag												
Korrigált BOD (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BOD/mg vizsgált anyag	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Idő (nap)											
		0		7		14			21			28	
% lebomlás $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Átlag (*)												

V = közeg térfogata a vizsgálati lombikban.
(*) A D_1-et és D_2-t nem szabad átlagolni, ha jelentős a különbség a kettő között.

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓ FIGYELEMBEVÉTELÉVEL** (lásd az 5. függeléket)

Nap		0	28	Különbség
i.	Nitrátkoncentráció (mg N/liter)			(N)
ii.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii.	Nitritkoncentráció (mg N/liter)			(N)
iv.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv.	Teljes oxigén-egyenérték	—	—	

7. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Idő (nap)	Vakpróba mg/liter	Vizsgált anyag mg/liter
0	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) vagy az inkubációs periódus végén.

$$\%\ \text{DOC} - \text{csökkenés} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **SPECIFIKUS ANALÍZIS** (választható)

S_b = a vizsgált anyag koncentrációja fizikai-kémiai (steril) kontrollban a 28. napon

S_a = koncentráció a beoltott lombikban a 28. napon

$$\%\ \text{biológiai lebomlás} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTIKUS LEBOMLÁS** (választható)

a = oxigénfelvétel a steril lombikokban 28 nap után, (mg)

$$\text{oxigénfelvétel mg vizsgált anyagonként} = \frac{a \times 100}{C_o V}$$

▼B

(lásd az 1. és 3. szakaszt)

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

VI. RÉSZ. **ZÁRTPALACK-MÓDSZER** (C.4-E. Módszer)

VI.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált kémiai anyagnak ásványianyag-tápoldatban lévő, rendszerint 2–5 mg/liter koncentrációjú oldatát be kell oltani viszonylag kis számú, vegyes populációból származó mikroorganizmussal, és teljesen teletöltött, zárt palackokban, sötétben, állandó hőmérsékleten kell tartani. A lebomlást a 28 napos időtartam alatt a feloldódott oxigén analízise követi. A vizsgált anyag által felvett oxigénmennyiséget, az egyidejűleg végrehajtott vizsgálatban a vakpróba-inokulum által felvett oxigén figyelembevételével helyesbítve, a ThOD vagy a COD százalékában kell kifejezni.

VI.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

VI.2.1. **Készülék**

a) BOD-palackok, üvegdugókkal, például 250–300 ml-esek;

b) Vízfürdő vagy inkubátor, amelyekben a palackok állandó hőmérsékleten (± 1 °C vagy ennél nagyobb pontosság mellett) sötétben tarthatók;

c) Nagyméretű üvegpalackok (2–5 literesek) a közeg előkészítésére és a BOD-palackok megtöltésére;

d) Oldottoxigén-mérő, valamint reagensek a Winkler-féle titráláshoz.

VI.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A törzsoldatok elkészítését lásd az I.6.2. pontban.

Össze kell keverni 1 ml-t az (a)–(d) oldatokból, és azt hígítóvízzel ki kell egészíteni 1 literre.

VI.2.3. **Az inokulum előkészítése**

Az inokulum valamilyen, döntően háztartási szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység másodlagos kezelt szennyvízéből származik. Alternatív inokulumforrás a felszíni víz. Általában egy csepp (0,05 ml) és 5 ml közötti szűrletet kell használni ásványianyagtápoldat-literenként; kísérletezésre lehet szükség adott inokulumforrás vonatkozásában az optimális térfogat kiderítésére (lásd az I.6.4.2. és I.6.5. pontot).

VI.2.4. **A lombikok előkészítése**

Az ásványianyag-tápoldatot legalább 20 percig kell intenzíven levegőztetni. Ugyanazon adagból származó ásványianyag-tápoldattal kell végrehajtani minden egyes vizsgálatsorozatot. Az oldószer általában a vizsgálati hőmérsékleten való 20 óra állást követően kész a felhasználásra. Az oldott oxigén koncentrációját ellenőrzési célból kell meghatározni; az értéknek körülbelül 9 mg/liternek kell lennie 20 °C-os hőmérsékleten. A levegővel telített közeg minden áthelyezési és áttöltési műveletét buborékmentesen kell végrehajtani, például szívócsövek segítségével.

▼B

A BOD-palackok csoportjait kell elkészíteni a vizsgált és a referenciaanyagok meghatározására végzett egyidejű kísérletsorozatokhoz. Elegendő számú BOD-palacknak kell rendelkezésre állnia, az inokulum-vakpróbákat is ideértve úgy, hogy legalább két oxigénfogyasztás-mérés legyen végrehajtható a kívánt időintervallumokban, például a 0., 7., 14., 21. és 28. nap után. Lehet, hogy további palackokra lesz szükség annak biztosítására, hogy azonosítható legyen a „tíznapos ablak”.

A teljesen kilevegőztetett ásványianyag-tápoldatot a nagy palackokba úgy kell beletölteni, hogy azok körülbelül 1/3 részükig legyenek megtöltve. Ezután a nagy palackokba bele kell tölteni a vizsgált anyag és a referenciaanyag törzsoldatából elegendő mennyiséget úgy, hogy az anyagok végleges koncentrációja általában ne legyen 10 mg/liternél nagyobb. Semmilyen kémiai anyagot nem lehet beleönteni a vakpróba kontrolloldószert tartalmazó nagy palackba.

Annak biztosítására, hogy az inokulumaktivitás ne legyen korlátozott, az oldott oxigén koncentrációjának nem szabad 0,5 mg/liter alá csökkennie a BOD-palackokban. Ez körülbelül 2 mg/literre korlátozza a vizsgált anyag koncentrációját. Azonban a nehezen lebomló vegyületekhez és az alacsony ThOD-értékű vegyületekhez 5–10 mg/liter használható. Néhány esetben ajánlatos lehet a vizsgált anyagot egyidejűleg vizsgálni két különböző, például 2 és 5 mg/literes koncentráció mellett. Általában a ThOD-t az ammóniumsók képződése alapján kell kiszámítani, de ha nitrifikáció várható, vagy ismert, hogy ez előfordul, a számításnak a nitrátképződésen kell alapulnia ($ThOD_{NO3}$: lásd a 2. függelék 2. pontját). Azonban, ha előfordul ugyan nitrifikáció, de ez nem teljes, korrekciót kell végrehajtani a nitrit és a nitrát koncentrációjában az elemzés által meghatározott változások figyelembevételével (lásd az 5. függeléket).

Ha meg kell vizsgálni a vizsgált anyag toxicitását (például abban az esetben, ha előzőleg kis mértékű biológiai lebonthatóság volt tapasztalható), akkor egy másik palacksorozat szükséges.

Egy másik nagy palackra is szükség van a kilevegőztetett, kb. harmadáig megtöltött ásványianyag-tápoldat befogadására, valamint a vizsgált anyag és a referenciaanyag bevitelére olyan végleges koncentrációban, amely általában megegyezik a többi nagy palackban lévő koncentrációval.

A nagy palackokban lévő oldatokat másodlagos kifolyó szennyvízzel (egy cseppel vagy körülbelül 0,05 ml-től 5 ml/l-ig terjedő mennyiséggel), vagy valamilyen más forrásból származó inokulummal, például folyóból vett vízzel (lásd az I.6.4.2. pontot) kell beoltani. Végül az oldatokat kilevegőztetett ásványianyag-tápoldattal kell kiegészíteni úgy, hogy kitöltsék a teljes térfogatot, az oldószer beviteléhez a palack aljáig leérő csövet kell használni, azért hogy megfelelő keveredést érjenek el.

VI.2.5. **A palackok száma egy tipikus vizsgálatsorozatban**

Egy tipikus vizsgálatsorozatban a következő palackokra van szükség:

— a vizsgált anyagot és az inokulumot (vizsgált szuszpenzió) tartalmazó legalább 10 palack,

— csak inokulumot (inokulum-vakpróba) tartalmazó legalább 10 palack,

— referenciaanyagot és inokulumot (eljáráskontroll) tartalmazó legalább 10 palack,

▼B

— és amikor szükséges, a vizsgált anyagot, referenciaanyagot és inokulumot (toxicitáskontroll) tartalmazó 6 palack. Annak biztosítására, hogy meghatározható legyen a „tíznapos ablak”, körülbelül kétszer ennyi palackra lehet szükség.

VI.2.6. A kísérlet végrehajtása

Minden egyes előkészített oldatot a megfelelő nagy palack alsó negyedéből kell kiadagolni (nem az aljából) egy cső segítségével a BOD-palackok megfelelő csoportjába úgy, hogy minden BOD-palack teljesen tele legyen. A palackokat ezután óvatosan meg kell ütögetni az esetleges légbuborékok eltávolítása céljából. A palackokat a nulla időpontban azonnal elemezni kell az oldott oxigén mennyiségének megállapítása céljából a Winkler- vagy az elektróda módszer segítségével. A palackok tartalma tartósítható a Winkler-módszerrel végrehajtott későbbi elemzéshez mangán(II)-szulfát és nátrium-hidroxid (első Winkler-reagens) hozzáadásával. A gondosan ledugózott palackokat, amelyek az oxigént barna mangán(III)-hidroxidként kötve tartalmazzák, sötétben, 10–20 °C hőmérsékleten, 24 óránál nem hosszabb ideig kell tárolni, mielőtt végrehajtanánk a Winkler-módszer hátralévő lépéseit. A többi, másodpéldányként szolgáló palackot is le kell fedni dugóval, gondoskodva arról, hogy ne legyen bennük légbuborék, e palackokat 20 °C hőmérsékleten, sötét helyen kell inkubálni. Minden egyes vizsgálatsorozatot egy teljes párhuzamos sorozatnak kell kísérnie az inokulumvakpróba-értékek meghatározására. A 28 napos inkubálási idő során bizonyos időközönként (legalább hetente) minden sorozatból legalább két palackot el kell távolítani az oldott oxigén mennyiségének meghatározása érdekében.

A hetenként vett mintáknak lehetővé kell tenniük valamely 14 napos időintervallum során a százalékos csökkenés kiértékelését, míg a 3–4 naponként történő mintavételnek lehetővé kell tennie a „tíznapos ablak” meghatározását, amelyhez körülbelül kétszer annyi palackra van szükség.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálata esetében korrekciót kell végrehajtani a nitrifikáció következtében végbemenő oxigénfelvétel tekintetében. Ennek végrehajtására az O_2-elektróda módszert kell használni az oldott oxigén koncentrációjának meghatározására, ezután mintát kell venni a BOD-palackból a nitrit és a nitrát elemzésére. A nitrit és a nitrát koncentrációjának növekedéséből lehet kiszámítani a felhasznált oxigén mennyiségét (lásd az 5. függeléket).

VI.3. ADATOK ÉS JELENTÉS

VI.3.1. **Eredmények kiértékelése**

Először ki kell számítani az egyes időtartamok utáni BOD-t a vizsgált anyag oxigénfelvételéből kivonva az inokulum-vakpróba oxigénfelvételét (mg O_2/liter). A korrigált oxigénfelvétel értékét el kell osztani a vizsgált anyag koncentrációjával (mg/liter), hogy megkapják az adott BOD-t mg oxigén/mg vizsgált anyagként. Ki kell számítani a százalékos biológiai lebonthatóságot az adott BOD-nek az adott ThOD-val (a 2. függelék 2. pontjának megfelelően kiszámított) vagy COD-val (elemzéssel meghatározva, lásd a 2. függelék 3. pontját) való elosztásával, azaz:

$$\text{BOD} = \frac{\text{a vizsgált anyag által felvett } O_2 \text{ [mg]} - \text{a vakpróba által felvett } O_2 \text{ [mg]}}{\text{a palackban lévő vizsgált anyag [mg]}}$$

▼B

= mg O_2/mg vizsgált anyag

$$\% \text{ lebomlás } = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}}{\text{ThOD(mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}} \times 100$$

vagy:

$$\% \text{ lebomlás } = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}}{\text{COD(mg } O_2/\text{mg vizsgált anyag)}} \times 100$$

Meg kell jegyezni, hogy e két módszer nem ad szükségképpen azonos értéket; az első módszer használatát kell előnyben részesíteni.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálatához a megfelelő ThOD-t kell használni (NH_4 vagy NO_3) annak megfelelően, hogy várható-e nitrifikáció, vagy sem. Ha előfordul nitrifikáció, de az nem teljes, ki kell számítani egy, a nitrifikálással elfogyasztott oxigént figyelembe vevő korrekciós tényezőt a nitrit és nitrát koncentrációjában létrejövő változásokból (5. függelék).

VI.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum-vakpróbában az oxigéncsökkenésnek nem szabad 1,5 mg oldott oxigén/liternél nagyobbnak lennie 28 nap eltelte után. Ennél nagyobb értékek esetén meg kell vizsgálni a kísérleti módszereket. A vizsgált palackokban a maradék oxigén koncentrációjának soha nem szabad 0,5 mg/liter alá csökkennie. Az ilyen alacsony oxigénszintek csak akkor érvényesek, ha az oldott oxigén meghatározására használt módszer képes pontosan mérni az ilyen alacsony szinteket.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

VI.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

VI.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

ZÁRT PALACKOS VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/liter

Kezdeti koncentráció a palackban: … mg/liter

ThOD vagy COD: … mg O_2/mg vizsgált anyag

4. **INOKULUM**

Forrás:

Végrehajtott kezelés:

▼B

Előkondicionálás, ha van ilyen:

Koncentráció a reakciókeverékben: … mg/liter

5. **OLDOTT OXIGÉN (DO) MEGHATÁROZÁSA**

Módszer: Winkler-módszer/oldott oxigén mérése elektródával

Meghatározások a palackokból

Inkubálás időtartama (nap)			Oldott oxigén (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Vakpróba (vizsgált anyag nélkül	1	C_1				
	2	C_2				
Átlag	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Vizsgált anyag	1	a_1				
	2	a_2				
Átlag	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Megjegyzés: hasonló adatlapok használhatók a referenciaanyagokhoz és a toxicitáskontrollokhoz is.

6. **KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓ FIGYELEMBEVÉTELÉVEL** (lásd az 5. függeléket)

Inkubálás időtartama (nap)		0	n_1	n_2	n_3
i.	Nitrátkoncentráció (mg N/liter)				
ii.	Nitrátkoncentráció változása (mg N/liter)	—			
iii.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	—			
iv.	Nitritkoncentráció (mg N/liter)				
v.	Nitritkoncentráció változása (mg N/liter)	—			
vi.	Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	—			
iii.	+ vi. Teljes oxigén-egyenérték (mg/liter)	—			

7. **OLDOTTOXIGÉN-CSÖKKENÉS: % LEBOMLÁS**

	Csökkenés n nap után (mg/liter)			
	n_1	n_2	n_3	
1. PALACK: $(m_{to} - mt_x) - (m_{bo} - m_{bx})$				
2. PALACK: $(m_{to} - mt_x) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Csökkenés n nap után (mg/liter)			
	n_1	n_2	n_3	
1. PALACK $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{vizsgálat anyag koncentrációja} \times \text{ThOD kémiai anyag}}$				
2. PALACK $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{vizsgálat anyag koncentrációja} \times \text{ThOD kémiai anyag}}$				
$\% D \text{ átlag } (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Nem adagolható, ha jelentős különbség van az ismételt mérések között.

m_{to} = a vizsgálati palackban a 0 időpontban mért érték

m_{tx} = a vizsgálati palackban az x időpontban mért érték

m_{bo} = vakpróbában mért átlagos érték a 0 időpontban

m_{bx} = vakpróbában mért átlagos érték az x időpontban

A 6. szakaszban a iii. + vi-ból származó nitrifikáció figyelembevételére is korrekciót kell alkalmazni.

8. **AZ OLDOTT OXIGÉN CSÖKKENÉSE AZ INOKULUM-VAKPRÓBÁBAN**

A vakpróba által felvett oxigén: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/liter. Ez az oxigénfelvétel fontos a vizsgálat érvényességéhez. Ennek 1,5 mg/liternél kevesebbnek kell lennie.

VII. RÉSZ **MITI-VIZSGÁLAT** (C.4-F. Módszer)

VII.1. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgált anyag tenyészközegben létrehozott, különlegesen tenyésztett, nem adaptált mikroorganizmusokkal beoltott, folyamatosan kevert oldatában vagy szuszpenziójában az oxigénfelvételt 28 napos időtartamon át egy elsötétített, zárt, automata, 25 ± 1 °C hőmérsékleten tartott respirométerben mérik. A fejlődött szén-dioxidot nátronmésszel nyeletik el. A biológiai lebonthatóságot az elméleti oxigénfelvétel (ThOD) százalékos felvételeként (a vakpróba felvételének figyelembevételével) kell kifejezni. Az elméleti biológiai lebonthatóság mértékét is ki kell számítani az inkubációs periódus kezdetén és végén végrehajtott kiegészítő specifikus kémiai elemzésből, és/vagy más lehetőségként, a DOC-elemzésből.

VII.2. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

VII.2.1. **Készülék**

a) Szokásos körülmények között 6 darab, egyenként 300 ml-es és a CO_2 abszorbens elhelyezésére szolgáló készüléket tartalmazó palackkal felszerelt respirométer vagy automata elektrolitikus BOD-mérő;

▼B

b) Klímakamra és/vagy vízfürdő 25 °C ± 1 °C vagy ennél nagyobb pontosságú;

c) Membránszűrő készülék (választható);

d) Szénanalizátor (választható).

VII.2.2. **Ásványianyag-tápoldat előkészítése**

A következő törzsoldatokat kell elkészíteni analitikai minőségű reagensek és víz használatával (I.6.1.):

a)	Kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4	8,50 g
	Dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4	21,75 g
	Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Ammónium-klorid, NH_4Cl	1,70 g
	Ezen anyagokat vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	
	Az oldat pH-értékének 7,2-nek kell lennie.	
b)	Magnézium-szulfát-heptahidrát, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	
c)	Kalcium-klorid, vízmentes, $CaCl_2$	27,50 g
	Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	
d)	Vas(III)klorid-hexahidrát, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,25 g
	Vízben kell feloldani, és 1 literre kiegészíteni.	

Az (a), (b), (c) és (d) oldatok közül mindegyikből 3 ml-t kell venni, és kiegészíteni 1 literre.

VII.2.3. **Az inokulum előkészítése**

Friss mintákat kell tíznél nem kevesebb helyről összegyűjteni, főleg olyan területekről, ahol különböző kémiai anyagokat használnak és bocsátanak ki. 1 liternyi szennyvíziszap, felszíni víz, talaj stb. mintákat kell begyűjteni olyan helyekről, mint például szennyvíztisztító, ipari szennyvízkezelő telepek, folyók, tavak, tengerek, és ezeket alaposan össze kell keverni. A lebegő, úszó anyag eltávolítása után a mintát állni kell hagyni, majd a felülúszó folyadék pH-ját 7 ± l-re kell beállítani nátrium-hidroxid vagy foszforsav hozzáadásával.

Megfelelő térfogatú, szűrt felülúszó folyadékot eleveniszapot tartalmazó tartályba kell beletölteni, majd ezt körülbelül 23 1/2 órán át kell levegőztetni. A levegőztetés leállítása után 30 perccel ki kell engedni a felülúszó folyadék teljes térfogatának körülbelül egyharmadát, és ennek helyére ezzel egyenlő térfogatú, glükózból, peptonból és kálium-foszfátból egyaránt 0,1 %-ot tartalmazó (7-es pH-jú) oldatot kell a leülepedett anyaghoz hozzáadni, ezután újra kell kezdeni a levegőztetést. Minden nap egyszer ismételik meg ezt az eljárást. A szennyvíziszap-fermentort a jól bevált gyakorlatnak megfelelően kell működtetni: a kifolyó szennyvízből nyert folyadékoknak tisztáknak kell lenniük, a hőmérsékletet 25 ± 2 °C-on kell tartani, a pH-nak 7 ± l-nek kell lennie, a szennyvíziszapnak jól leülepedettnek kell lennie, elegendő levegőztetést kell biztosítani, hogy a keverék állandóan aerob állapotban legyen, jelen kell lenniük protozoáknak, és legalább minden harmadik hónapban meg kell vizsgálni a szennyvíziszap aktivitását valamely referenciaanyaggal összevetve. Szennyvíziszap nem használható inokulumként, amíg legalább egy hónap el nem telt a működtetés kezdete óta, de nem használható fel négy hónapnál később sem. Ezután rendszeres időközönként, minden három hónapban egyszer, legalább 10 helyről mintát kell venni.

▼B

Össze kell keverni a használatban lévő eleveniszap szűrt, felülúszó folyadékát a frissen gyűjtött, tíz forrásból származó keverék ezzel egyenlő térfogatú, szűrt, felülúszó folyadékával, és az egyesített folyadékot a fentieknek megfelelően tovább kell tenyészteni azért, hogy ugyanolyan aktivitáson tartsák a friss és régi iszapot. Az egységbe történő betöltés után 18–24 órával ki kell venni az inokulumként használni kívánt iszapot.

VII.2.4. **A lombikok előkészítése**

Az alábbi hat lombikot kell előkészíteni:

1. számú: a vizsgált anyag hígítóvízben, 100 mg/liter koncentrációban

2., 3. és 4. számú: a vizsgált anyag ásványianyag-tápoldatban, 100 mg/liter koncentrációban

5. számú: referenciaanyag (például anilin) ásványianyag-tápoldatban, 100 mg/liter koncentrációban

6. számú: csak ásványianyag-tápoldat.

A rosszul oldódó vizsgált anyagokat közvetlenül kell bevinni tömeg vagy térfogat alapon, vagy azokat a 3. függelékben leírt módon kell kezelni, kivéve hogy sem oldószereket, sem pedig emulgeátorokat nem szabad használni. A CO_2-abszorbenst az erre a célra biztosított specifikus tartókban kell bevinni minden lombikba. A pH-t 7,0-ra kell beállítani a 2., 3. és 4. lombikban.

VII.2.5. **A vizsgálat végrehajtása**

Be kell oltani a 2., 3. és 4. (vizsgált szuszpenzió), 5. (eljáráskontroll) és 6. (inokulum-vakpróba) lombikokat kis térfogatú oltóanyaggal úgy, hogy 30 mg/l szuszpendált szilárd anyagot kapjanak. Az 1. lombikhoz, amely abiotikus kontrollként szolgál, nem kell inokulumot adni. Össze kell állítani a berendezést, ellenőrizni kell a légmentes záródást, elindítani a keverőt, majd megkezdeni az oxigénfelvétel mérését sötétséget biztosítva. Naponta ellenőrizni kell a hőmérsékletet, a keverőt és a coulometriás oxigénfelvétel-mérőt, valamint fel kell jegyezni a lombikok tartalmának minden változását. Le kell olvasni közvetlenül a hat lombikhoz tartozó oxigénfelvételt valamilyen megfelelő módszerrel, például a hatpontos szalagos, öníró műszer segítségével, amely létrehoz egy BOD-görbét. Az inkubációs periódus végén, általában a 28. napon, meg kell mérni a lombikok tartalmának pH-ját, és meg kell határozni a maradék vizsgált anyag és minden közbenső anyag koncentrációját, a vízben oldható anyagok esetében a DOC-koncentrációt (2. függelék 4. pontja). Különleges gondossággal kell eljárni az illékony kémiai anyagok esetében. Ha nitrifikáció várható, meg kell határozni a nitrát- és a nitritkoncentrációt, ha lehetséges.

VII.3. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JELENTÉS

VII.3.1. **Az eredmények kiértékelése**

Adott időt követően el kell osztani a vizsgált anyag által felvett oxigén tömegét (mg) (az ugyanennyi idő után a vakpróbainokulum-kontroll által felvett oxigén figyelembevételével végrehajtott korrekció után) a felhasznált vizsgált anyag tömegével. Ezzel megkapják a mg oxigén/mg vizsgált anyag hányadosaként kifejezett BOD-t, azaz:

$$\text{BOD} = \frac{\text{a vizsgált anyag által felvett } O_2 \text{ [mg]} - \text{a vakpróba által felvett } O_2 \text{ [mg]}}{\text{vizsgált anyag lombikban [mg]}}$$

= mg O_2/mg vizsgált anyag

▼B

A százalékos biológiai lebomlást a következő összefüggésből lehet kiszámítani:

$$\%\ \text{biolúgiai lebomlás} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg kémiai anyag)}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg kémiai anyag)}} \times 100$$

Keverékek esetében elemanalízisből lehet kiszámítani a ThOD-t ugyanúgy, mint egyszerű vegyületek esetén. A használandó ThOD-érték ($ThOD_{NH4}$ vagy $ThOD_{NO3}$) attól függ, hogy nincs jelen vagy teljes-e a nitrifikáció (2. függelék 2. pontja). Azonban, ha előfordul nitrifikáció, de ez nem teljes, korrekciót kell végrehajtani annak az oxigénnek a figyelembevételével, amelyet a nitrit és a nitrát koncentrációiban létrejövő változásokból kiszámított nitrifikáció fogyaszt el (5. függelék).

A százalékos elsődleges biológiai lebomlást a specifikus (kiindulási) anyag veszteségéből (lásd az I.7.2. pontot) lehet kiszámítani.

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Ha a vizsgált anyagra vonatkozóan veszteség fordult elő fizikai-kémiai okokra visszavezethetően az 1. lombikban, ezt fel kell jegyezni a jelentésbe, és a vizsgált anyagnak az e lombikban a 28. nap után meglévő koncentrációját (S_b) kell használni a százalékos biológiai lebomlás kiszámításához.

A DOC-meghatározások végrehajtásakor (választható) ki kell számítani a százalékos végső biológiai lebomlást a következő összefüggésből:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

úgy, ahogyan ezt az I.7.1. pont ismerteti. Ha DOC-csökkenés fordult elő az 1. lombikban, amely a fizikai-kémiai okokból bekövetkező csökkenést méri, akkor az e lombikban lévő DOC-koncentrációt kell használni a százalékos biológiai bomlás kiszámítására.

Minden eredményt fel kell jegyezni a mellékelt adatlapokra.

VII.3.2. **Az eredmények érvényessége**

Az inokulum-vakpróba oxigénfelvétele általában 20–30 mg O_2/l, és nem szabad 60 mg/l-nél nagyobbnak lennie 28 nap alatt. 60 mg/l-nél magasabb értékek esetében alaposan meg kell vizsgálni az adatokat és a kísérleti módszereket. Ha a pH-érték a 6–8,5-ös tartományon kívül van, és a vizsgált anyag oxigénfogyasztása kevesebb mint 60 %, a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgált anyag kisebb koncentrációjával.

Lásd még az I.5.2. pontot is.

Ha az anilinnek az oxigénfogyasztásból kiszámított százalékos lebomlása nem lépi túl a 40 %-ot 7 nap után és a 65 %-ot 14 nap után, a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni.

VII.3.3. **Vizsgálati jelentés**

Lásd az I.8. pontot.

VII.4. ADATLAP

Példa az adatlapra.

MITI (I) VIZSGÁLAT

1. **LABORATÓRIUM**

2. **A VIZSGÁLAT KEZDETÉNEK DÁTUMA**

▼B

3. **VIZSGÁLT ANYAG**

Név:

Törzsoldat-koncentráció: … mg/l, az anyagra vonatkoztatva

Kezdeti koncentráció a médiumban: … mg/l az anyagra vonatkoztatva

Reakciókeverék térfogata, V: … ml

ThOD: … mg O_2/l

4. **INOKULUM**

Iszapminta-vételi helyek:

1. …
2. …
3. …
4. …
5. …
6. …
7. …
8. …
9. …
10. …

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja az eleveniszapban mesterséges szennyvízzel végrehajtott akklimatizáció után = … mg/l

Eleveniszap térfogata 1 liter végső közegben = … ml

Szennyvíziszap koncentrációja a végső közegben = … mg/l

5. **OXIGÉNFELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG**

A vizsgálathoz használt respirométer típusa:

			Idő (nap)				
			0	7	14	21	28
O_2-felvétel (mg), vizsgált anyag	a_1						
	a_2						
	a_3						
O_2-felvétel (mg), vakpróba	b						
Korrigált O_2-felvétel (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_2 - b)$ $(a_3 - b)$						
BOD mg vizsgált anyagonként	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	1. lombik					
		2. lombik					
		3. lombik					
% lebomlás $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Átlag (*)					

(*) Nem átlagolható, ha jelentős eltérés van az ismételt méréssel kapott értékek között.

▼B

Megjegyzés: Hasonló formátumok használhatók a referenciavegyülethez.

6. **SZÉNANALÍZIS** (választható)

Szénanalizátor:

Lombik	DOC				% DOC-csökkenés	Átlag
	Mért		Korrigált			
Viz + vizsgált anyag	a				—	—
Iszap + vizsgált anyag	b_1		$b_1 - c$			
Iszap + vizsgált anyag	b_2		$b_2 - c$			
Iszap + vizsgált anyag	b_3		$b_3 - c$			
Kontrollvakpróba	c		—		—	—

$$\% \text{ DOC} - \text{csökkenés } \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPECIFIKUS KÉMIAI ELEMZÉSBŐL SZÁRMAZÓ ADATOK**

	Vizsgált anyag maradékmennyisége a vizsgálat végén	% lebomlás
Vakpróba vizsgálat vízzel	s_b	
Beoltott közeg	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ lebomlás } = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Ki kell számítani a % lebomlást az a_1-es, a_2-es, illetve a_3-as lombikhoz.

8. **MEGJEGYZÉSEK**

Mellékelni kell az idő függvényében felrajzolt BOD-görbét, ha az rendelkezésre áll.

▼B

1. függelék

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

DO: Oldott oxigén: (mg/l) az oldott oxigén koncentrációja valamely vizes mintában.

BOD: Biokémiai oxigénigény: valamely vizsgált vegyület metabolizálásakor a mikroorganizmusok által felhasznált oxigén mennyisége; g oxigénfelvétel/g vizsgált vegyületként kifejezve is használják, (lásd a C.5. módszert).

COD: Kémiai oxigénigény (g): valamely vizsgált vegyületnek forró, savas, dikromáttal végrehajtott oxidálása során felvett oxigén mennyisége; megadja a jelen lévő oxidálható anyag mennyiségének mértékét; oxigénfelvétel (g)/vizsgált vegyület (g) formában is használják. (lásd a C.6. módszert).

DOC: Oldott szerves szén: az oldatban jelen lévő szerves szén, amely átszűrhető 0,45 mikrométeres szűrőn, vagy 15 percig tartó 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) intenzitású centrifugálást követően a felülúszóban marad.

ThOD: Elméleti oxigénigény (mg): valamely vegyi anyag teljes oxidálásához szükséges teljes oxigénmennyiség; a molekuláris képletből számítják ki (lásd a 2. függelék 2. pontját), és oxigénigény (mg)/vizsgált vegyület (mg) formában is használják.

$ThCO_2$: Elméleti szén-dioxid-felszabadulás (mg): az a számított szén-dioxid-mennyiség, amelynek létre kell jönnie a vizsgált vegyület ismert vagy mért széntartalmából, a teljes ásványosodás során; fejlődött szén-dioxid (mg)/vizsgált vegyület (mg) formában is használják.

TOC: Összes szerves szén: az oldatban és szuszpenzióban lévő szerves szén összege egy mintában.

IC: Szervetlen szén.

TC: Összes szén: a mintában jelen lévő szerves és szervetlen szén összege.

Elsődleges biológiai lebonthatóság:

valamely anyag kémiai szerkezetében biológiai folyamattal okozott változás, amely ezen anyag speciális tulajdonságának elvesztését eredményezi.

Teljes biológiai lebonthatóság (aerob):

az a lebomlási szint, amikor a vizsgált vegyületet teljesen felhasználják a mikroorganizmusok szén-dioxid, víz, ásványi sók és új mikrobás, sejtalkotórészek (biomassza) létrejöttét eredményezve.

Biológiailag könnyen lebontható:

olyan vegyi anyagok tetszőleges kategorizálása, amelyek megfeleltek bizonyos, a teljes biológiai lebonthatóság meghatározott szűrési vizsgálatok követelményeinek; e vizsgálatok olyan szigorúak, hogy feltételezhető, hogy az ilyen vegyületek vizes környezetekben aerob körülmények között biológiailag gyorsan és teljesen lebomlanak.

▼B

Biológiailag potenciálisan lebontható:

azoknak a vegyi anyagoknak a kategorizálása, amelyek esetében valamilyen elfogadott biológiai lebonthatóság vizsgálata során egyértelműen bizonyított a biológiai lebonthatóság (elsődleges vagy teljes).

Kezelhetőség:

biológiai szennyvízkezelés során vegyületek eltávolítás szempontjából történő kezelhetősége, anélkül, hogy káros hatással lennének a kezelési folyamat normál működésére. Általában a biológiailag gyorsan lebontható vegyületek kezelhetők, de nem minden biológiailag potenciálisan lebontható vegyület kezelhető. Abiotikus folyamatok is végbemehetnek.

Fáziskésés

valamely lebonthatósági vizsgálatban a beoltástól kezdődő és addig terjedő időtartam, amíg a lebomlási százalék legalább 10 %-ra növekedett. A fáziskésés gyakran nagyon változékony, és gyengén reprodukálható.

Lebomlási idő

a fáziskésés végétől kezdődő és addig tartó időtartam, amikor a lebomlás elérte a legnagyobb szintjének 90 %-át.

Tíznapos ablak

a 10 %-os lebomlás elérését közvetlenül követő 10 nap.

▼B

2. függelék

MEGFELELŐ ÖSSZEFOGLALÓ PARAMÉTEREK KISZÁMÍTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA

A választott módszertől függően, szükség lesz bizonyos összefoglaló paraméterekre. A következő szakasz ezen értékek levezetését írja le. E paraméterek használatát az egyes módszerek ismertetik.

1. **Széntartalom**

A széntartalom az ismert elemi összetételből számítható ki, vagy a vizsgált anyag elemi analízise határozza meg.

2. **Elméleti oxigénigény (ThOD)**

Az elméleti oxigénigény (ThOD) kiszámítható, ha ismert vagy elemi analízissel meghatározásra került az elemi összetétel. A következő vegyület esetében:

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

nitrifikáció nélkül,

$$ThOD_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

vagy nitrifikációval,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2(h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Kémiai oxigénigény (COD)**

A kémiai oxigénigényt (COD) a C.6. módszernek megfelelően kell meghatározni.

4. **Oldott szerves szén (DOC)**

Az oldott szerves szén (DOC): bármely vegyi anyagnak vagy vizes keveréknek egy 0,45 mikrométeres szűrőn átszűrhető szerves szén része.

A vizsgálati tartályokból mintákat vesznek, és a mintákat azonnal átszűrik megfelelő membránszűrő segítségével. A szűrlet első 20 ml-jét (a mennyiség csökkenthető kisméretű szűrők használatakor) elvetik. Befecskendezés esetén 10–20 ml-t vagy ennél kevesebbet (a térfogat a szénanalizátorhoz szükséges mennyiségtől függ) megőriznek a szén elemzéséhez. A DOC-koncentrációt olyan szervesszén-analizátor segítségével határozzák meg, amely a vizsgálatban használt kezdeti DOC-koncentráció 10 %-ával egyenértékű, vagy annál kisebb szénkoncentráció pontos mérésére képes.

Azok a szűrt minták, amelyek nem elemezhetők ugyanazon a munkanapon, hűtőszekrényben, 2–4 °C-os hőmérsékleten 48 óráig vagy –18 °C-os hőmérséklet alatt ennél hosszabb ideig tárolhatók.

Megjegyzések:

A membránszűrőket gyakran impregnálják felületaktív anyagokkal a hidrofilizáció biztosítására. Így tehát a szűrő akár több mg olyan oldható szerves szenet is tartalmazhat, amely befolyásolhatja a biológiai lebonthatósági vizsgálat eredményeit. A felületaktív anyagok és más, oldható szerves vegyületek eltávolíthatók a szűrőkről három, egyenként egyórás időtartamon keresztül deionizált vízben történő forralással. A szűrők ezután egy héten át vízben tárolhatók. Eldobható szűrőbetétek használatakor minden egyes adagot ellenőrizni kell, meg kell győződni arról, hogy nem szabadít-e fel oldható szerves szenet.

▼B

A membránszűrő típusától függően adszorpció útján visszamaradhat a vizsgált vegyi anyag. Ezért ajánlott ezt megelőzni.

Szűrés helyett 15 percen át 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) melletti centrifugálás alkalmazható a TOC és DOC megkülönböztetésére. Ez a módszer nem megbízható 10 mg DOC/l alatti kezdeti koncentrációnál, mivel vagy nem távozik el minden baktérium, vagy újraoldódik a szén a baktériumplazma részeként.

SZAKIRODALOM

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th edition, Am. Pub. H1th. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, 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), NormenausschuB Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13 (1), 169.

▼B

3. függelék

ROSSZUL OLDHATÓ ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE

A rosszul oldható anyagokkal végrehajtott biológiai lebonthatósági vizsgálatokban a következő szempontoknak kell különleges figyelmet szentelni.

Míg a homogén folyadékok ritkán járnak mintavételi problémákkal, ajánlatos a szilárd anyagokat megfelelő eszközökkel homogenizálni a homogenitás hiánya miatti hibák elkerülésére. Különleges gondossággal kell eljárni, amikor vegyi anyagok keverékeiből vagy nagymennyiségű szennyeződéseket tartalmazó anyagokból néhány mg-nyi reprezentatív minta szükséges.

A vizsgálatok során különböző formájú keverés használható. Gondosan kell eljárni, csak olyan mértékű keverést szabad alkalmazni, amely éppen elegendő a vegyi anyag diszpergált állapotban tartásához, és amelynél nem lép fel túlmelegedés, túlzott habzás vagy a baktériumok mechanikai károsodása.

A vegyi anyag stabil diszperzióját létrehozó emulgeálószer használható. Ez nem lehet toxikus a baktériumra, és a vizsgálati körülmények között nem szabad biológiailag lebomlania vagy habzást okoznia.

Az oldószerekre ugyanaz a követelmény érvényes, mint az emulgeálószerekre.

Nem ajánlott szilárd hordozóanyagok használata szilárd vizsgált anyagokhoz, ezek olajos anyagokhoz lehetnek alkalmasak.

Segédanyagok, ilyenek például az emulgeálószerek, oldószerek és hordozóanyagok használatakor segédanyag-vakpróbát kell végrehajtani.

A három respirometriás vizsgálat – CO_2, BOD, MITI – közül bármelyik használható a rosszul oldható vegyületek biológiai lebonthatóságának vizsgálatára.

SZAKIRODALOM

— 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

4. függelék

AZ OLTÓANYAGRA FELTEHETŐEN TOXIKUS VEGYI ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE

Amennyiben valamely vegyi anyagot könnyű biológiai lebonthatóság vizsgálatának vetik alá, és úgy tűnik, hogy biológiailag nem lebontható, a következő eljárás ajánlatos, amennyiben különbséget kell tenni a gátlás és a közömbösség között. (Reynolds és munkatársai, 1987)

Hasonló vagy azonos oltóanyagot kell használni a toxicitás- és a biológiai lebonthatósági vizsgálatokhoz.

A könnyű biológiai lebonthatóság megállapítására irányuló vizsgálatokban vizsgált vegyi anyagok toxicitásának értékeléséhez az iszaplégzésintenzitás-gátlási (aktivált szennyvíziszap légzésgátlási vizsgálata – 88/302/EGK irányelv), BOD- és/vagy növekedésgátló módszerek vagy ezek kombinációjának alkalmazása tűnik megfelelőnek.

Amennyiben el kell kerülni a toxicitásra visszavezethető gátlást, ajánlott a biológiailag gyors lebonthatóság megállapítására végrehajtott vizsgálatot a toxicitásvizsgálatban kapott EC_{50}-es értékek 1/10-ét (vagy az EC_{20}-értékeknél kisebbet) el nem érő vizsgálatianyag-koncentrációt alkalmazni. 300 mg/l-nél nagyobb EC_{50}-es értékű vegyületek nem valószínű, hogy toxikus hatással rendelkeznek a biológiailag gyors lebonthatóság vizsgálatában.

A 20 mg/l-nél kisebb EC_{50}-értékek valószínűleg súlyos problémákat jelentenek a későbbi vizsgálat esetében. Alacsony vizsgálati koncentrációkat kell alkalmazni, amely szükségessé teszi a szigorú és érzékeny zártpalack-vizsgálat használatát vagy a ^{14}C – címkézésű anyag használatát. Más megoldásként, valamely akklimatizált oltóanyag a vizsgált anyag magasabb koncentrációjának használatát teheti lehetővé. Az utóbbi esetben azonban elvész a biológiailag könnyű lebonthatóság vizsgálatának különös követelménye.

SZAKIRODALOM

Reynolds, L. et. al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

5. függelék

A NITRIFIKÁCIÓ OKOZTA OXIGÉNFELVÉTEL FIGYELEMBEVÉTELE

Nitrogént nem tartalmazó vizsgált anyagok biológiai lebonthatóságának oxigénfelvétellel történő értékelésében a nitrifikáció figyelmen kívül hagyása miatti hibák kismértékűek (5 %-nál nem nagyobbak) még akkor is, ha az oldószerben lévő ammónium-N oxidációja ingadozik a vizsgálati anyagot tartalmazó és a vakpróbatartályok között. Nitrogéntartalmú vizsgált anyagok esetében azonban súlyos hibák jelentkezhetnek.

Amennyiben a nitrifikáció bekövetkezett, de ez nem teljes, a reakciós keverék mért oxigénfelvétele helyesbíthető az ammónium nitritté és nitráttá oxidálásában felhasznált oxigén mennyiségével, ha a nitrit és a nitrát inkubálása során a koncentrációváltozásokat a következő egyenletek segítségével határozzák meg:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Teljes:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_2O \quad (3)$$

Az (1) egyenletből az ammónium-kloridban (NH_4C1) lévő 28 g nitrogén oxigénfelvétele a nitritté oxidálódás során 96 g, azaz a szorzótényező 3,43 (96/28). Hasonlóképpen a (3) egyenletből látható, hogy a 28 g nitrogén oxigénfelvétele, miközben nitráttá oxidálódik, 128 g, vagyis a szorzótényező 4,57 (128/28).

Mivel a reakciók szekvenciálisak, amelyeket meghatározott és egymástól különböző baktériumfajták hajtanak végre, lehetőség van a nitrit koncentrációjának növelésére vagy csökkentésére; az utóbbi esetben létrehozható a nitrát egyenértékű koncentrációja. Így a nitrátképződés során felhasznált oxigén értéke 4,57, szorozva a nitrát koncentrációjának növekedésével, míg a nitrit képződésével kapcsolatos oxigén értéke 3,43, szorozva a nitrit koncentrációjának növekedésével, vagy a koncentrációja csökkenése esetén az oxigénveszteség - 3,43 szorozva a koncentráció csökkenéssel.

Azaz:

A nitrátképződés során felhasznált O_2 = 4,57 * a nitrátkoncentráció növekedése (4)

és

Nitritképződés során felhasznált O_2 = 3,43 * a nitritkoncentráció növekedése (5)

és

Nitritkoncentráció csökkenésekor az elvesztett O_2 = - 3,43 * a nitritkoncentráció csökkenése (6)

úgy. hogy

Nitrifikációból adódó O_2-felvétel = ± 3,43 * nitritkoncentráció-változás + 4,57 * a nitrát-koncentráció növekedése (7)

és így

C-oxidációból adódó O_2-felvétel = teljes megfigyelt felvétel – nitrifikációból adódó felvétel (8)

Amennyiben csak a teljes oxidált nitrogént határozzák meg, a nitrifikáció miatti oxigénfelvétel első megközelítésben 4,57 x oxidált N-növekedés.

A C-oxidáció következtében létrejövő oxigénfelvétel helyesbített értékét ezután összehasonlítják a ThOD NH_3-mal a 2. függelékben bemutatott számításnak megfelelően.

▼B

C.5. LEBOMLÁS – BIOKÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E módszer célja a szilárd vagy folyékony szerves anyagok biokémiai oxigénigényének (BOD) meghatározása.

A módszerrel kapott adatok vízben oldható vegyületekre vonatkoznak; azonban elvben illékony vegyületek és vízben kis mértékben oldható vegyületek is vizsgálhatók.

A módszer csak az olyan szerves anyagokhoz alkalmazható, amelyek a vizsgálatban használt koncentráció mellett nincsenek gátló hatással a baktériumokra. Amennyiben a vizsgált anyag a vizsgálati koncentráció mellett nem oldható, különleges intézkedéseket kell alkalmazni a vizsgált anyag megfelelő mértékű diszpergálása céljából, például az ultrahangos diszpergálás használatával.

A vizsgált anyag toxicitására vonatkozó információk hasznosaknak bizonyulhatnak az alacsony vizsgálati eredmények értelmezése és a megfelelő vizsgálati koncentráció kiválasztásában.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A BOD: az adott anyagot tartalmazó oldat meghatározott mennyiségének meghatározott körülmények között biokémiai oxidációjához szükséges oldott oxigén tömege.

Az eredményeket BOD gramm/vizsgált anyag gramm formájában fejezik ki.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Célszerű megfelelő referenciaanyag használata az oltóanyag aktivitásának ellenőrzése érdekében.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Alkalmas oldószerben feloldott vagy diszpergált, előre meghatározott anyagmennyiséget mikroorganizmusokkal beoltanak, és sötét helyen, állandó, meghatározott környezeti hőmérsékleten inkubálnak.

A BOD-t az oldott oxigéntartalomnak a vizsgálat elején és végén mért különbségével határozzák meg. A vizsgálat időtartamának legalább 5 napnak és legfeljebb 28 napnak kell lennie.

E vizsgálattal párhuzamosan vizsgált anyagot nem tartalmazó vakpróbát kell elvégezni.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A BOD-meghatározás nem tekinthető valamely anyag biológiai lebonthatósága érvényes meghatározásának. E vizsgálat csak screening-vizsgálatnak tekinthető.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát vagy diszperzióját az alkalmazott módszerhez megfelelő BOD-koncentráció megállapítása érdekében. Ezután megfelelő nemzeti vagy nemzetközi szabvány alkalmazásával meghatározzák a BOD-t.

▼B

2. **ADATOK ES ÉRTÉKELÉS**

A kiválasztott standardizált módszernek megfelelően kiszámítják az induló oldat BOD-értékét, majd átszámítják ezt BOD (gramm)/-vizsgált anyagra (gramm).

3. **JELENTÉS**

Meg kell adni az alkalmazott módszert.

A biokémiai oxigénigényt legalább három érvényes mérés átlagaként kell meghatározni.

Minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést meg kell adni, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire, fizikai állapotára, toxikus hatásaira és jellemző összetételére, amely befolyásolhatja az eredményt.

A vizsgálati jelentésben fel kell tüntetni, ha a biológiai nitrifikáció gátlása céljából segédanyagot használnak.

4. SZAKIRODALOM

Szabványok jegyzéke, például:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemish 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. LEBOMLÁS – KÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

E módszer célja szilárd vagy folyékony szerves anyagok kémiai oxigénigényének (COD) mérése tetszőleges, standardizált módon megállapított laboratóriumi körülmények mellett.

Az anyag képletére vonatkozó információk hasznosak e vizsgálat végrehajtásához és a kapott eredmények értelmezéséhez (például klórozott szerves vegyületek, szerves vegyületek vassói, halogénsók).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A kémiai oxigénigény valamely anyag oxidálhatóságának a mértéke, meghatározott laboratóriumi körülmények között az anyag által felhasznált valamilyen oxidáló reagenssel egyenértékű oxigénmennyiségben kifejezve.

Az eredményt COD (gramm)/vizsgált anyag (gramm) formában fejezik ki.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nem kell minden új anyag vizsgálatakor referenciaanyagokat alkalmazni. Ezeknek elsősorban a módszer megfelelőségének időnkénti ellenőrzésére és arra kell szolgálniuk, hogy lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Vízben feloldott vagy diszpergált, előre meghatározott anyagmennyiséget oxidálnak erős kénsavoldatban lévő kálium-dikromáttal, ezüst-szulfátot használva katalizátorként, két órán át reflux mellett. Szabványosított, vas-ammónium-szulfáttal végrehajtott titrálással meghatározzák a maradék dikromátot.

Klórtartalmú anyagok esetében hozzáadnak higany-szulfátot ([1]), a klorid okozta zavaró hatás csökkentésére.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A meghatározás tetszőleges módja miatt a COD-t „oxidálhatósági mérőszámnak” kell tekinteni, és mint ilyet, gyakorlati módszerként használják szerves anyag mérésére.

A klorid zavarhatja e vizsgálatot; továbbá a szervetlen redukálóvagy oxidálószerek is befolyásolhatják a COD-meghatározást.

Néhány gyűrűs vegyületet és sok illékony anyagot (például alacsony szénatomszámú zsírsavak) nem teljesen oxidál ez a vizsgálat.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Elkészítik az anyag oldatát vagy diszperzióját 250 és 600 mg/l közötti COD létrehozására.

([1]) A higanysókat tartalmazó oldatokat használat után megfelelő módon kell kezelni, hogy a higany ne kerüljön ki a környezetbe.

▼B

Megjegyzések:

Rosszul oldódó és nem diszpergálható anyagok esetében kimérhető körülbelül 5 mg COD-nek megfelelő, finomra porított anyag vagy folyékony anyag, és vízzel együtt a kísérleti berendezésbe helyezhető.

Gyakran és különösen a rosszul oldódó anyagok esetében a kémiai oxigénigény (COD) előnyösen meghatározható a módszer egyik változatával, azaz egy nyomáskiegyenlítővel ellátott zárt rendszerben (H. Kelkenberg, 1975). E módosított változattal gyakran mennyiségileg sikeresen határozhatók meg azok a vegyületek, amelyek a hagyományos módszerrel csak nehezen határozhatók meg – ilyen például az ecetsav. Azonban ez a módszer sem alkalmas piridin esetében. Amennyiben az (1) szakirodalomban előírt módon a kálium-dikromát koncentrációt 0,25 N-re (0,0416 M) növelik, ez megkönnyíti az anyag 5–10 mg-os mennyiségének közvetlen bemérését, amely lényeges a vízben rosszul oldódó anyagok COD-értékének meghatározásához ((2) szakirodalom)).

A COD-t ezután valamilyen alkalmas nemzeti vagy nemzetközi szabványt követve kell meghatározni.

2. **ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS**

A kísérleti lombikban lévő COD-t a kiválasztott standardizált módszer segítségével kell kiszámítani és átszámítani COD (gramm)/-vizsgált anyag (gramm) formába.

3. **JELENTÉS**

Meg kell adni a használt referencia-módszert.

A kémiai oxigénigényt legalább három mért érték középértékeként kell megadni. Minden, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges információt és megjegyzést meg kell adni, különösen az anyag szennyeződéseivel, fizikai állapotával és jellemző tulajdonságaival kapcsolatosakat (amennyiben ismertek), amelyek hatással lehetnek az eredményekre.

Amennyiben a klorid befolyásoló hatásának minimalizálása céljából higany-szulfátot használnak, ezt is meg kell adni a vizsgálati jelentésben.

4. **SZAKIRODALOM**

(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.

A szabványok jegyzéke, például:

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. LEBOMLÁS – ABIOTIKUS LEBOMLÁS: HIDROLÍZIS A PH FÜGGVÉNYÉBEN

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 111 (2004) vizsgálattal.

1.1. BEVEZETÉS

Vegyszerek többféle úton juthatnak a felszíni vizekbe: közvetlen bejuttatással, permetezett anyag elsodródásával, beömléssel, a csapadékvíz-elvezető rendszerből, hulladéklerakással, ipari, háztartási vagy mezőgazdasági szennyvizekkel, légköri lerakódás útján; a felszíni vizekbe jutó vegyszerek a vízben kémiai (pl. hidrolízis, oxidáció), fotokémiai és/vagy mikrobiális folyamatokkal átalakulhatnak. Ez az útmutató az (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) útmutatások alapján olyan laboratóriumi vizsgálati módszert mutat be, amely a környezetben rendszerint előforduló pH-értékek (4–9) mellett a vegyszerek vizes közegben lejátszódó abiotikus hidrolízises átalakulásának vizsgálatára alkalmas.

A vizsgálat célja i. a pH-érték függvényében a vizsgált anyag hidrolízissebességének meghatározása; ii. azon hidrolízistermékek mibenlétének, illetőleg képződési és csökkenési sebességének meghatározása, amelyekkel élő szervezetek találkozhatnak. Ezekre a vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében lehet szükség, amelyek közvetlenül a vízbe jutnak, illetőleg az említett más módokon a környezetbe kerülhetnek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A 2. függelék szerint.

1.3. A MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

A módszer általában olyan (jelzés nélküli vagy jelölt) vegyi anyagokra alkalmazható, amelyek kimutatására megfelelő pontosságú és érzékenységű analitikai módszer áll rendelkezésre. Enyhén illékony és nem illékony, vízben megfelelően oldható vegyületekre egyaránt alkalmazható. A módszert nem szabad olyan vegyi anyagokra alkalmazni, amelyek vízben fokozottan illékonyak (pl. gáznemű növényvédő szerek, szerves oldószerek), ezért a vizsgálat során érvényesülő kísérleti körülmények között nem tarthatók oldatban. A vizsgálat nehezen végezhető vízben csekély mértékben oldódó anyagokkal (8).

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Különböző pH-értékű (4, 7 és 9) steril vizes pufferoldatokat a vizsgálandó anyaggal kezelünk, majd sötétben, ellenőrzött laboratóriumi körülmények között (állandó hőmérsékleten) inkubáljuk őket. A pufferoldatokban lévő vizsgált anyagot és a hidrolízistermékeket megfelelő időközönként elemezzük. A tömegmérleg könnyebben meghatározható, ha a vizsgált anyag jelölt (pl. ^{14}C-vel).

A vizsgálati módszer többfokozatú, működését az 1. függelék mutatja be és magyarázza el. Az egyes fokozatok szükségességét a megelőző fokozat eredményei határozzák meg.

▼B

1.5. INFORMÁCIÓK A VIZSGÁLT ANYAGRÓL

A hidrolízis sebességének mérése jelzés nélküli vagy jelölt anyagon végezhető el. A jelölt anyag általában a hidrolízis folyamatának tanulmányozása és a tömegmérleg megállapítása szempontjából előnyös, ugyanakkor speciális esetekben a jelölés nem feltétlenül szükséges. A jelölést ^{14}C-vel célszerű végezni, de más izotóp, például ^{13}C, ^{15}N vagy ^{3}H is alkalmazható. Amennyire csak lehet, a jelölést a molekula legstabilabb részében vagy részeiben kell elhelyezni. Ha például a vizsgált anyag egygyűrűs, akkor a jelölést ebben a gyűrűben kell elhelyezni; ha a vizsgált anyag két vagy több gyűrűt tartalmaz, akkor célszerű lehet külön vizsgálatok révén tanulmányozni az egyes jelölt gyűrűk sorsát, hogy megfelelő információkat nyerjünk a hidrolízistermékek képződéséről. A vizsgálandó anyag tisztasága legyen legalább 95 %.

A hidrolízisvizsgálat elvégzéséhez ismerni kell a vizsgált anyag:

a) vízben való oldhatóságát (A.6. vizsgálati módszer);

b) szerves oldószerekben való oldhatóságát;

c) gőznyomását (A.4. vizsgálati módszer) és/vagy Henry-állandóját;

d) n-oktanol/víz megoszlási együtthatóját (A.8. vizsgálati módszer);

e) disszociációállandóját (pK_a) (OECD 112. útmutató) (9);

f) közvetlen és közvetett fototranszformációjának sebességét vízben (szükség esetén).

Rendelkezésre kell állniuk a vizsgált anyag mennyiségi meghatározására, valamint szükség szerint a vizes oldatokban keletkező hidrolízistermékek mibenlétének és mennyiségének meghatározására alkalmas analitikai módszereknek (lásd még az 1.7.2. szakaszt).

1.6. REFERENCIAANYAGOK

A hidrolízistermékek mibenlétének és mennyiségének spektroszkopikus és kromatográfiás vagy egyéb, kellő érzékenységű módszerekkel történő meghatározásához lehetőség szerint referenciaanyagokat kell használni.

1.7. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

1.7.1. **Visszanyerés**

A vizsgált anyag hozzáadását követően azon nyomban, legalább két párhuzamos pufferoldaton vagy kivonaton végzett elemzés kiindulási információval szolgál az analitikai módszer megismételhetőségéről és a vizsgált anyag bevitelére alkalmazott eljárás egységességéről. A vizsgálat későbbi fázisaiban a visszanyerést a tömegmérlegek adják meg (jelölt anyag használata esetén). Jelölt és nem jelölt anyagok esetén a visszanyerésértékeknek 90 % és 110 % között kell lenniük (7). Ha műszakilag nehéz ezt a tartományt elérni, akkor nem jelölt anyag esetén kellő indoklással 70 %-os visszanyerés is elfogadható.

▼B

1.7.2. **Az analitikai módszer megismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgált anyag és a hidrolízistermékek mennyiségi meghatározására alkalmazott analitikai módszer(ek) megismételhetősége utólag úgy ellenőrizhető, hogy akkor, amikor már a mennyiségek meghatározásához elegendő hidrolízistermék keletkezett, ugyanazt a puffer-oldatot (vagy kivonatát) ismételt elemzésnek vetjük alá.

Az analitikai módszer érzékenységének olyannak kell lennie, hogy a vizsgált anyag mennyiségének meghatározását akkor is biztosítsa, amikor annak koncentrációja a kezdeti koncentráció 10 %-ára vagy még kisebb értékre lecsökkent. Az adott esetnek megfelelően az analitikai módszereknek olyan érzékenységűnek kell lenniük, hogy (a vizsgálat során bármikor) a csúcskoncentráció 25 %-áig vagy egy annál kisebb értékig lehetővé tegyék az alkalmazott dózis legalább 10 %-át kitevő hidrolízistermékek mennyiségének meghatározását.

1.7.3. **A hidrolízis kinetikai adatainak konfidenciaintervalluma**

Minden regressziós együttható, reakciósebességi állandó, felezési idő és bármilyen más kinetikai paraméter (pl. DT_{50}) esetében ki kell számítani és be kell mutatni a konfidenciaintervallumokat.

1.8. A VIZSGÁLT MÓDSZER LEÍRÁSA

1.8.1. **Készülékek és műszerek**

A vizsgálatokat szükség szerint üvegedényekben (pl. kémcsövekben, kis palackokban) kell elvégezni sötét és steril körülmények között, kivéve akkor, ha korábbról olyan információk állnak rendelkezésre (például az n-oktanol/víz megoszlási együttható alapján), hogy a vizsgált anyag az üveghez tapadhat. Ilyenkor célszerű lehet megfontolni más anyag (például teflon) alkalmazását. Az üveghez tapadás problémája a következő módszerek valamelyikével vagy egyszerre többel is csökkenthető lehet:

— a vizsgálati edényhez szorbeálódott hidrolízistermékek és a vizsgált anyag tömegének meghatározásával,

— ultrahangos fürdő alkalmazásával,

— az egyes mintavételek időpontjában az üvegedények oldószerrel történő elmosásával,

— formulázott termékek használatával,

— több társoldószer alkalmazásával a vizsgált anyag rendszerhez adagolásakor (az alkalmazott társoldószer nem hidrolizálhatja a vizsgált anyagot).

A különböző vizsgálati oldatok inkubálásához rendszerint szabályozott hőmérsékletű vízfürdőrázóra vagy termosztatikusan szabályozott inkubátorra van szükség.

Standard laboratóriumi felszerelés szükséges, beleértve különösen a következőket:

— pH-mérő,

▼B

— analitikai eszközök, mint például GC-, HPLC-, TLC-berendezés, beleértve a radioaktív és nem jelölt anyagok elemzésére alkalmas, illetve az inverz izotópos hígításos módszerben szükséges kimutatási rendszereket,

— az anyagok mibenlétének meghatározására alkalmas eszközök (pl. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR stb.),

— folyadékszcintillációs számláló,

— választótölcsérek a folyadék-folyadék extrakcióhoz,

— műszerek oldatok és kivonatok koncentrálására (pl. forgó bepárló),

— hőmérséklet-szabályozó eszköz (pl. vízfürdő).

A kémiai reagensek között szükség van például:

— analitikai tisztaságú szerves oldószerekre: hexánra, diklórmetánra stb.,

— szcintillációs folyadékra,

— pufferoldatokra (részletesebben lásd az 1.8.3. szakaszban).

A hidrolízis során használt minden üveget, reagens tisztaságú vizet és pufferoldatot sterilizálni kell.

1.8.2. **A vizsgált anyag bevitele**

A vizsgált anyagot vizes oldat formájában kell a különböző pufferoldatokba bevinni (lásd a 3. függeléket). Ha a megfelelő oldódáshoz szükséges, a vizsgált anyag beviteléhez kis mennyiségű, vízzel elegyedő oldószer (pl. acetonitril, aceton, etanol) is felhasználható, de ennek mennyisége rendszerint legfeljebb 1 térfogatszázalék lehet. Nagyobb koncentrációjú oldószer alkalmazása csak akkor engedhető meg (például rosszul oldódó vizsgált anyag esetén), ha kimutatható, hogy az oldószernek nincs hatása a vizsgált anyagok hidrolízisére.

Formulázott terméket rutinszerűen nem ajánlatos használni, mivel nem zárható ki, hogy a formulázási összetevők befolyásolják a hidrolízis folyamatát. Ugyanakkor vízben rosszul oldódó vizsgált anyag vagy az üveghez hozzátapadó anyag esetében (lásd az 1.8.1. szakaszt) a formulázott anyag megfelelő alternatívát jelenthet.

A vizsgált anyagból egyetlen koncentrációt kell használni; ez a koncentráció nem haladhatja meg a 0,01 M-t vagy a telítettségi koncentráció felét (lásd az 1. függeléket).

▼B

1.8.3. **Pufferoldatok**

A hidrolízisvizsgálatot három pH-értéken kell végrehajtani: 4, 7 és 9. Ehhez reagens tisztaságú vegyi anyagok és víz felhasználásával pufferoldatokat kell készíteni. A 3. függelék bemutat néhány hasznos pufferrendszert. Megjegyzendő, hogy az alkalmazott pufferrendszer hatással lehet a hidrolízis sebességére, ezért ha ilyen hatást észlelünk, akkor másik pufferrendszert kell igénybe venni ([1]).

Az egyes pufferoldatok pH-értékét kalibrált pH-mérővel az előírt hőmérsékleten legalább 0,1 pH pontossággal ellenőrizni kell.

1.8.4. **Vizsgálati körülmények**

1.8.4.1. *Vizsgálati hőmérséklet*

A hidrolízisvizsgálatokat állandó hőmérsékleteken kell elvégezni. Az extrapoláció szempontjából fontos, hogy a hőmérséklet ± 0,5 °C-os tartományon belül maradjon.

Ha a vizsgált anyag hidrolitikus viselkedése nem ismert, 50 °C-os hőmérsékleten elővizsgálatot (1. fokozat) kell végezni. A magasabb fokozatú kinetikai vizsgálatokat legalább három hőmérsékleten (beleértve az 50 °C-on elvégzett vizsgálatot is) kell elvégezni, kivéve akkor, ha az 1. fokozatú vizsgálatban a vizsgált anyag hidrolízis szempontjából stabilnak mutatkozott. Hőmérséklet-tartományként 10–70 °C-ot javaslunk (lehetőleg legalább egy hőmérsékletérték 25 °C-nál kisebb legyen), ugyanis ebben a tartományban mind a 25 °C-os referenciahőmérséklet, mind a területen előforduló legtöbb hőmérséklet megtalálható.

1.8.4.2 *Fényviszonyok és oxigén*

A hidrolízisvizsgálatok során a fotolitikus hatásokat tetszőleges, erre alkalmas módszerrel ki kell zárni. Mindent meg kell tenni az oxigén elkerülése érdekében (például az oldat elkészítése előtt 5 percig hélium, nitrogén vagy argon buborékoltatásával).

1.8.4.3. *A vizsgálat időtartama*

Az elővizsgálatot 5 napig, a magasabb fokozatú vizsgálatokat a vizsgált anyag 90 %-os hidrolizálásáig, de legfeljebb 30 napig kell végezni.

1.8.5. **A vizsgálat végrehajtása**

1.8.5.1. *Elővizsgálat (1. fokozat)*

Az elővizsgálatot 50 ± 0,5 °C-on és 4,0, 7,0 és 9,0 pH-értékeken végezzük. Ha 5 nap után a hidrolízis mértéke 10 %-nál kisebb ($t_{0,5\ 25\ °C}$ > 1 év), akkor a vizsgált anyag hidrolízis szempontjából stabilnak tekintendő, és rendszerint nincs szükség további vizsgálatokra. Ha tudjuk, hogy az anyag környezeti szempontból releváns hőmérsékleteken instabil ([2]), akkor az elővizsgálatot nem kell elvégezni. Az analitikai módszernek kellő pontosságúnak és érzékenységűnek kell lennie ahhoz, hogy a kezdeti koncentráció 10 %-os csökkenése kimutatható legyen.

([1]) Mabey és Mill foszfát helyett borát- vagy acetátpufferek alkalmazását javasolja (11).

([2]) Erre vonatkozó információ más forrásokból, például szerkezetileg hasonló vegyületek szakirodalmi hidrolízisadataiból vagy a vizsgált anyaggal korábban elvégzett félkvantitatív hidrolízisvizsgálatokból is származhat.

▼B

1.8.5.2. *Instabil anyagok hidrolízise (2. fokozat)*

A magasabb fokozatú (részletesebb) vizsgálatot azokon a pH-értékeken kell elvégezni, amelyeken a vizsgált anyag a fenti elővizsgálatban instabilnak mutatkozott. A vizsgált anyag pufferelt oldatait a kiválasztott hőmérsékleteken kell tartani. Az elsőrendű viselkedés vizsgálatához minden reakcióoldatot rendesen olyan időközönként kell elemezni, hogy a vizsgált anyag 10 %-os és 90 %-os hidrolízise között legalább hat, egymástól kellő távolságban elhelyezkedő adatpontot kapjunk. Az egyes párhuzamos vizsgálati mintákat (külön reakcióedényekben tartott legalább két azonos mintát) legalább hathat mintavételi időpontban ki kell venni az edényből, és mindegyik minta tartalmát elemezni kell (így legalább tizenkét párhuzamos adatpontot nyerünk). Nem helyes eljárás, ha a párhuzamos mintákat egyetlen nagy minta egyenlő részekre osztásával állítjuk elő, és ezeket vizsgáljuk az egyes mintavételi időpontokban, mert ily módon nincs lehetőség az adatok változatosságának elemzésére, és a vizsgálati oldat szennyeződése is problémát jelenthet. A magasabb fokozat végén (azaz a 90 %-os hidrolízis elérése után vagy 30 nap elteltével) külön vizsgálattal ellenőrizni kell a sterilitást. Ha azonban bomlást (átalakulást) nem tapasztalunk, a sterilitást nem szükséges külön vizsgálni.

1.8.5.3. *A hidrolízistermékek meghatározása (3. fokozat)*

Minden olyan hidrolízisterméket, amely legalább az alkalmazott dózis 10 %-ának megfelelő mennyiségben keletkezik, megfelelő analitikai módszerrel azonosítani kell.

1.8.5.4. *Kiegészítő vizsgálatok*

Hidrolízis szempontjából instabil vizsgált anyag esetében szükséges lehet a 4, 7 és 9 pH-értéktől eltérő pH-értékeken is vizsgálatokat végezni. Fiziológiai megfontolásból például előfordulhat, hogy savasabb körülmények (pl. pH =1,2) közötti, fiziológiai szempontból releváns hőmérsékleten (37 °C) is kell vizsgálatot végrehajtani.

2. **ADATOK**

A vizsgált anyagok és a hidrolízistermékek (ha vannak) mennyiségét minden mintavételi időpontra, minden pH-értékre és hőmérsékletre vonatkozóan az alkalmazott kezdeti koncentráció százalékában, illetőleg szükség szerint mg/l-ben is meg kell adni. Jelölt vizsgált anyag esetén az alkalmazott kezdeti koncentráció százalékában a tömegmérleget is meg kell adni.

A jegyzőkönyvben a vizsgált anyag koncentrációinak értékét grafikusan, az idő függvényében logaritmikus léptékben ábrázolva kell megadni. Meg kell határozni a legalább az alkalmazott dózis 10 %-ának megfelelő mennyiségben keletkező hidrolízistermékek mibenlétét, és a vizsgált anyag mennyiségeit jelző koordináta-rendszerben logaritmikus léptékben ábrázolni kell mennyiségüket, ezzel szemléltetve keletkezésük és csökkenésük sebességét.

▼B

2.1. AZ EREDMÉNYEK FELDOLGOZÁSA

Megfelelő kinetikai modellszámításokkal a felezési időt vagy a DT_{50} értékét pontosabban is meg kell határozni. A felezési idő, illetve a DT_{50} értékét (konfidenciahatárokkal együtt) minden pH-értékre és hőmérsékletre meg kell adni, és ismertetni kell a felhasznált modellt, a kinetikai rendet és a korrelációs együtthatót (r^2). Ha vannak, a számításokat a hidrolízistermékekre is el kell végezni.

Ha a sebességértékek különböző hőmérsékleteken elvégzett vizsgálatokból származnak, akkor a hidrolízis pszeudo-elsőrendű reakciósebességi állandóját (k_{obs}) a hőmérséklet függvényében kell leírni. A számítást a k_{obs} savas katalizált, közömbös és lúgos katalizált hidrolízishez tartozó sebességi állandókra (rendre k_H, $k_{neutral}$, és k_{OH}) történő bontásával, az Arrhenius-egyenlet alapján kell elvégezni:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

ahol A_i és B_i a kelvinben megadott T abszolút hőmérséklet reciproka függvényében ábrázolt ln k_i értékekre lineáris regresszióval fektetett egyenesek regressziós állandói (metszete, illetve meredeksége). Az Arrhenius-összefüggést a savas katalizált, a közömbös és a lúgos katalizált hidrolízisre alkalmazva a pszeudo-elsőrendű reakciósebességi állandók, és így a felezési idők olyan hőmérsékletekre is előállíthatók, amelyek esetében nincs mód a reakciósebességi állandó közvetlen kísérleti meghatározására (10).

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

A legtöbb hidrolízisreakció jó közelítéssel elsőrendű folyamat, tehát a felezési idő független a koncentrációtól (lásd a 2. függelék 4. egyenletét). Ez rendszerint lehetőséget ad arra, hogy a laboratóriumban 10^{-2}-től 100^{-3} M nagyságrendű koncentrációval nyert eredményekből következtessünk a környezetben előforduló értékekre (ahol a koncentrációk 10^{-6} vagy az alatti nagyságrendűek) (10). Mabey és Mill (11) több olyan esetről is beszámolt, amikor különböző vegyi anyagok esetében megfelelő egyezést tapasztaltak a hidrolízis tiszta és természetes vizekben mért reakciósebessége tekintetében, feltéve hogy mind a pH-értéket, mind a hőmérsékletet mérték.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— közhasználatú név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyag esetén a jelzés helyének feltüntetésével) és a releváns fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt),

— a vizsgált anyag tisztasága (szennyeződések),

— a jelölt vegyi anyag tisztasága és moláris aktivitása (ha szükséges).

▼B

— Pufferoldatok:

— a készítés dátuma és részletes adatai,

— alkalmazott puffer és víz,

— a pufferoldatok molaritása és pH-ja.

A vizsgálat körülményei:

— a vizsgálatok elvégzésének napja és a végrehajtás módja,

— a bevitt vizsgált anyag mennyisége,

— a vizsgált anyag bevitelének módszere, az oldószerek (típus és mennyiség),

— a vizsgált anyag inkubált pufferolt oldatainak térfogata,

— az alkalmazott inkubációs rendszer leírása,

— pH és hőmérséklet a vizsgálat alatt,

— mintavételi időpontok,

— az extrakció módszere(i),

— a pufferoldatokban lévő vizsgált anyag és hidrolízistermékek mennyiségének és mibenlétének meghatározására alkalmazott módszerek,

— a párhuzamos minták száma.

Eredmények:

— az alkalmazott analitikai módszer megismételhetősége és érzékenysége,

— a visszanyert mennyiségek (a vizsgálat érvényességéhez szükséges százalékértékeket az 1.7.1. szakasz adja meg),

— a párhuzamos minták adatai és átlaguk táblázatos formában,

— tömegmérleg a vizsgálatok alatt és végén (jelölt vizsgált anyag esetén),

— az elővizsgálat eredményei,

— az eredmények szöveges elemzése és értelmezése,

— valamennyi eredeti adat és ábra.

A következő információkat csak akkor kell megadni, ha a hidrolízis sebességét is meghatározzuk:

— a vizsgált anyag koncentrációinak ábrázolása az idő függvényében, és ha van, a vizsgált hidrolízistermékek ábrázolása minden pH-értéken és hőmérsékleten,

— a 20 °C/25 °C hőmérsékletre vonatkozó Arrhenius-egyenlet eredményei táblázatban összefoglalva, a pH, a reakciósebességi állandó [tf^{-1} vagy nap^{-1}], a felezési idő vagy a DT_{50}-érték, a hőmérsékletek [°C], továbbá mindezen adatok konfidenciahatárai és korrelációs együtthatói (r^2) vagy más hasonló adatai,

— a hidrolízis vélt folyamata.

▼B

4. **HIVATKOZÁSOK**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Európai Unió (EU) (1995). A Bizottság 95/36/EK irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról. 5. melléklet: A hatóanyag sorsa és viselkedése a környezetben.

(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 (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(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.

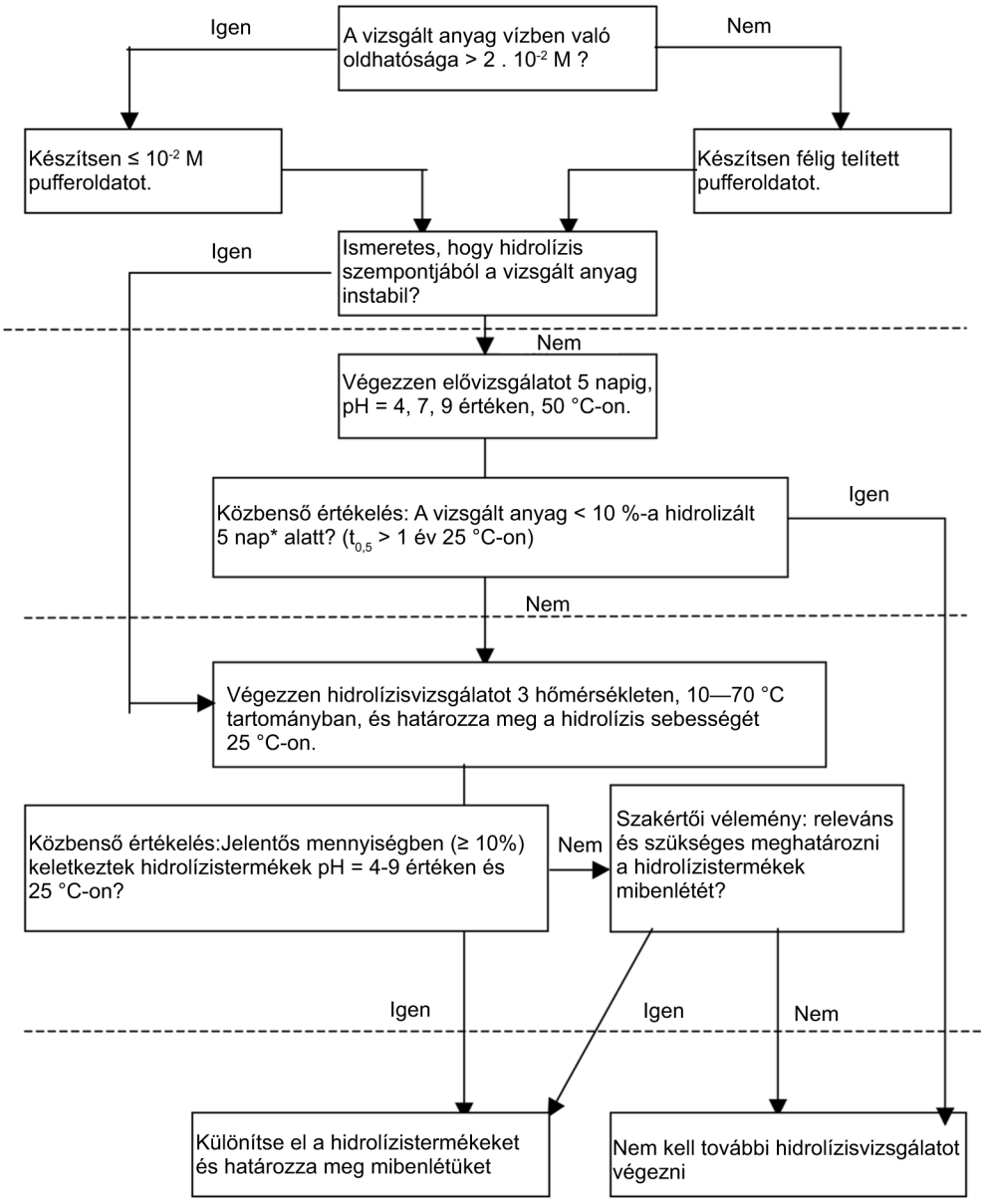
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997). Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(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

1. függelék

A hidrolízisvizsgálat többfokozatú rendszere



* A vizsgált anyag 10 %-os hidrolízise 50 °C-on kb. 30 nap, 25 °C-on kb. 1 év felezési időnek felel meg.

▼B

2. függelék

Fogalommeghatározások és mértékegységek

Minden esetben **szabványos nemzetközi (SI-) mértékegységet** kell használni.

Vizsgált anyag: tetszőleges anyag, legyen szó kiindulási anyagról vagy átalakulási termékről.

Átalakulási termék: a vizsgált anyag biotikus vagy abiotikus átalakulási reakciói eredményeképpen létrejött anyag.

Hidrolízistermék: a vizsgált anyag hidrolitikus reakciói eredményeképpen létrejött anyag.

Hidrolízis: valamely RX vizsgált anyag reakciója vízzel, amelynek során a hangsúly az OH-val helvettesítődő X csoport összmennyiségén van:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Az RX koncentrációjának csökkenési sebességét a következő összefüggés adja meg:

sebesség = $k\ [H_2O]\ [RX]$ másodrendű reakció

vagy

sebesség = $k\ [RX]$ elsőrendű reakció,

a reakciósebességet megszabó részreakciótól függően. Mivel a víz jóval nagyobb arányban van jelen, mint a vizsgált anyag, az ilyen típusú reakciót rendszerint pszeudo-elsőrendű reakciónak tekintjük, amelynek tapasztalati reakciósebességi állandóját a következő összefüggés adja:

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

A reakciósebességi együttható a következő összefüggésből határozható meg (*):

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

ahol

t = az idő;

C_o, C_t pedig = az RX koncentrációja a nulladik, illetve a t időpontban.

Az együttható dimenziója (idő)$^{-1}$, a reakció felezési idejét (az RX 50 %-ának reakciójához szükséges időt) pedig a következő összefüggés adja meg:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Felezési idő ($t_{0,5}$): a vizsgált anyag 50 %-os hidrolíziséhez szükséges idő, ha a reakció folyamata elsőrendű kinetikával leírható. A felezési idő független a koncentrációtól.

(*) Ha a logaritmikus léptékben az idő függvényében ábrázolt adatok nem lineáris függvényt (azaz nem elsőrendű folyamatot) mutatnak, akkor a [3] képlet nem alkalmas a vizsgált vegyület hidrolízisét leíró reakciósebességi együttható meghatározására.

▼B

DT $_{50}$ (50 %-os lebomlási idő): az az idő, amelyen belül a vizsgált anyag koncentrációja 50 %-kal lecsökken; ha a reakció folyamata nem elsőrendű kinetikát követ, akkor ez a mennyiség nem azonos a $t_{0,5}$ felezési idővel.

k becslése különböző hőmérsékleteken

Ha két hőmérsékleten ismerjük a reakciósebességi állandót, akkor az egyéb hőmérsékletekhez tartozó reakciósebességi állandó az Arrhenius-egyenletből számítható:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ vagy } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Az l/T függvényében ábrázolt In k értékek –E/R meredekségű egyenest adnak.

Az előző képletben:

k = a különböző hőmérsékleteken mért reakciósebességi állandó;

E = az aktiválási energia [kJ/mol];

T = az abszolút hőmérséklet [K];

R = a gázállandó [8,314 J/mol.K].

Az aktiválási energiát regresszióanalízissel vagy a következő egyenlettel számítjuk:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

ahol $T_2 > T_1$.

▼B

3. függelék

Pufferrendszerek

CLARK ÉS LUBS:

CLARK- és LUBS-féle pufferkeverékek (*)

Összetétel	pH
0,2 N HCl és 0,2 N KCl 20 °C-on	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl 100 ml-ig hígítva	2,2
0,1 M kálium-ftalát + 0,1 N HCl 20 °C-on	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	3,8
0,1 M kálium-ftalát + 0,1 N NaOH 20 °C-on	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	4,8

(*) A táblázatokban szereplő pH-értékek a Sörensen-féle normálegyenletek (1909) felhasználásával, potenciálmérésekből kerültek meghatározásra. A megfelelő pH-értékek 0,04-dal nagyobbak a táblázatban található értékeknél.

▼B

Összetétel	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-ig hígítva	6,0

CLARK- és LUBS-féle pufferkeverékek (folytatás)

0,1 M monokálium-foszfát + 0,1 N NaOH 20 °C-on	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-ig hígítva	8,0
0,1 M $H_3BO_3$0,1 M KCl-ban + 0,1 N NaOH 20 °C-on	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml borsav 100 ml-ig hígítva	10,0

B. **KOLTHOFF ÉS VLEESCHHOUWER:**

KOLTHOFF és VLEESCHHOUWER-féle citrátpufferek

Összetétel	pH
0,1 M monokálium-citrát és 0,1 N HCl 18 ºC-on (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,6
0,1 M monokálium-citrát es 0,1 N NaOH 18 ºC-on (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrát 100 ml-ig hígítva	6,0

(*) A penészképződés megakadályozása érdekében adjunk az elegyhez egy kisméretű timolkristályt vagy hasonló anyagot.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

SÖRENSEN-féle boraxkeverékek

Összetétel 1		Sörensen 18 °C	Walbum, pH a következő hőmérsékleten H a következő h hőmérsékleten		
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

SÖRENSEN-féle foszfátkeverékek

Összetetel	pH
0,0667 M monokálium-foszfát + 0,0667 M dinátrium-foszfát 20 °C-on	
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. TOXICITÁS FÖLDIGILISZTÁKRA

MESTERSÉGES TALAJBAN VÉGZETT VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A szóban forgó laboratóriumi vizsgálatban a vizsgált anyagot olyan mesterséges talajhoz adják hozzá, amelyben 14 napra földigilisztákat helyeznek el. Ezt az időszakot követően (másik lehetőségként hét nap elteltével) megvizsgálják az anyagnak a földigilisztákra gyakorolt letális hatását. A módszer a vegyi anyagnak a földigilisztákra a bőrükön keresztül, illetve a tápcsatornából történő felszívódás következtében gyakorolt hatásának viszonylag gyors kiszűrését teszi lehetővé.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁS ÉS MÉRTÉKEGYSÉG

LC_{50}: Az anyagnak az a koncentrációja, amely a vizsgálati időszak alatt a kísérleti állatok 50 %-át pusztítja el.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Rendszeres időközönként referenciaanyagot kell használni annak igazolására, hogy a vizsgálati rendszer érzékenysége nem változott-e jelentős mértékben.

Referenciaanyagként analitikai tisztaságú klór-acetamidot ajánlunk.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A talaj változó közeg, ezért a vizsgálathoz gondosan összeállított, mesterséges vályogtalajt kell használni. A vizsgált anyag különféle koncentrációival kezelt mesterséges talajban az *Eisenia foetida* (lásd a függelék megjegyzését) fajhoz tartozó felnőtt példányokat tartanak. A tárolóedények tartalmát a vizsgálat megkezdése után 14 nappal (és választhatóan hét nap elteltével) szétterítik egy tálcán, majd megszámolják az egyes koncentrációk mellett életben maradt földigilisztákat.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy az a vizsgált talaj és szervezet tekintetében minél jobban ismételhető legyen. A kontrollcsoportban az elhullási arány nem haladhatja meg a 10 %-ot, különben a vizsgálat nem értékelhető.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Anyagok*

1.6.1.1. Vizsgált talaj

Meghatározott összetételű mesterséges talajt kell használni.

a) Alapszubsztrátum (a száraz tömeg százalékában)

— 10 % tőzegmoha (Sphagnum) (a pH 5,5 és 6,0 közötti értékhez a lehető legközelebb, úgy, hogy ne maradjon benne látható növénymaradvány, finomra őrölve),

▼B

— 20 % kaolinitagyag, lehetőleg 50 %-nál több kaolinittel,

— körülbelül 69 % ipari kvarchomok (domináns mennyiségű finom homok, több mint 50 %-ban 0,05 és 0,2 mm közötti szemcsenagysággal). Ha az anyag vízben nem oszlatható el eléggé, edényenként 10 g homokot tartalékban kell tartani, hogy később hozzáadhassák a vizsgált szubsztrátumhoz,

— mintegy 1 % vegytiszta, porított kalcium-karbonát ($CaCO_3$) hozzáadásával a pH-t 6,0 ± 0,5-re állítják be.

b) Vizsgált szubsztrátum

A vizsgált szubsztrátum az alapszubsztrátumot, a vizsgált anyagot és az ionmentesített vizet tartalmazza.

Víztartalmának az alapszubsztrátum száraz tömegének 25 és 42 %-a közé kell esnie. A szubsztrátum víztartalmának meghatározásához a mintát 105 °C-on állandó tömegig kell szárítani. A legfontosabb feltétel az, hogy a mesterséges talajt át kell nedvesíteni, de nem szabad azon víznek állni. Ügyelnünk kell rá, hogy a vizsgált anyagot és a vizsgált szubsztrátumot egyenletesen keverjük el egymással. A vizsgálati jelentésben fel kell jegyezni, hogyan vittük bele a vizsgált anyagot a szubsztrátumba.

c) Kontroll szubsztrátum

A kontroll szubsztrátum az alapszubsztrátumból és vízből áll. Ha bármely más adalékanyagot alkalmazunk, kiegészítő kontrollt is kell használni, amelyben az adott adalékanyagból ugyanannyi található.

1.6.1.2. Vizsgálati edények

Körülbelül egy liter űrtartalmú (szellőzőlyukakkal ellátott, műanyag fedővel, kupakkal vagy műanyag fóliával lefedett) üvegedények a szubsztrátum 500 g szárazanyag-tartalmának megfelelő mennyiségben a nedves vizsgált talajjal, illetve a kontrolltalajjal feltöltve.

1.6.2. *körülmények*

Az edényeket 20 ± 2 °C hőmérsékletű klímakamrában kell tartani folyamatos megvilágítás mellett. A fény intenzitásának 400 és 800 lux között kell lennie.

A vizsgálat időtartama 14 nap, de a mortalitást meg lehet vizsgálni a vizsgálat megkezdését követő hetedik napon is.

1.6.3. *A kísérlet végrehajtása*

Vizsgált koncentrációk

A vizsgált anyag koncentrációit az alapszubsztrátum száraz tömegéhez viszonyított tömegként adják meg (mg/kg).

Dózisbehatároló vizsgálat

Azon koncentrációtartományok, amelyek 0 és 100 % közötti mortalitást váltanak ki, előzetes vizsgálattal azonosíthatók azzal a céllal, hogy tájékozódjanak a részletes meghatározó vizsgálatban alkalmazható koncentrációtartományokról.

▼B

Az anyagot a következő koncentrációkban lehet vizsgálni: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg anyag/kilogramm vizsgált talaj (száraz tömeg).

Ha teljes körű meghatározó vizsgálatot akarunk végezni, az előzetes, dózisbehatároló vizsgálatban minden koncentrációra és a kezeletlen kontrollra elegendő egy-egy, 10 gilisztát tartalmazó vizsgálati csoport.

Meghatározó vizsgálat

Az előzetes, dózisbehatároló vizsgálat eredményeit arra használják fel, hogy a 0 és 100 % közötti mortalitási tartományban egy legalább öt koncentrációból álló mértani sort jelöljenek ki, amelyben az állandó szorzótényező legfeljebb 1,8.

Ezen vizsgálati sorral végzett vizsgálatok lehetővé teszik az LC_{50}-érték, illetve a konfidenciaszint lehető legpontosabb meghatározását.

A meghatározó vizsgálat során koncentrációnként legalább négy kísérleti csoportot és négy kezeletlen kontrollt kell használni, amelyek mindegyike 10-10 gilisztát tartalmaz. Ezen ismétlések eredményei adják az átlagértékeket és a normál szórást.

Ha két egymást követő és egymástól az 1,8-as faktort meghaladó mértékben nem különböző koncentráció csak 0 %-os és 100 %-os mortalitást ad, ezen értékek már elegendőek annak jelzésére, hogy az LC_{50} melyik tartományba esik.

Az alapszubsztrátum és a vizsgált talaj keveréke

A vizsgált talajt lehetőleg minden más szer hozzáadása nélkül, csak vízzel kell összeállítani. Közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt a vizsgált anyag ionmentesített vízben vagy egyéb oldószerben elkészített diszperzióját, illetve emulzióját elkeverik az alapszubsztrátummal, illetve finom kromatográfiás vagy ehhez hasonló szórókészülékkel egyenletesen eloszlatják az alapszubsztrátum felületén.

Ha a vizsgált anyag nem oldódik vízben, a lehető legkisebb mennyiségű megfelelő szerves oldószerben is feloldható (például hexánban, acetonban vagy kloroformban).

A vizsgált anyag oldatba vitelére, diszpergálására vagy emulgeálására csak könnyen illó oldószer használható. A vizsgált talajt a felhasználás előtt át kell szellőztetni. Az elpárolgott vízmennyiséget pótolni kell. A kontrollhoz bármely adalékanyagból azonos mennyiséget kell adni.

Ha a vizsgált anyag szerves oldószerekben egyáltalán nem oldódik, nem diszpergálható, és nem emulgeálható, finomra őrölt kvarchomok és a vizsgált anyag 500 g száraz tömegű mesterséges talaj kezelésére elegendő mennyiségének keverékéből 10 g-ot kell elkeverni 490 g száraz tömegű vizsgált talajjal.

Minden kísérleti csoportban 500 g száraz tömegnek megfelelő mennyiségű nedves vizsgált talajt helyeznek el, üvegedényenként 10 db gilisztával, amelyeket előzőleg hasonló nedves környezetben szoktattak 24 órán keresztül, majd gyorsan megmosták azokat, a felesleges vizet szűrőpapírral felszívatták, és a gilisztákat a szubsztrátum felületére helyezték.

▼B

A tárolóedényeket perforált műanyag fedővel, kupakkal vagy fóliával zárják le, hogy a talajt megóvják a kiszáradástól, majd 14 napon keresztül tartják a vizsgálati körülmények között.

Az értékelést a vizsgálat megkezdését követő 14. napon (és esetleg a 7. napon) lehet elvégezni. A talajt üveg- vagy rozsdamentes acéllemezen terítik szét. A gilisztákat megvizsgálják, és megállapítják a vizsgálatot túlélők számát. Az a giliszta tekinthető élettelennek, amely az elülső végét érő enyhe mechanikai ingerre nem reagál.

Ha a hetedik napon végeznek vizsgálatot, a tartályba visszatöltik a talajt, és a túlélő gilisztákat ugyanarra a vizsgálati talaj felületre helyezik vissza.

1.6.4. *Vizsgált organizmusok*

Vizsgált organizmusok: felnőtt *Eisenia foetida* példányok (lásd a függelék megjegyzését) (legalább két hónaposak, amelyeknél a clitellum [nyereg] már kialakult), 300 és 600 mg közötti nedves súllyal. (A tenyésztési módszereket lásd a függelékben.)

2. ADATOK

2.1. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS ÉRTELMEZÉSE

A vizsgált anyag koncentrációit rögzítik, mellettük megadva az egyes koncentrációkhoz tartozó elhullott gilisztáks számát százalékban.

Ha elegendő adat áll rendelkezésre, a szabványmódszerrel meg kell határozni az LC_{50}-értéket és a konfidencia-határértékeket ($p = 0,05$) (ezzel egyenértékű módszer Litchfield és Wilcox on, 1949). A vizsgált anyag LC_{50}-értékét milligrammban kell megadni a vizsgált talaj kilogrammjára (száraz tömeg) vonatkoztatva.

Azon esetekben, amikor a koncentrációs görbe túlságosan meredek az LC_{50} kiszámításához, ezen érték grafikus becslése is elegendő.

Ha két egymást követő és egymástól az 1,8-as szorzótényezőnél nagyobb mértékben nem különböző koncentráció csak 0 %-os és 100 %-os elhullást ad, ezen értékek már elegendőek annak jelzésére, hogy az LC_{50} melyik tartományba esik.

3. JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot a fent említett minőségi követelményeknek megfelelően végezték,

— az elvégzett vizsgálatok (előzetes, dózisbehatároló vizsgálat és/vagy meghatározó vizsgálat),

— a vizsgálati körülmények pontos leírása, illetve nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot a módszernek megfelelően végezték-e el; minden eltérést jelezni kell,

— annak pontos leírása, hogy a vizsgált anyagot hogyan keverték bele a vizsgált talajba,

— a felhasznált vizsgált organizmusokkal kapcsolatos információk (faj, kor, súlyszélsőértékek és -átlag, tartási és tenyésztési körülmények, származás),

▼B

— az LC_{50} meghatározásához használt módszer,

— az összes felhasznált adatot tartalmazó vizsgálati eredmények,

— a vizsgált organizmusok viselkedésében megfigyelt tünetek vagy változások leírása,

— a kontrollok mortalitása,

— az LC_{50}, illetve a legmagasabb vizsgált koncentráció, amely a vizsgálat beindítását követő 14 nappal (és esetleg hét nappal) már elhullást nem eredményezett, és a legkisebb vizsgált koncentráció, amely ugyanezen időpontban már 100 %-os elhullást eredményezett,

— a koncentráció-hatás görbe felvétele,

— a referenciaanyaggal kapott eredmények, akár a mostani vizsgálatokkal kapcsolatosan, akár korábbi minőség-ellenőrzési próbán nyerték azokat.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 207. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthsworms, Chapman and Hall, London, p. 331.

(3) Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Écologie et Systématique, Institut National de la Recherche Agronomique, p. 671.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. J.Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.

(5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- and Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxisitätstest am Regenwurm Eisenia foetida in künstlichem Boden”, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Függelék

A giliszták tenyésztése és tartása a vizsgálat előtt

Az állatok tenyésztéséhez 30–50 darab felnőtt gilisztára van szükség, amelyeket friss szubsztrátummal ellátott tenyésztőládába helyeznek, majd 14 nap múlva eltávolítják azokat. Ezen állatokat használhatják fel a további tenyészetekhez. A gubóból kikelt giliszta felnőtt (ivarérett) korában használható fel a vizsgálatokhoz (a leírt feltételek mellett ez két-három hónap után következik be).

Tenyésztési és tartási körülmények

Klímakamra:	20 ± 2 °C hőmérséklet, lehetőleg folyamatos megvilágítással (400 és 800 lux közötti fényintenzitással).
Tenyésztő ládák:	10–20 liter űrtartalmú, megfelelően lapos edények.
Szubsztrátum:	Az *Eisenia foetida* többféle állati ürüléken is tenyészthető. Tenyésztőközegként 50 térfogat-százalékos tőzeg és 50 térfogat-százalékos tehén vagy lótrágya keveréke ajánlott. A közeg pH-értéke körülbelül 6 és 7 között legyen (ezt kalcium-karbonáttal lehet szabályozni), és alacsony ionos vezetőképességgel kell rendelkeznie (6 mmhos-nál vagy 0,5 % sókoncentrációnál kevesebb). A szubsztrátum legyen nedves, de ne legyen túl vizes. A fent említett módszeren kívül még más sikeres módszer is alkalmazható.

Megjegyzés: Az *Eisenia foetida* két fajban létezik, amelyeket egyes taxonómusok külön alfajként írtak le (Bouche, 1972). Ezek morfológiailag nem különböznek, de egyikük, az *Eisenia foetida foetida* gyűrűin jellegzetes keresztirányú csíkozást vagy szalagokat találhatunk, amelyek a másikon, az *Eisenia foetida andrei* fajon nem jelennek meg, ellenben ennek vörösesebb színe van. Ha lehet, az *Eisenia foetida andrei* használatát javasoljuk. Más faj is használható, ha a hozzá szükséges módszertan rendelkezésre áll.

▼B

C.9. **BIOLÓGIAI LEBOMLÁS**

ZAHN–WELLENS VIZSGÁLAT

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E módszernek az a célja, hogy felmérje a vízoldékony, nem illékony szerves anyagok végső biológiai lebontásának lehetőségeit akkor, ha statikus vizsgálati körülmények között viszonylag nagy töménységű mikroorganizmusnak vannak kitéve.

A szuszpendált szilárd részecskéken fizikokémiai adszorpció is létrejöhet, és ezt az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd a 3.2. pontot).

A használni kívánt anyagokat 50 és 400 mg/liter közötti DOC-értékeknek, valamint 100 és 1 000 mg/liter közötti COD-értékeknek megfelelő koncentrációban vizsgáljuk (DOC = oldott szerves szén; COD = kémiai oxigénigény). E viszonylag magas koncentrációknak az az előnye, hogy analitikailag megbízhatóak. Mérgező tulajdonságú vegyületek késleltethetik vagy gátolhatják a lebomlás folyamatát.

E módszerben az oldott szerves szén vagy a kémiai oxigénigény mérését a vizsgált anyag végső biológiai lebonthatóságának felmérésére használjuk.

Az ezzel párhuzamosan alkalmazott analitikai módszer segíthet az anyag primer lebomlásának meghatározásában (a kiindulási molekulaszerkezet eltűnése).

A módszer csak olyan vizsgált szerves anyagra megfelelő, amely a vizsgálatban használt koncentrációban:

— a vizsgálati körülmények között vízben oldódik,

— páranyomása a vizsgálati körülmények között elhanyagolható,

— a baktériumokat nem gátolja,

— a vizsgálati rendszerben csak korlátozott mértékben szívódik fel,

— habképződés útján nem vész el a vizsgált oldatból.

A vizsgált anyag főbb összetevőinek egymáshoz viszonyított részarányának ismerete hasznos lehet a kapott eredmények értékeléséhez, különösen azon esetekben, amikor az eredmények (lebomlási értékek) alacsonyak vagy marginálisak.

Az anyag mikroorganizmusokra gyakorolt mérgező hatásának ismerete kívánatos az alacsony lebomlási értékek értékelésénél és a megfelelő vizsgált koncentrációk kiválasztásánál.

▼B

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A vizsgálat végén nyert lebomlási mértéket, mint a „Zahn–Wellens vizsgálatban kapott biológiai lebonthatóságot” kell értékelni,

$$D_t = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

ahol:

D_T = biológiai lebomlás (%) T idő alatt,

C_A = DOC- (vagy COD-) értékek a vizsgált keverékben a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva (mg/l) (DOC = oldott szerves szén, COD = kémiai oxigénigény)

C_T = DOC- (vagy COD-) értékek a vizsgált keverékben mintavételkor (mg/l),

C_B = DOC- (vagy COD-) értékek a vakpróbában mintavételkor (mg/l),

C_{BA} = DOC- (vagy COD-) értékek a vakpróbában a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva (mg/l)

A lebomlás mértékét a legközelebbi teljes százalékértékre kell kerekíteni.

A százalékos lebomlást a vizsgált anyag DOC- (vagy COD-) százalékának csökkenésével kell megadni.

A mért vagy számított kiindulási érték és a három óra elteltével mért érték közötti különbség hasznos információkkal szolgálhat az anyag megsemmisítésével kapcsolatban (lásd a 3.2. pontot, Az eredmények értelmezése).

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Egyes esetekben, ha új anyagokat vizsgálunk, hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása; konkrét referenciaanyagok ajánlása azonban egyelőre nem lehetséges.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Keverőszerkezettel és levegőztetőberendezéssel ellátott, négyliteres üvegedénybe élesztett iszapot, ásványi tápanyagokat és egyedüli szénforrásként a vizsgált anyagot helyeznek el a vizes oldatban. A keveréket kevertetik, levegőztetik, és 20 és 25 °C hőmérséklet között, diffúz megvilágításban vagy sötétkamrában tartják 28 napon keresztül. A lebomlási folyamatot a szűrt oldat DOC-, illetve COD-értékeinek naponkénti vagy egyéb megfelelő időközönként végzett meghatározása útján követik nyomon. Az indulást követő három óra elteltével mért érték és az egyes időközökben eltűnt DOC (vagy COD) mért értékeinek egymáshoz viszonyított arányát százalékos biológiai bomlás formájában fejezik ki, és ez szolgál a lebomlás adott időre számított mértékéül. Az eredményt az idő függvényében ábrázolva kapják meg a biológiai bomlás görbéjét.

Ha specifikus analitikai módszert használnak, mérhető a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai bomlás következtében előállott változása is (elsődleges biológiai bonthatóság).

▼B

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A vizsgálat kielégítő mértékű ismételhetőségét körvizsgálat bizonyította.

A módszer érzékenységét nagymértékben a vakpróba változékonysága és kisebb mértékben az oldott szerves szén, illetve a vizsgált vegyület folyadékkoncentrációjának kimutatási pontossága határozza meg.

1.6. A KÍSÉRLET VÉGREHAJTÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

1.6.1.1. Reagensek

A vizsgálathoz használt víz: kevesebb mint 5 mg/liter szerves szenet tartalmazó ivóvíz. A kalcium- és magnéziumionok együttes koncentrációja nem haladhatja meg a 2,7 mmol/litert; ellenkező esetben ionmentesített vagy desztillált vízzel való hígításra van szükség.

Kénsav, analitikai reagens (A.R.):	50g/l
Nátrium-hidroxid-oldat A.R.:	40 g/l
Ásványitápanyag-oldat: oldjunk fel egy liter ionmentesített vízben:	
ammónium-kloridot, NH4Cl, A.R.:	38,5 g
nátrium-dihidrogen-foszfátot, NaH2PO4.2H2O, A.R.:	33,4 g,
kálium-dihidrogén-foszfátot, KH2PO4, A.R.:	8,5 g,
dikálium-monohidrogén-foszfátot, KH2PO4, A.R.:	21,75 g.

A keverék tápoldatként és pufferként egyaránt szolgál.

1.6.1.2. Készülékek

Egy és négy liter közötti űrtartalmú üvegedények (pl. üveghengerek).

Üveg- vagy fémlapáttal ellátott és megfelelő tengelyre szerelt keverőkészülék (a lapátnak az edény fenekétől 5–10 cm távolságra kell forognia). Helyette 7 és 10 cm közötti hosszúságú, rúddal felszerelt mágneses keverő is használható.

2 és 4 mm közti belső átmérőjű üvegcső a levegőztetésre. A cső nyílása az edény fenekétől kb. 1 cm-re legyen.

Centrifuga (kb. 3 550 g).

pH-mérő.

Oldottoxigénkoncentráció-mérő készülék.

Szűrőpapírok.

▼B

Membránszűrő készülék.

Membránszűrők 0,45 μm-es pórusokkal. A membránszűrők akkor felelnek meg a célnak, ha meggyőződtek róla, hogy sem szenet nem bocsátanak ki, sem pedig a vizsgált anyagot nem abszorbeálják a szűrés során.

A szervesszén-tartalom, illetve a kémiai oxigénigény meghatározására alkalmas analitikai berendezés.

1.6.1.3. Az inokulum előkészítése

A biológiai szennyvíztisztítóból származó aktivált szennyvíziszapot (ismételten) kimossák és centrifugálják, vagy azt a vizsgálathoz használt vízzel ülepítik (lásd fent).

Az aktivált iszapnak megfelelő állapotban kell lennie. Az ilyen iszap valamely megfelelően működő szennyvíztisztítóból könnyen beszerezhető. Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb baktériumfajt, illetve baktériumtörzset szerezzék be, érdemes különböző forrásból származó inokulumokat összekeverni (pl. több szennyvíztisztítóból, különböző talajkivonatokat, folyókból származó vizet stb.). A keveréket a fentieknek megfelelően kell kezelni.

Az aktivált iszap aktivitásának ellenőrzését lásd az alábbiakban, a „Funkcionális ellenőrzés” című szakaszban.

1.6.1.4. A vizsgált oldat előkészítése

A vizsgálathoz használt edénybe 500 ml vizet, 2,5 ml/liter ásványianyag-tápoldatot és 0,2–1,0 g szárazanyag/liter végkoncentrációjú aktivált iszapot kell önteni. Hozzá kell adni megfelelő mennyiségű törzsoldatot a vizsgált anyagból úgy, hogy a végső keverékben a DOC-koncentráció 50 és 400 mg/liter között legyen. Az ennek megfelelő COD-értékek 100 és 1 000 mg/liter között változnak. A vizsgálathoz használt vízzel ki kell egészíteni összesen egy–négy literre. A mennyiség megválasztása a DOC- és COD-meghatározásokhoz veendő minták számától és az analízishez szükséges térfogattól függ.

Általában két liter elegendő. Legalább egy kontrolledényt (vakot) kell beállítani minden vizsgálati sorhoz; ebben csak aktivált iszap és ásványi tápoldat van, amelyet a vizsgálati edényekben lévő térfogattal megegyező térfogatra kell kiegészíteni.

1.6.2. *A kísérlet végrehajtása*

A vizsgálati edényeket mágneses vagy csavaros keverővel diffúz megvilágításban vagy egy sötét szobában 20 és 25 °C közötti hőmérsékleten kell kikeverni. A levegőztetést tisztítás céljából vattaszűrőn és szükség esetén mosópalackon keresztül fúvatott sűrített levegővel érik el. Biztosítani kell, hogy az iszap ne ülepedjen le, és az oxigénkoncentráció ne essen 2 mg/liter alá.

A pH-értéket rendszeres időközönként (pl. naponta) ellenőrizni kell, és szükség esetén be kell állítani 7 és 8 közé.

▼B

A párolgási veszteséget közvetlenül a mintavétel előtt ionmentesített vagy desztillált vízzel a megfelelő mennyiségben pótolni kell. Jó módszer, ha a folyadék szintjét a vizsgálatok megkezdése előtt jelöljük az edény falán. Minden mintavétel után új jelet tesznek (levegőztetés és keverés nélkül). Az első mintákat mindig a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva veszik, hogy kiderítsék, felszívódott-e a vizsgált anyag az aktivált iszapba.

A vizsgált anyag eltűnését követően naponta vagy más rendszeres időközben végeznek DOC-vagy COD-meghatározást. A vizsgálati edényből és a vakpróbából származó mintákat gondosan átmosott szűrőpapíron átszűrik. Az oldat szűri etének első 5 ml-ét eldobják. A nehezen szűrhető iszapot előzetesen tízperces centrifugálással távolítják el. A DOC- és COD-meghatározásokat legalább két párhuzamos mintán el kell végezni. A vizsgálatot 28 napon át folytatják.

Megjegyzés: A továbbra is zavaros mintákat membránszűrőn szűrik át. A membránszűrő nem bocsáthat ki, és nem vehet fel szerves anyagokat.

Az aktivált iszap funkcionális ellenőrzése

Valamely ismert anyagot tartalmazó edényt is be kell állítani a vizsgálati sorba, hogy ellenőrizzék az aktivált iszap működőképességét. E célra a dietilén-glikol megfelelő.

Adaptáció

Ha az elemzéseket viszonylag rövid időközönként végzik (például naponta), az adaptáció a bomlási görbéből világosan felismerhető (lásd a 2. ábrát). Ezért nem célszerű a vizsgálatot közvetlenül a hétvége előtt megkezdeni.

Ha az adaptáció a vizsgálati időszak vége felé jelenik meg, a vizsgálatot meg lehet hosszabbítani, amíg a lebomlás be nem fejeződött.

Megjegyzés: Ha szükség van bővebb ismeretekre az adaptálódott iszap viselkedésével kapcsolatosan, ugyanazt az aktivált iszapot kell még egyszer ugyanazon vizsgált anyaggal kezelni, az alábbi eljárás szerint:

Kikapcsolják a keverőgépet és a szellőztető berendezést, majd hagyják, hogy az aktivált iszap leülepedjen. Leszívják a felülúszó folyadékot, vízzel feltöltik két literre, 15 percig keverik, majd hagyják, hogy ismét leülepedjen. Miután a felülúszót ismét leszívták, a visszamaradt iszapot arra használják, hogy a vizsgálatot ugyanazon anyaggal a fenti 1.6.1.4. és 1.6.2. pontnak megfelelően megismételjék. Az aktivált iszap ülepítés helyett centrifugálással is elkülöníthető.

Az adaptált iszapot friss iszappal is elkeverhetik literenként 0,2–1 g közötti száraz tömeg/liter koncentrációig.

▼B

Analitikai eszközök

A mintákat szokásos esetben gondosan átmosott szűrőpapíron szűrik meg (a mosáshoz ionmentesített vizet kell használni).

A továbbra is zavaros mintákat membránszűrőn is át kell szűrni (0,45 μm).

A DOC-koncentrációt a TOC-műszer segítségével két párhuzamos mintán határozzák meg a minták szűri eteiből (az első 5 ml-t kiöntik). Ha a szűrletet nem tudják ugyanazon a napon elemezni, azokat másnapig hűtőszekrényben kell tárolni. Ennél hosszabb tárolás nem ajánlott.

A COD-koncentráció meghatározását a minta szűrletéből a hivatkozott szakirodalomban másodikként feltüntetett dokumentumban ismertetett eljárás szerint végzik el.

2. ADATOK ES ÉRTÉKELÉS

A DOC- és/vagy COD-koncentrációkat legalább két párhuzamos mintán kell meghatározni a fentebb említett 1.6.2. pont szerint. A T időben fennálló bomlás mértékét a fentebb az 1.2. pontban ismertetett képlet alapján számolják ki.

A bomlás mértékét a legközelebbi egész százalékra kerekítik. A vizsgálat végén kapott bomlási értéket a jegyzőkönyvben „Biológiai lebonthatóság a Zahn-Wellens vizsgálat szerint” címen rögzítik.

Megjegyzés: Ha teljes bomlást észlelünk a vizsgálati idő lejárta előtt, és az eredményt a következő napon megismételt elemzés is megerősíti, a vizsgálatot le lehet zárni.

3. JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— az anyag kiindulási koncentrációja,

— minden egyéb információ és a vizsgált anyagra, a referenciaanyagra – ha volt –, valamint a vakpróbára vonatkozó vizsgálati eredmények,

— koncentráció három óra elteltével,

— biológiai bomlási görbe, leírással,

— dátum és helyszín, ahonnan a vizsgálati organizmusok mintáját vettük, adaptációs állapotuk, a felhasznált koncentráció stb.,

— a vizsgálati eljárásban történt bármely változtatás tudományos okai.

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A DOC (COD) eltűnése, amely fokozatosan, napok vagy hetek alatt játszódik le, azt jelzi, hogy a vizsgált anyag biológiai úton bomlik le.

▼B

Bizonyos esetekben azonban a fizikokémiai felszívódás is szerepet játszhat, amit az jelez, ha rögtön az első három órán belül teljesen vagy részben eltűnik az anyag, és a kontroll-, valamint a vizsgálati edényben mért felülúszó folyadék mennyisége közötti különbség jóval a várt szint alatt marad.

További vizsgálatokra van szükség, ha az adszorpciót és a tényleges (vagy részleges) biológiai bomlást szándékoznak elkülöníteni.

Számos lehetőség kínálkozik, de ezek közül a legmeggyőzőbb az, ha a felülúszót vagy az iszapot használják fel kiindulási törzsként (inokulum) egy alapvizsgálathoz (lehetőleg egy respirometriás vizsgálathoz).

Azon vizsgált anyagok, amelyek DOC- (COD-) értékei a szóban forgó vizsgálat során gyorsan és nem felszívódás útján csökkennek, biológiailag lebonthatónak tekinthetők. A részleges és nem felszívódás útján történő kiürülés azt jelzi, hogy a vegyület legalább részben bomlik biológiailag. Ha a DOC- (COD-) érték nem vagy csak alig csökken, annak oka lehet az is, hogy a vizsgált anyag gátolja a mikroorganizmusokat, amit az is jelezhet, hogy az iszap szétesik és elvész, zavaros felülúszót eredményezve. Ilyenkor a vizsgálatot a vizsgált anyag alacsonyabb koncentrációjával kell megismételni.

Vegyületspecifikus analitikai módszerek vagy a ^{14}C izotóppal jelölt vizsgált anyag használata nagyobb érzékenységet tesz lehetővé. Ha ^{14}C izotóppal jelölt vegyületet alkalmaznak, a biológiai bomlás tényét a $^{14}CO_2$ kinyerési aránya fogja megerősíteni.

Ha az eredményeket elsődleges biológiai bomlás formájában adják meg, lehetőség szerint magyarázatot kell adni a kémiai szerkezet olyan jellegű változását illetően, amely a kiindulási vegyület ismételt fellelésének hiányát okozza.

A vak vizsgálati közeg válaszreakciója mellett az analitikai módszer hitelesítését is meg kell adni.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

(1) OECD, Párizs, 1981, 302. B. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, A Bizottság 84/449/EGK irányelve (HL L 251., 1984.9.9., 1. o).

▼B

Függelék

ÉRTÉKELÉSI PÉLDA

Szerves vegyület:	4-etoxi-benzoesav
Elméleti vizsgálati koncentráció:	600 mg/l
Elméleti DOC-tartalom:	390 mg/l
Oltóanyag (inokulum)	szennyvíztisztító telep
Koncentráció:	1 gramm szárazanyag-tartalom/liter
Adaptációs állapot:	nincs adaptálva
Elemzés:	DOC-meghatározás
A minta mennyisége:	3 ml
Kontrollvegyület:	dietilén-glikol
A vegyület toxicitása:	1 000 mg/l alatt nincs toxikus hatás
	Használt vizsgálat: fermentációs kémcsőpróba

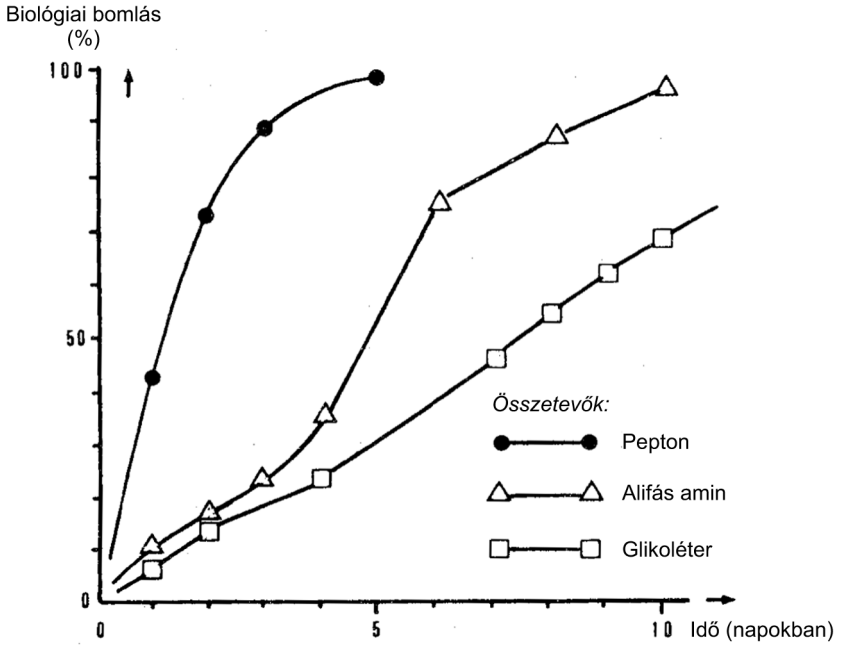
Vizsgálati idő	Kontrollanyag				Vizsgált anyag		
	Vak DOC - (1) mg/l	DOC (1) mg/l	Nettó DOC mg/l	Bomlás %	DOC (1) Mg/l	Nettó DOC Mg/l	Bomlás %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 óra	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 nap	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 nap	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 nap	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 nap	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 nap	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 nap	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 nap	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 nap	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Három párhuzamus meghatározás átlagértéke.

▼B

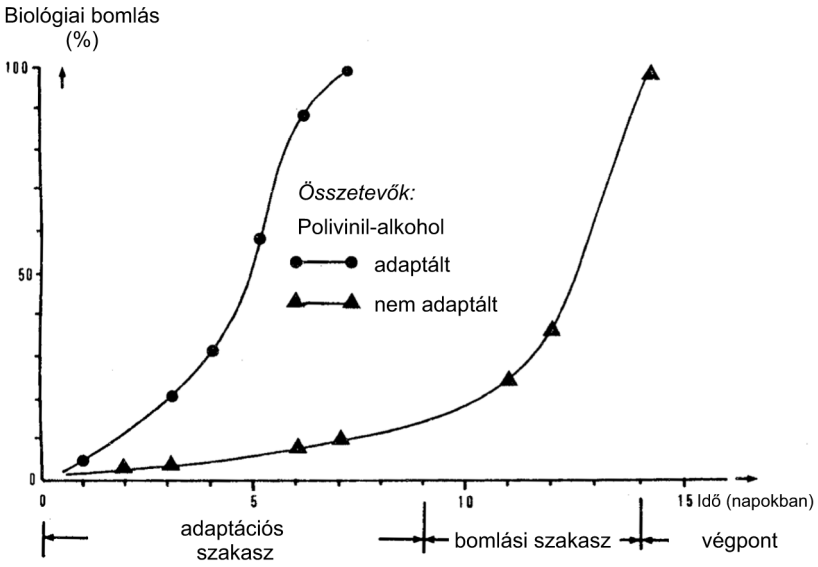
1. ábra

Biológiai bomlás görbéje (példa)



2. ábra

A szennyviziszap adaptálása (példa)



▼M4

C.10. **AEROB SZENNYVÍZTISZTÍTÁS-SZIMULÁCIÓS VIZSGÁLAT: C.10-A: ELEVENISZAPOS BERENDEZÉSEK – C.10-B: BIOFILMEK**

C.10-A: Eleveniszapos berendezések

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 303. vizsgálati iránymutatásában (2001) leírt módszerrel. Az 1950-es években felismerték, hogy az újonnan bevezetett felületaktív anyagok túlzott habképződést okoznak a szennyvíztisztító telepeken és a folyókban. Az aerob szennyvíztisztítás során ezeket az anyagokat nem lehetett teljes mértékben eltávolítani, és egyes esetekben más szerves anyagok eltávolítását is korlátozták. Számos kutatás indult annak felderítésére, hogy a felületaktív anyagok hogyan távolíthatók el a szennyvízből, illetve hogy az ipar által előállított új vegyi anyagok eltávolíthatók-e egyáltalán a szennyvíztisztítás során. Erre a célra az aerob biológiai szennyvíztisztítás két fő típusát (eleveniszapos és csepegtetőtestes szennyvíztisztítás) képviselő modellberendezéseket alkalmaztak. Gyakorlati szempontból – még helyi szinten is – célszerűtlen és nagyon költséges lett volna minden egyes új vegyi anyagot elkülönítve vizsgálni és nagyüzemi szennyvízkezelő telepeket megfigyelni.

KIINDULÁSI MEGFONTOLÁSOK

Eleveniszapos berendezések

2. Az eleveniszapos modellek mérete a leírások szerint 300 ml és kb. 2 000 ml között változott. Ezek között voltak olyanok, amelyek a valódi méretű szennyvíztisztító telepek mintájára készültek, azaz iszapülepítő tartállyal rendelkeztek, ahonnan a leülepedett iszapot visszapumpálták egy levegőztető edénybe, és olyanok is, ahol nem történt ülepítés (például Swisher (1)). A készülék méretét kettős követelmény szem előtt tartásával kellett meghatározni: egyrészt elég nagynak kellett lennie ahhoz, hogy mechanikai szempontból működőképes legyen, és kellő mennyiségű minta vételét tegye lehetővé anélkül, hogy ez a működést befolyásolná, másrészt viszont nem lehetett túlzottan hely- és anyagigényes.

3. Ez a vizsgálati módszer azt a két készüléktípust – a Husmann-berendezést (2) és a „lyukacsos edényt” (3)(4) – ismerteti, amelyeket széles körben és kielégítő módon alkalmaztak, első alkalommal a felületaktív anyagok kutatása során. Léteznek más modellek is, például az Eckenfelder (5), amelyek alkalmazása kielégítő eredményt adott. Mivel ez a szimulációs vizsgálat viszonylag drága és munkaigényes, egyidejűleg egyszerűbb és olcsóbb szűrővizsgálatok is szerepeltek a kutatásban, amelyek az e melléklet C.4. fejezetében szereplő A–F módszereknél (6) kerülnek bemutatásra. A nagy számú felületaktív anyaggal és más vegyi anyaggal végzett kísérlet azt mutatta, hogy azok az anyagok, amelyek a szűrővizsgálaton átmentek (biológiailag gyorsan lebonthatók), a szimulációs vizsgálat során is lebomlottak. Azok az anyagok, amelyek nem mentek át a szűrővizsgálaton, részben átmentek a jellegénél fogva biológiailag lebontható anyagok azonosítására szolgáló szűrővizsgálaton (e melléklet C.12. és C.19. fejezetei (7) (8)), ám ez utóbbi csoportból csak néhány bomlott le a szimulációs vizsgálat során, míg azok a vegyi anyagok, amelyek a jellegénél fogva biológiailag lebontható anyagok azonosítására szolgáló szűrővizsgálaton nem mentek át a (9)(10)(11) szimulációs vizsgálatok során sem bomlottak le.

4. Bizonyos célokra egyetlen üzemi feltételrendszer mellett végzett szimulációs vizsgálatok is elegendők; az eredmények kifejezésére a vizsgált vegyi anyag vagy az oldott szerves szén (DOC) százalékos eltávolítását használjuk. Ez a vizsgálati módszer egy ilyen vizsgálatot ismertet. A fejezet előző változatával szemben, amely mindössze egyetlen – mesterségesen készített szennyvizet használó, kapcsolt üzemmódban működő és viszonylag durva iszapelvételi módszert alkalmazó – készüléktípust ismertetett, a jelenlegi szöveg

▼M4

több változatot mutat be. A készülék típusára és üzemmódjára, valamint a szennyvízre és az iszapelvételre vonatkozóan egyaránt több alternatívát kínál. A szöveg szorosan igazodik az ISO 11733 szabvány (12) szövegéhez, amelyet az előkészítése során alapos vizsgálatnak vetettek alá, jóllehet a módszer nem képezte körvizsgálat tárgyát.

5. Más célokra pontosabban kell ismerni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a berendezés elfolyó vízében, amely egy alaposabb módszert igényel. Például, a vizsgálat időszaka alatt minden nap precízebben kell ellenőrizni az iszapelvétel arányát, és a berendezéseket különféle arányokkal kell működtetni. Ha egy mindenre kiterjedő módszerre van szükség, akkor mindezeken túl két vagy három eltérő hőmérsékletérték alkalmazásával kell a vizsgálatokat elvégezni: egy ilyen módszert ír le Birch (13)(14) és foglal össze a 6. függelék. A jelenleg rendelkezésre álló ismeretek azonban nem elégségesek annak eldöntéséhez, hogy a kinetikai modellek közül melyek alkalmasak a vegyi anyagok szennyvíztisztítás során és általában véve a vízi környezetben történő biológiai lebomlása mérésére. A 6. függelékben példaként ismertetett Monod-féle kinetikai modell alkalmazhatósága az 1 mg/l és annál nagyobb koncentrációban jelen lévő vegyi anyagokra korlátozódik, de egyes vélemények szerint még ez sem bizonyított. A szennyvízre jellemzőhöz közelebb álló koncentrációk mellett végzett vizsgálatokat ír le a 7. függelék, de a 6. függelékben bemutatottakhoz hasonlóan ezek is csak egy függelékben kerülnek megjelentetésre, nem pedig külön kiadott vizsgálati módszerként.

Szűrők

6. A csepegtetőtestes modellekre jóval kisebb figyelem irányult, melynek oka talán abban keresendő, hogy nehézkesebbek és nagyobb helyet foglalnak el, mint az eleveniszapos modellek. Gerike *et al.* kapcsolt üzemmódban működtetett csepegtetőtestes berendezéseket fejlesztett ki (15), amelyek viszonylag nagyméretűek (2 m magasak és 60 l térfogatúak) voltak, és minden egyes berendezés üzemeltetéséhez óránként 2 l szennyvízre volt szükség. Baumann et al (16) 1 méteres (14 mm belső átmérőjű) csövekbe helyezett gyapjúszerű poliészterszalagokat használt a csepegtetőtestes szennyvíztisztítás szimulálásához, amelyeket előzőleg 30 percig tömény eleveniszapban áztatott. A kizárólagos szénforrásként szolgáló vizsgált vegyi anyagot sóoldatban adagolták a függőlegesen elhelyezett csőbe, a biológiai lebonthatóságot a berendezés elfolyó vízének oldott szerves széntartalmának (DOC) és az eltávozó gáz széndioxid-tartalmának mérései alapján értékelték.

7. A bioszűrők szimulálására alkalmazott másik módszernél (15) a vizsgált vegyi anyagot tartalmazó illetve nem tartalmazó szennyvizet (kb. 250 ml/h) a vízszinteshez viszonyítva kis dőlésszögben elhelyezett forgó csövek belsejébe adagolták, majd elemezték a berendezés felfogott elfolyó vízének DOC és/vagy vizsgált vegyianyag-tartalmát.

A VIZSGÁLAT ELVE

8. E módszer célja a vízben oldható szerves vegyi anyagok aerob körülmények közötti, mikroorganizmusok által történő lebontásának és elsődleges, illetve teljes biológiai lebonthatóságának a meghatározása egy eleveniszapos folyamatot szimuláló, folyamatos üzemű vizsgálati elrendezésben. A mikroorganizmusok számára a vizsgált szerves vegyi anyag és egy biológiailag gyorsan lebontható szerves közeg jelentik a szén- és energiaforrást.

9. Két folyamatos üzemű vizsgálóberendezést (eleveniszapos szennyvíztisztítót vagy „lyukacsos edényt”) működtetünk azonos, a vizsgálat céljának megfelelően kiválasztott feltételek mellett. Az átlagos hidraulikus tartózkodási idő általában 6 óra, az átlagos iszapkor (iszaptartózkodási idő) 6–10 nap. A fölösiszap-elvétel két módszer egyikével történik; a vizsgált vegyi anyagot csak az egyik berendezésbe befolyó szennyvízhez (szerves közeghez) adagoljuk, általában úgy, hogy a szerves szén (DOC) koncentráció a 10 mg/l és 20 mg/l között legyen. A másik berendezést kontroll berendezésként használjuk a szerves közeg biológiai lebonthatósága meghatározására.

▼M4

10. Gyakori mintavétel segítségével meghatározzuk – lehetőség szerint – a berendezés elfolyó vízének DOC-koncentrációját vagy kémiai oxigénigényét (COD), valamint – szükség esetén – specifikus analízis segítségével a vizsgált vegyi anyag koncentrációját annak a berendezésnek az elfolyó vizében, amelybe a vizsgált vegyi anyagot adagoltuk. Feltételezzük, hogy a vizsgálati berendezés és a kontroll berendezés elfolyó vízében mért DOC-koncentrációk vagy COD értékek különbsége a vizsgált vegyi anyagnak vagy szerves metabolitjainak tulajdonítható. A vizsgált vegyi anyag lebomlásának meghatározásához ezt a különbséget összehasonlítjuk a befolyó szennyvíz vizsgált vegyi anyag hozzáadásának tulajdonítható DOC-koncentrációjával vagy COD értékével.

11. A lebomlást az idő függvényében ábrázoló görbe alapos vizsgálata általában lehetővé teszi a biológiai lebontás biológiai adszorpciótól való megkülönböztetését, megerősítése pedig általában a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló vizsgálat segítségével lehetséges, amelyhez abból a berendezésből gyűjtött akklimatizált oltóanyagot kell használni, amelybe a vizsgált vegyi anyagot adagoltuk.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

12. Az eredmények helyes értelmezéséhez ismerni kell a vizsgált vegyi anyag tisztasági, vízoldékonysági, illékonysági és adszorpciós jellemzőit. Illékony és oldhatatlan vegyi anyagok általában csak különleges óvintézkedések megtétele esetén vizsgálhatók (lásd az 5. függeléket). Az elméleti értékek kiszámításához, illetve a paraméterek mért értékeinek ellenőrzéséhez (például elméleti oxigénigény (ThOD), oldott szerves szén (DOC) és kémiai oxigénigény (COD)) a kémiai szerkezet vagy legalább a tapasztalati képlet ismerete is szükséges.

13. A vizsgált vegyi anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk (lásd a 4. függeléket) hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásánál és különösen fontosak lehetnek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez.

MEGFELELÉSI SZINTEK

14. A felületaktív anyagok elsődleges biológiai lebonthatósága szimulációs (igazoló) vizsgálatának eredeti követelményei szerint a meghatározott vegyi anyagnak legalább 80 %-os eltávolítási szintet kellett elérnie ahhoz, hogy a felületaktív anyag forgalmazható legyen. 80 % alatti érték esetén a felületaktív anyag csak akkor forgalmazható, ha az itt bemutatott szimulációs (igazoló) vizsgálat alkalmazása során a meghatározott vegyi anyag több mint 90 %-a eltávolítható. A vegyi anyagok többségénél a megfelelési szint általában nem vet fel kérdéseket, az eltávolítás százalékos értéke pedig felhasználható a vegyi anyagok veszélyességének értékelése során alkalmazandó várható környezeti koncentráció közelítő becsléséhez. A vizsgálatok általában „mindent vagy semmit” eredményt hoznak. Számos vizsgálatban a tiszta vegyületek több mint háromnegyede 90 % feletti százalékos DOC-eltávolítást mutatott, a jelentősebb fokú biológiai lebonthatóságot mutató vegyületek több mint 90 %-a pedig 80 % feletti eredményt ért el.

15. Az itt bemutatott vizsgálathoz használt (10 mg C/l körüli) koncentrációban viszonylag kevés vegyi anyag van jelen a szennyvízben (például felületaktív anyagok). Egyes vegyi anyagok esetében ez gátló koncentráció lehet, míg más estekben az alacsony koncentráció megváltoztatja az eltávolítás kinetikáját. A lebomlás pontosabb értékelése a módszerek módosításával, a vizsgált vegyi anyag valóságosnak megfelelő, alacsony koncentrációban történő használatával, majd a kapott adatokból számítható kinetikai állandók meghatározásával lehetséges. Az ehhez szükséges kísérleti módszerek teljes körű validálása, illetve a biológiai bomlási reakciókat leíró kinetikai modellek kidolgozása azonban még nem történt meg (lásd 7. függelék).

▼M4

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

16. A kísérleti eljárás helyes végrehajtásának biztosítása érdekében időnként ajánlott ismert viselkedésű vegyi anyagokat is vizsgálni a vizsgált anyaggal egyidejűleg. Ezek közé tartozik például az adipinsav, a 2-fenilfenol, az 1-naftol, a difénsav, az 1-naftoesav, stb. (9)(10)(11).

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK MEGISMÉTELHETŐSÉGE

17. A szimulációs vizsgálatok szakirodalma jóval szegényesebb, mint a gyors biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálatoké. A legalább 80 %-ban lebomló vegyi anyagoknál az (egyidejű) ismétlések jó reprodukálhatósági értéket mutatnak (10–15 %-on belül), a nehezebben lebomló vegyi anyagok esetén azonban nagyobb a variabilitás. Emellett néhány határesetnek minősülő vegyi anyag esetében nagyon eltérő eredmények kerültek feljegyzésre a vizsgálat 9 hetes megengedett időtartama alatt a különböző időpontokban (például 10 %, 90 %).

18. A kétféle készüléktípus alkalmazásával kapott eredmények között kicsi az eltérés, de egyes vegyi anyagok lebomlása nagyobb mértékben és következetesebben volt megfigyelhető a háztartási szennyvízben, mint az OECD iránymutatása szerinti, mesterségesen készített szennyvízben.

A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

Vizsgálati elrendezés

19. A vizsgálati elrendezés minden egyes vizsgált vegyi anyag esetén egy vizsgálati berendezésből és egy kontroll berendezésből áll; ha csak specifikus analízis (elsődleges biológiai lebonthatóság meghatározása) elvégzésére kerül sor, akkor azonban egy vizsgálati berendezés is elegendő. Egy kontroll berendezés ugyanazon vegyi anyag vagy különböző vegyi anyagok vizsgálatához használt több vizsgálati berendezéshez is tartozhat. Kapcsolt berendezések alkalmazása (3. függelék) esetén mindegyik vizsgálati berendezéshez külön kontroll berendezést kell biztosítani. A vizsgálati elrendezés kétféle lehet: eleveniszapos szennyvíztisztítót modellező Husmann-berendezés (1. függelék, 1. ábra) vagy „lyukacsos edény” (1. függelék, 2. ábra). Mindkét esetben szükség van a befolyó szennyvíz és az elfolyó víz tárolására szolgáló megfelelő méretű tartályokra, valamint adagolópumpákra, amelyek keverve vagy külön-külön adagolják a befolyó szennyvizet és a vizsgált vegyi anyag oldatát.

20. Mindegyik eleveniszapos berendezésnek rendelkeznie kell egy ismert térfogatú, körülbelül 3 liter eleveniszap befogadására alkalmas levegőztető edénnyel és egy körülbelül 1,5 liter térfogatú szeparátorral (másodlagos tisztítás céljára); a térfogat a szeparátor magasságának változtatásával bizonyos mértékig módosítható. Eltérő méretű edények alkalmazása a hidraulikus terhelés megfelelő módosítása esetén megengedett. Ha a vizsgálati helyiségben nem biztosítható a kívánatos tartományon belüli hőmérséklet, akkor ajánlott szabályozott hőfokú vízköpennyel körülvett edényeket használni. A szeparátorból kikerülő eleveniszapot légpumpa vagy adagoló szivattyú segítségével folyamatosan vagy egyenlő hosszúságú szüneteket tartva szakaszosan vezetjük vissza a levegőztető edénybe.

21. A „lyukacsos edény” elrendezés egy porózus falú, kúpos aljú hengeres belső tartályból és egy azt körülfogó, valamivel nagyobb, ugyanolyan alakú vízzáró műanyag edényből áll. A lyukacsos tartály elkészítésére alkalmas anyag a 90 μm legnagyobb pórusátmérőjű, 2 mm vastag porózus polietilén. Az iszap és a tisztított szerves közeg szétválasztása azon alapul, hogy a két anyag különbözőképpen halad át a lyukacsos falon. A kilépő termék a gyűrű alakú részen gyűlik össze, ahonnan kifolyik a gyűjtőedénybe. Mivel az iszap nem ülepszik le, nem kell visszavezetni. Az egész elrendezés szabályozott

▼M4

hőmérsékletű vízfürdőben is kialakítható. A működtetés kezdeti szakaszaiban a lyukacsos edény eltömődése következtében túlfolyás fordulhat elő. Ilyenkor a lyukacsos betétet ki kell cserélni egy tisztára, amelyhez az eltömődött betét kivétele előtt egy szívócsövön keresztül át kell vezetni az iszapot az edényből egy tiszta vödörbe. Az eltömődött betét oldalaira tapadt iszapot is gondosan le kell kaparni és át kell rakni. Az eltömődött edény tisztítása során először gyenge vízsugárral lemossuk a visszamaradt iszapot, majd az edényt híg nátrium-hipoklorit oldatba és azt követően vízbe merítjük, és végül vízzel alaposan leöblítjük.

22. Az iszap levegőztető edényben történő levegőztetéséhez mindkét elrendezésben megfelelő módszert kell alkalmazni, például porlasztókövet és sűrített levegőt. Ha a levegőt tisztítani kell, akkor egy megfelelő szűrőn és levegőmosón kell átvezetni. Az aerob feltételek fenntartása és az iszappelyhek állandó szuszpenzióban tartása érdekében a vizsgálat során mindvégig elegendő mennyiségű levegőnek kell áthaladnia a rendszeren.

Szűrőkészülék vagy centrifuga

23. A minták szűrésére szolgáló, megfelelő pórusméretű (0,45 μm névleges lyukátmérőjű) membránszűrők, amelyek minimális mértékben adszorbeálják az oldható szerves vegyületeket és bocsátanak ki szerves szenet. Szerves szenet kibocsátó szűrők alkalmazása esetén a kioldódó szén eltávolítása érdekében a szűrőket meleg vízzel gondosan ki kell mosni. A másik lehetséges megoldás a 40 000 m/s^2 gyorsulás elérésére képes centrifuga alkalmazása.

Analitikai berendezések

24. A következők meghatározására alkalmas készülékek:

— DOC (oldott szerves szén) és TOC (összes szerves szén) vagy COD (kémiai oxigénigény),

— meghatározott vegyi anyag, ha szükséges,

— lebegő anyagok, pH, víz oxigénkoncentrációja,

— hőmérséklet, kémhatás,

— ammónium, nitrit és nitrát, ha a vizsgálat a nitrifikációt befolyásoló feltételek mellett kerül elvégzésre.

Víz

25. Kevesebb mint 3 mg/l DOC-koncentrációjú csapvíz. Ha a lúgosság nem ismert, meg kell határozni.

26. Kevesebb mint 2 mg/l DOC-koncentrációjú ionmentesített víz.

Szerves közeg

27. Szerves közegként mesterségesen készített szennyvíz, háztartási szennyvíz vagy ezek keverékének a használata megengedett. Kimutatták (11)(14), hogy a háztartási szennyvíz önmagában történő alkalmazása sok esetben magasabb százalékos DOC-eltávolítást eredményez, sőt olyan vegyi anyagok eltávolítását és biológiai lebontását is lehetővé teszi, amelyek az OECD által meghatározott mesterségesen készített szennyvíz alkalmazása esetén nem bonthatók le biológiailag. Ugyancsak kimutatták, hogy a háztartási szennyvíz folyamatos vagy szakaszos hozzáadása gyakran stabilizálja az eleveniszapot és a döntő fontosságú jó ülepedési képességet. Ezért háztartási szennyvíz alkalmazása ajánlott. Új tétel használata előtt mindig meg kell határozni a szerves közeg DOC vagy COD koncentrációját. A szerves közeg savasságát vagy lúgosságát ismerni kell. Ha a szerves közeg nem elég savas vagy lúgos, akkor megfelelő puffer (nátrium-hidrogén-karbonát vagy kálium-dihidrogén-foszfát) hozzáadásával lehet fenntartani a 7,5 ± 0,5 körüli pH-értéket a levegőztető edényben a vizsgálat során. Minden esetben egyedi alapon kell meghatározni, hogy mikor és mennyi puffert kell a szerves közeghez hozzáadni. Keverék folyamatosan vagy szakaszosan történő adagolása esetén gondoskodni kell arról, például vízzel való hígítás révén, hogy a keverék oldott szerves széntartalma (DOC) vagy kémiai oxigénigénye (COD) közelítőleg állandó maradjon.

▼M4

Mesterségesen készített szennyvíz

28. Csapvízben oldjunk fel literenként 160 mg peptont, 110 mg húskivonatot, 30 mg karbamidot, 28 mg dikálium-hidrogénfoszfátot (K_2HPO_4), 7 mg nátrium-kloridot (NaCl), 4 mg kalcium-klorid-dihidrátot ($CaCl_2.2H_2O$) és 2 mg magnézium-szulfát-heptahidrátot ($Mg_2SO_4.7H_20$). Ezzel az OECD által meghatározott és példaként megadott módszerrel körülbelül 100 mg/l átlagos DOC-koncentrációjú befolyó szennyvíz készíthető. Alternatívaként alkalmazható más összetétel is, amely hozzávetőleg hasonló, a valódi szennyvízéhez közelebb álló DOC-koncentrációt eredményez. Ha kisebb töménységű befolyó szennyvízre van szükség, akkor a mesterségesen készített szennyvizet hígíthatjuk csapvízzel – például 1:1 arányban, amelynek segítségével 50 mg/l körüli koncentrációt érhetünk el. Mivel a hígabb szennyvíz alkalmazása elősegíti a nitrifikáló organizmusok szaporodását, a nitrifikáló szennyvíztisztító telepek szimulációjának vizsgálata esetén ezt a módosítást el kell végezni. Desztillált vízzel kevert műszennyvíz koncentrátumot is készíthetünk, amely 1 °C hőmérsékleten egy hétig tárolható. Felhasználás előtt hígítsuk csapvízzel. (Bár ez a közeg nem teljesen megfelelő, például a nitrogén koncentrációja túl magas, míg a széntartalom viszonylag alacsony, a foszfát puffer hozzáadásán és a pepton tartalom növelésén kívül jobb javaslat eddig nem született).

Háztartási szennyvíz

29. Elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telepről származó, naponta frissen gyűjtött, ülepített szennyvizet használjunk. A durva részecskéktől jobbára mentes szennyvizet az elsődleges ülepítést megelőzően, az elsődleges ülepítőtartály túlfolyójából vagy az eleveniszapos üzem betáplálási pontjáról kell gyűjteni. A szennyvíz felhasználás előtt több (általában legfeljebb hét) napig tárolható 4 °C hőmérsékleten, amennyiben bizonyítható, hogy a DOC-koncentráció (vagy a COD) nem csökken jelentős mértékben (azaz legalább 20 %-kal) a tárolás során. Új tétel használata előtt mindig be kell állítani a DOC-koncentrációt (vagy a COD-t) egy megfelelő állandó értékre, például csapvíz hozzáadásával, hogy a vizsgálat során minél kisebb zavar keletkezzen.

Eleveniszap

30. Az oltóanyagként használt eleveniszapot egy elsősorban háztartási szennyvizet kezelő, megfelelően üzemeltetett szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi méretű eleveniszapos berendezés levegőztető tartályából gyűjtsük.

A vizsgált vegyi anyag törzsoldatai

31. A megfelelően oldható vegyi anyagok törzsoldatait ionmentesített víz vagy a mesterségesen készített szennyvíz ásványi összetevőjének felhasználásával készítjük el a megfelelő koncentrációban (például 1-5 g/l). (Az oldhatatlan és illékony vegyi anyagokra vonatkozóan lásd az 5. függeléket.) Határozzuk meg a törzsoldat DOC és összes szerves szén (TOC) tartalmát, és a későbbiekben minden új tételnél ismételjük meg a mérést. Ha a DOC és a TOC különbsége nagyobb, mint 20 %, akkor ellenőrizzük a vizsgált vegyi anyag vízoldékonyságát. A visszanyerési arány megfelelőségének ellenőrzéséhez (általában > 90 % várható) hasonlítsuk össze a DOC-tartalmat vagy a vizsgált vegyi anyag törzsoldat specifikus analízisével meghatározott koncentrációját a névleges értékkel. Különösen diszperziók esetén kell ellenőrizni, hogy a DOC használható analitikai paraméter, vagy csak a vizsgált vegyi anyagra specifikus analitikai módszert lehet alkalmazni. Diszperzió használata esetén a mintákat centrifugálni kell. Minden új tételre vonatkozóan meg kell határozni az oldott szerves széntartalmat, a kémiai oxigénigényt, illetve – specifikus analízissel – a vizsgált vegyi anyag tartalmat.

▼M4

32. Határozzuk meg a törzsoldat pH értékét. A szélsőséges értékek azt jelzik, hogy a vegyi anyag hozzáadása hatással lehet az eleveniszap pH értékére a vizsgálati elrendezésben. Ebben az esetben kis mennyiségű szervetlen sav vagy bázis segítségével semlegesíthetjük a törzsoldatot, azaz a pH értéket 7 ± 0,5-re állíthatjuk be, ügyelve arra, hogy elkerüljük a vizsgált vegyi anyag kicsapódását.

ELJÁRÁS

33. Az itt leírt eljárás eleveniszapos berendezés használata esetén alkalmazandó; „lyukacsos edény” használata esetén kis mértékben módosítani kell.

Az oltóanyag előkészítése

34. A vizsgálat kezdetén eleveniszapot vagy kisszámú mikroorganizmust használunk oltóanyagként a vizsgálati elrendezésben. Az oltóanyagot a felhasználás előtt megfelelő szellőzést biztosítva szobahőmérsékleten kell tartani, és 24 órán belül fel kell használni. Az első esetben egy főként háztartási szennyvizet fogadó, jól működő biológiai szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi szennyvíztisztító berendezés levegőztető tartályából eleveniszap-mintát veszünk. Nitrifikáló feltételek szimulálása esetén nitrifikáló szennyvíztisztító telepről származó mintát kell használni. Meghatározzuk a lebegőanyag koncentrációt, és szükség esetén ülepítéssel töményítjük az iszapot, hogy a lehető legkisebb mennyiséget kelljen a vizsgálati elrendezésben használni. A szárazanyag kezdeti koncentrációját 2,5 g/l-re kell beállítani.

35. A második esetben háztartási szennyvizet fogadó biológiai szennyvíztisztító telep elfolyó vizét használjuk oltóanyagként 2–10 ml/l koncentrációban, amelyhez érdemes különféle más forrásokból – például felszíni vizekből – származó oltóanyagokat hozzáadni, hogy minél több különböző baktériumfaj legyen jelen. Ebben az esetben az eleveniszap a vizsgálati elrendezésben jön létre és képződik.

A szerves közeg adagolása

36. A vizsgálat megkezdésekor és a vizsgálat alatt mindvégig gondoskodjunk arról, hogy a befolyó szennyvizet és az elfolyó vizet tartalmazó tartályok és a befolyó szennyvizet tartalmazó edényekből kivezető, illetőleg az elfolyó vizet tartalmazó edényekbe bevezető csövek mindig alaposan meg legyenek tisztítva, hogy ne alakulhassanak ki rajtuk mikrobatenyészetek. A vizsgálati elrendezést szabályozott (általában 20–25 °C) hőmérsékletű helyiségben kell felállítani, vagy vízköpenyes vizsgálati berendezéseket kell alkalmazni. Készítsünk elegendő mennyiséget a szükséges szerves közegből (27–29. bekezdés). Töltsük fel a levegőztető edényt és a szeparátort a szerves közeggel, majd adjuk hozzá az oltóanyagot (34–35. bekezdés). Indítsuk el a levegőztetést úgy, hogy az iszapot szuszpenzióban és aerob körülmények között tartsuk, majd kezdjük meg a befolyó szennyvíz adagolását, valamint a leülepedett iszap visszavezetését. A vizsgálati és a kontrollberendezésekben a szerves közeget a tárolóedényből a levegőztető edénybe kell adagolni (20–21. bekezdés), az elfolyó vizet pedig hasonló tárolóedényekben kell felfogni. A 6 órás szokásos hidraulikus tartózkodási idő eléréséhez 0,5 l/h sebességgel kell a szerves közeget pumpálni. A sebesség beállításához az adagolt szerves közeg napi mennyiségét úgy mérjük, hogy figyeljük a tárolóedényekben található mennyiség csökkenését. A vegyi anyagok szakaszos kiengedése vagy a sokkszerű terhelés hatásainak meghatározásához más adagolási módszer szükséges.

37. Ha a szerves közeget 1 napnál hosszabb ideig tartó használatra készítjük, körülbelül 4 °C hőmérsékletre kell hűteni, vagy más tartósítási módszert kell alkalmazni a mikroorganizmusok szaporodásának és a vizsgálati berendezésen kívüli biológiai lebomlás megakadályozására (29. bekezdés). Mesterségesen készített szennyvíz használata esetén tömény (példáulpéldául 10-szeres töménységű) törzsoldat készíthető (28. bekezdés), amelyet körülbelül 4 °C hőmérsékleten lehet tárolni. Ezt a törzsoldatot használat előtt megfelelő mennyiségű csapvízzel jól el kell keverni; alternatívaként közvetlenül a készülékbe adagolható, miközben a megfelelő mennyiségű csapvíz adagolása külön történik.

▼M4

A vizsgált vegyi anyag adagolása

38. A vegyi anyag törzsoldatából (31. bekezdés) töltsünk megfelelő mennyiséget a befolyó szennyvizet tartalmazó tárolóedénybe, vagy adagoljuk közvetlenül a levegőztető edénybe egy külön adagolópumpa segítségével. A vizsgálat során a befolyó szennyvíz szokásos átlagos DOC-koncentrációját 10 mg/l és 20 mg/l közötti értékre kell beállítani, a maximális koncentráció pedig nem haladhatja meg az 50 mg/l értéket. Ha a vizsgált vegyi anyag vízben rosszul oldódik, vagy toxikus hatásai lehetnek, akkor a DOC-koncentrációt 5 mg/l-re vagy annál alacsonyabb értékre csökkenthetjük, amennyiben létezik megfelelő specifikus analitikus módszer, és azt el is végeztük (a vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagból készített diszperzió adagolásának speciális módszereit lásd az 5. függelékben).

39. A vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdése előtt meg kell várni, amíg a rendszer állapota stabilizálódik, és a szerves közegből történő DOC-eltávolítás hatékonysága eléri a megfelelő szintet (kb. 80 %). A vizsgált vegyi anyag hozzáadása előtt ellenőrizni kell, hogy valamennyi berendezés egyforma hatékonysággal üzemel; ellenkező esetben a különböző iszapok összekeveredhetnek, és egyenlő mennyiség kerülhet vissza az egyes berendezésekbe. Ha (kb.) 2,5 g/l (száraz tömeg) eleveniszapot tartalmazó oltóanyagot használunk, akkor a vizsgált vegyi anyag adagolását már a vizsgálat megkezdésekor el lehet indítani, mivel a kezdettől fogva növekvő mennyiségben történő közvetlen adagolás azzal az előnnyel jár, hogy az eleveniszap jobban tud alkalmazkodni a vizsgált vegyi anyaghoz. A vizsgált vegyi anyag hozzáadásának módjától függetlenül ajánlott rendszeres időközönként ellenőrizni az áramlási sebességet és/vagy a tárolóedény(ek)ben lévő mennyiségeket.

Az eleveniszap kezelése

40. Az alkalmazott oltóanyagtól függetlenül az eleveniszap lebegőanyag-koncentrációja – a szerves közeg minőségétől és töménységétől, az üzemi feltételektől, a jelen lévő mikroorganizmusok természetétől, valamint a vizsgált vegyi anyag hatásától függően – az 1–3 g/l (száraz tömeg) tartományon belül stabilizálódik a vizsgálat során.

41. Hetente vagy gyakrabban vagy meg kell határozni a lebegőanyag-koncentrációt a levegőztető edényekben és a fölös iszap megfelelő hányadát el kell távolítani úgy, hogy a koncentráció folyamatosan 1 g/l és 3 g/l (száraz tömeg) között maradjon, vagy pedig gondoskodni kell arról, hogy az átlagos iszapkor értéke állandó – általában 6–10 nap –legyen. Így például 8 napos iszaptartózkodási idő esetén az eleveniszap 1/8-át kell minden nap eltávolítani a levegőztető edényből és megsemmisíteni. Ezt a műveletet naponta, vagy, ami előnyösebb, egy szakaszos üzemű automata szivattyú segítségével kell elvégezni. A lebegőanyag-koncentráció állandó szinten vagy egy szűk tartományon belül tartása önmagában nem biztosítja, hogy az iszaptartózkodási idő (SRT) – a vizsgált vegyi anyag elfolyó vízben mért koncentrációját meghatározó üzemi változó – értéke is állandó lesz.

42. A vizsgálat időtartama alatt naponta vagy gyakrabban el kell távolítani és újra kell szuszpendálni a levegőztető edény és a szeparátor falára tapadt iszapot. A biofilmképződés megakadályozása érdekében a csöveket és a vezetékeket rendszeresen ellenőrizni és tisztítani kell. A leülepedett iszapot lehetőleg szakaszos szivattyúzással áramoltassuk vissza a szeparátorból a levegőztető edénybe. A „lyukacsos edény” elrendezésben nem történik visszaáramoltatás, de ebben az esetben is gondoskodni kell arról, hogy a belső edényt tisztára cseréljük, mielőtt túlzottan megtelik (21. bekezdés).

43. Husmann-berendezés alkalmazása esetén előfordulhat, hogy rossz ülepedést és iszapveszteséget tapasztalunk. Ezek az alább felsorolt intézkedések legalább egyikének a vizsgálati és a kontroll berendezésnél történő egyidejű végrehajtásával orvosolhatók:

— Rendszeres időközönként – például hetente – alkalmazzunk adalékként friss eleveniszapot vagy derítőszert (például edényenként 2 ml 50 g/l $FeCl_3$) de vigyázva, hogy a vizsgált vegyi anyag ne csapódjon ki vagy lépjen reakcióba a $FeCl_3$-dal.

▼M4

— Cseréljük ki a légpumpát perisztaltikus pumpára. Ezzel lehetővé tesszük, hogy az iszap-visszaáramlás sebessége közel egyenlő legyen az alkalmazandó szennyvíz-beáramlási sebességgel, és anaerob zóna alakulhasson ki a leülepedett iszapban (a légpumpa geometriája a befolyó áramlási sebesség körülbelül 12-szeresére korlátozza az iszap-visszaáramoltatás minimális sebességét),

— Pumpáljuk szakaszosan az iszapot a szeparátorból a levegőztető edénybe (például óránként 1–1,5 l visszaáramoltatásához 2,5 óránként 5 percig).

— A habképződés miatti veszteség megelőzése érdekében használjunk nem toxikus habzásgátlót (például szilikonolaj) minimális koncentrációban.

— Rövid, lökésszerű hullámokban fúvassunk keresztül levegőt a szeparátorban lévő iszapon (például óránként 10 másodpercig).

— Adagoljuk szakaszosan a szerves közeget a levegőztető edénybe (például óránként 3–10 percig).

Mintavétel és analízis

44. Rendszeres időközönként mérni kell a levegőztető edényben lévő iszap oldott oxigén koncentrációját, hőmérsékletét és pH-értékét. Gondoskodjunk arról, hogy mindig elegendő oxigén álljon rendelkezésre (> 2 mg/l), és a hőmérséklet az előírt tartományon belül legyen (általában 20–25 °C). A 7,5 ± 0,5 pH-érték fenntartásához adagoljunk kis mennyiségű szervetlen bázist vagy savat a levegőztető edénybe vagy a befolyó szennyvízhez, illetve növeljük a szerves közeg pufferkapacitását (lásd a 27. bekezdést). Nitrifikáció esetén sav keletkezik: 1 mg N oxidációjának a terméke körülbelül 7 mg CO_3 – dal egyenértékű. A mérés gyakorisága, amely a napi és a heti mérés között mozoghat, a mérni kívánt paramétertől és a rendszer stabilitásától függ.

45. Mérni kell a kontroll és az ellenőrző berendezések befolyó szennyvízének DOC vagy COD értékét. A vizsgált vegyi anyag koncentrációját a vizsgálathoz használt befolyó szennyvízben specifikus analízissel vagy a törzsoldat koncentrációja (31. bekezdés), a felhasznált mennyiség és a vizsgálati berendezésbe adagolt szennyvíz mennyisége alapján történő becsléssel kell meghatározni. A koncentrációra vonatkozó adatok variabilitásának csökkentése érdekében a vizsgált vegyi anyag koncentrációját is ajánlott kiszámítani.

46. A gyűjtött elfolyó vízből vett megfelelő mintákat (például 24 órás összetett minták) 0,45 μm lyukátmérőjű membránszűrőn át kell szűrni vagy körülbelül 15 percig kb. 40 000 m/s^2 intenzitással centrifugálni kell. Centrifugálást akkor kell alkalmazni, ha a szűrés problémás. A DOC vagy COD meghatározását a teljes biológiai lebonthatóság méréséhez legalább egyszer meg kell ismételni, az elsődleges biológiai lebonthatóság méréséhez pedig – amennyiben ez szükséges – a vizsgált vegyi anyagra specifikus analízissel kell végezni

47. A COD alkalmazása csak akkor ajánlott, ha a vizsgálat során elég nagy koncentrációt (kb. 30 mg/l) használunk, mivel alacsony koncentrációk esetén analitikai nehézségeket okozhat. Erősen adszorbeálódó vegyi anyagok esetén ajánlott továbbá a vegyi anyagra specifikus analitikai módszert alkalmazni az adszorbeált vegyi anyag mennyiségének mérésére az iszapban.

48. A mintavétel gyakoriságát a vizsgálat várható időtartama határozza meg. Heti három mintavétel javasolt. Ha a berendezések már hatékonyan üzemelnek, akkor a vizsgált vegyi anyag bevezetését követően egytől legfeljebb hat hétig tartó időszak szükséges az alkalmazkodáshoz és az állandósult állapot eléréséhez. Lehetőség szerint 15 érvényes értéket kell gyűjteni az általában 3 hétig tartó állandósult állapot (59. bekezdés) időszaka alatt ahhoz, hogy a vizsgálat eredménye értékelhető legyen. A vizsgálatot akkor lehet befejezni, ha sikerült elérni a megfelelő lebomlási fokot (például > 90 %), és rendelkezésre áll ez a 15 érték, amely a 3 hetes időszak munkanapjaira eső analízisek eredményét képviseli. Általában törekedni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdését követően a vizsgálat legfeljebb 12 hétig tartson.

▼M4

49. Nitrifikáló iszap és a vegyi anyag nitrifikációra gyakorolt hatásai vizsgálata esetén hetente legalább egyszer kell a vizsgálati és a kontroll berendezés elfolyó vizéből vett minták ammónium és/vagy nitrit-nitrát analízisét elvégezni.

50. Minden analízist – különösen a nitrogén meghatározását – a mintavételt követő lehető legkorábbi időpontban kell elvégezni. Ha az analízist későbbre kell halasztani, akkor a mintákkal teletöltött, szorosan lezárt üvegeket körülbelül 4 °C hőmérsékleten, sötétben kell tárolni. 48 óránál hosszabb ideig történő tárolás esetén a mintákat mélyhűtéssel, sal (például literenként 10 ml 400 g/l töménységű kénsavoldat hozzáadásával) vagy megfelelő toxikus anyag (például literenként 20 ml 10 g/l töménységű higany (II)-klorid-oldat) hozzáadásával kell tartósítani. A tartósítási módszer nem befolyásolhatja az analízis eredményét.

Kapcsolt vizsgálati berendezések alkalmazása

51. Kapcsolt berendezések alkalmazása (3. függelék) esetén a vizsgálati berendezés és a hozzá tartozó kontroll berendezés levegőztető edényei között naponta cseréljünk ki azonos mennyiségű eleveniszapot (háromliteres levegőztető edény esetén 1 500 ml-ből 150 ml-t). Ha a vizsgált vegyi anyag erősen adszorbeálódik az iszapon, akkor csak a szeparátorok felülúszó folyadékát kell kicserélni. A vizsgálati eredmények kiszámításához mindkét esetben egy korrekciós tényezőt kell használni (55. bekezdés).

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

52. A vizsgált vegyi anyag DOC vagy COD csökkenésének százalékos értékét a következő képlettel számítjuk ki az adott időpontokban történő értékeléshez:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

ahol:

D_t = %-os DOC vagy COD csökkenés a t időpontban

C_s = a vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható, lehetőleg a törzsoldat alapján becsült befolyó DOC vagy COD, (mg/l)

E = a vizsgálati berendezés elfolyó vízében mért DOC vagy COD a t időpontban (mg/l)

E_o = a kontroll berendezés elfolyó vízében mért DOC vagy COD a t időpontban (mg/l)

53. A kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg DOC vagy COD csökkenésének foka hasznos információt nyújt az eleveniszap vizsgálat során megfigyelhető biológiai lebontó képességének az értékeléséhez. A százalékos lebomlás az alábbi képletből számítható ki:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

ahol:

D_B = a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg %-os DOC vagy COD csökkenése a t időpontban

C_M = a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg befolyó DOC vagy COD értéke (mg/l)

▼M4

Igény szerint a vizsgálati berendezésbe adagolt szerves közegnek és vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható százalékos DOC vagy COD csökkenés is kiszámítható a következő képletből:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

ahol:

D_T = összes %-os DOC vagy COD csökkenés a vizsgálati berendezésben

C_T = összes befolyó vagy törzsoldatokból számított DOC vagy COD a vizsgálati berendezésben

54. Amennyiben specifikus analitikai módszerrel mérjük a vizsgált vegyi anyag eltávolítását, a következő képlettel számítjuk ki a vizsgált vegyi anyag lebomlását:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

ahol:

D_{ST} = a vizsgált vegyi anyag elsődleges lebomlási %-a t időpontban

S_i = a vizsgált vegyi anyag mért vagy becsült koncentrációja a vizsgálati berendezés befolyó szennyvízében (mg/l)

S_e = a vizsgált vegyi anyag mért koncentrációja a vizsgálati berendezés elfolyó vízében a t időpontban (mg/l)

55. Kapcsolt üzemmód esetén a levegőztető edényben lévő vizsgált vegyi anyag iszapcserével történő hígításának ellensúlyozására korrekciós tényezőt kell alkalmazni (lásd 3. függelék). 6 órás átlagos hidraulikus tartózkodási idő és a levegőztető edényben lévő eleveniszap felének kicserélése esetén az alábbi képletet alkalmazva korrigálni kell a meghatározott napi lebomlási értékeket (D_t, 52. bekezdés) ahhoz, hogy a vizsgált vegyi anyag valódi lebomlását (D_{tc}) megállapíthassuk:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

A vizsgálati eredmények bemutatása

56. A D_t (vagy D_{tc}) és D_{st} százalékos lebomlást az idő függvényében ábrázoljuk (lásd 2. függelék). A vizsgált vegyi anyag vagy az oldott szerves szén bomlását mutató görbe alakjából az eltávolítási folyamatra vonatkozó következtetéseket lehet levonni.

Adszorpció

57. Ha egy vizsgált vegyi anyag esetében a vizsgálat kezdetétől fogva nagyfokú DOC-csökkenés figyelhető meg, akkor a vizsgált vegyi anyag lebomlása valószínűleg az eleveniszapban található szilárd anyagokon való adszorbeálódásának köszönhető. Ezt az adszorbeált vizsgált vegyi anyag specifikus analízissel történő meghatározásával lehet bizonyítani. Az adszorbeálható vegyi anyagok DOC-csökkenése általában nem marad mindvégig nagyfokú a vizsgálat során; a kezdetben tapasztalható nagyfokú eltávolítás rendszerint fokozatosan csökken, majd eléri az egyensúlyi értéket. Ha azonban az adszorbeálható vegyi anyag valamilyen módon a mikrobapopuláció akklimatizálódását okozza, a vizsgált vegyi anyag DOC-csökkenése a későbbiekben növekszik, majd egy magas értéken állandósul.

▼M4

Alkalmazkodási fázis

58. A statikus szűrővizsgálatokhoz hasonlóan a biológiai lebontást számos vizsgált vegyi anyag esetében egy alkalmazkodási fázis előzi meg. Az alkalmazkodási fázisban a lebontó baktériumok akklimatizálódnak vagy alkalmazkodnak, és szinte egyáltalán nem figyelhető meg a vizsgált vegyi anyag eltávolítása; ezt a baktériumok szaporodásának kezdeti időszaka követi. Miután ez a szakasz véget ért, a lebontó fázis kezdetének azt az időpontot tekintjük, amikor a vizsgált vegyi anyag kezdeti mennyiségének körülbelül 10 % százaléka kerül eltávolításra (figyelembe véve az esetleges adszorpciót). Az alkalmazkodási fázis általában rendkívül változatos és kevéssé reprodukálható.

Állandósult állapot

59. Egy folyamatos vizsgálat során a bomlási görbe állandó szakasza azt a fázist jelöli, amikor a legnagyobb fokú lebontás figyelhető meg. Az állandósult állapotnak legalább 3 hétig kell tartania, és körülbelül 15 mért értéknek kell tartoznia hozzá.

A vizsgált vegyi anyag átlagos lebomlási foka

60. Számítsuk ki a vizsgált vegyi anyag állandósult állapothoz tartozó D_t lebomlási értékeinek számtani közepét, majd kerekítsük a legközelebbi egész számra (1 %). Ez lesz a vizsgált vegyi anyag lebomlási foka. A számtani közép 95 %-os konfidencia intervallumát is ajánlott kiszámítani.

A szerves közeg lebomlása

61. A kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg százalékos DOC vagy COD csökkenését az idő függvényében ábrázoljuk (D_B). Az átlagos lebomlási fokot ugyanúgy határozzuk meg, mint a vizsgált vegyi anyag esetében (60. bekezdés).

A biológiai lebontás jele

62. Ha a vizsgált vegyi anyag nem adszorbeálódik jelentős mértékben az eleveniszapon, és a bomlási görbe a biológiai bomlási görbére jellemző tipikus alakot mutatja (alkalmazkodási fázis, lebontó fázis, állandósult állapot) (58–59. bekezdés), a mért csökkenést biztonsággal lehet a biológiai lebontásnak tulajdonítani. Ha kezdetben nagyfokú eltávolítás figyelhető meg, a szimulációs vizsgálat nem tud különbséget tenni a biológiai és a nem biológiai bomlási folyamatok között. Ebben az esetben és minden más esetben, amikor a biológiai lebontással kapcsolatban kétségek merülnek fel (például sztrippelés esetén), analizálni kell az adszorbeált vizsgált vegyi anyagot, vagy a biológiai folyamatokra egyértelműen utaló paramétereken alapuló kiegészítő statikus biológiai lebonthatósági vizsgálatokat kell végezni. Ilyenek például az oxigénfelvételt vizsgáló módszerek (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő D, E és F módszerek (6)), a széndioxid képződést mérő vizsgálat (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő C módszer (6)) vagy a gőztér CO_2-tartalmának ISO szabvány szerinti vizsgálata (18), amelyhez a szimulációs vizsgálatból származó, a vizsgált vegyi anyagnak már kitett oltóanyagot használunk. Ha a DOC-eltávolítást és az adott vegyi anyag eltávolítását is mértük, az eltávolítási százalékok jelentős különbsége (az előbbi alacsonyabb, mint az utóbbi) olyan szerves köztes termékek jelenlétére utal az elfolyó vízben, amelyek nehezebben lebonthatók lehetnek, mint a kiindulási vegyi anyag.

A vizsgálati eredmények érvényessége

63. Az oltóanyag szokásos biológiai lebonthatóságára a szerves közeg kontroll berendezésben (53. bekezdés) megfigyelhető lebomlási fokából lehet következtetni. A vizsgálatot akkor tekintjük érvényesnek, ha a DOC vagy COD csökkenés foka a kontroll berendezés(ek)ben két hét elteltével meghaladja a 80 %-ot, és semmilyen szokatlan jelenséget nem figyeltünk meg.

▼M4

64. Gyorsan lebontható (referencia) vegyi anyag használata esetén a biológiai lebomlás fokának (D_t, 52. bekezdés) nagyobbnak kell lennie, mint 90 %.

65. Nitrifikáló feltételek mellett végzett vizsgálat esetén az átlagos elfolyó ammónia-N és nitrit-N koncentráció nem érheti el az 1 mg/l, illetve a 2 mg/l értéket.

66. Ha ezek a követelmények (63–65 bekezdés) nem teljesülnek, akkor a vizsgálatot más forrásból származó oltóanyaggal meg kell ismételni, el kell végezni egy referencia-vegyianyag vizsgálatát, és valamennyi kísérleti eljárást ellenőrizni kell.

Vizsgálati jegyzőkönyv

67. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— azonosító adatok,

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati elrendezés típusa, oldhatatlan és illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén szükséges módosítások,

— a szerves közeg típusa,

— a szennyvízben található ipari szennyvizek aránya és jellege, ha ismert,

— az oltóanyag és jellege, a mintavétel helye(i), az alkalmazott koncentráció és esetleges előkezelés,

— a vizsgált vegyi anyag törzsoldata, DOC és TOC tartalom, szuszpenzió esetén az elkészítés módja, a vizsgálathoz használt koncentráció, 10-20 mg/l tartományon kívül eső DOC-koncentráció okai; a hozzáadás módszere és első időpontja, az esetleges változtatások,

— átlagos iszapkor és átlagos hidraulikus tartózkodási idő, iszapelvétel módja, iszapduzzadás, iszapveszteség stb. elkerülésének módszerei,

— alkalmazott analitikai módszerek,

— vizsgálati hőmérséklet,

— iszapduzzadás jellemzői, iszapvolumen index (SVI), eleveniszap lebegőanyag koncentrációja (MLSS),

— a szabványos eljárásoktól való bármely eltérés és az eredményeket esetlegesen befolyásoló körülmények.

Vizsgálati eredmények:

— mért adatok (DOC, COD, specifikus analízis, pH, hőmérséklet, oxigénkoncentráció, lebegőanyag koncentráció, N-vegyületek**,** ha releváns,

— D_t (vagy D_{tc}), D_B, D_{St} számított értékei táblázatos formában és a bomlási görbék,

— az alkalmazkodási fázisra és az állandósult állapotra vonatkozó információk, a vizsgálat időtartama, a vizsgált vegyi anyag lebomlási foka és a szerves közeg lebomlási foka a kontroll berendezésben, statisztikai adatokkal és a biológiai lebonthatóságra valamint a vizsgálat érvényességére vonatkozó megállapításokkal kiegészítve,

— az eredmények szöveges elemzése.

▼M4

SZAKIRODALOM

(1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(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 and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and 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) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors” biológiai lebonthatóság meghatározása.

(7) E melléklet C.12. fejezete: Biológiai lebomlás – módosított SCAS-vizsgálat.

(8) E melléklet C.19. fejezete: Adszorpciós együttható (K_{OC}) becslése talajon és szennyvíziszapon nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3: 157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; felülvizsgált szöveg 2004). Szerves vegyületek eltávolításának és biológiai lebonthatóságának meghatározása vizes közegben. Eleveniszapos szimulációs teszt.

(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 and 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 and 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. pp. 91–98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Vízminőség. Szerves vegyületek teljes aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése vizes közegben. A lezárt edényzet szervetlen széntartalmának meghatározásán alapuló módszer.

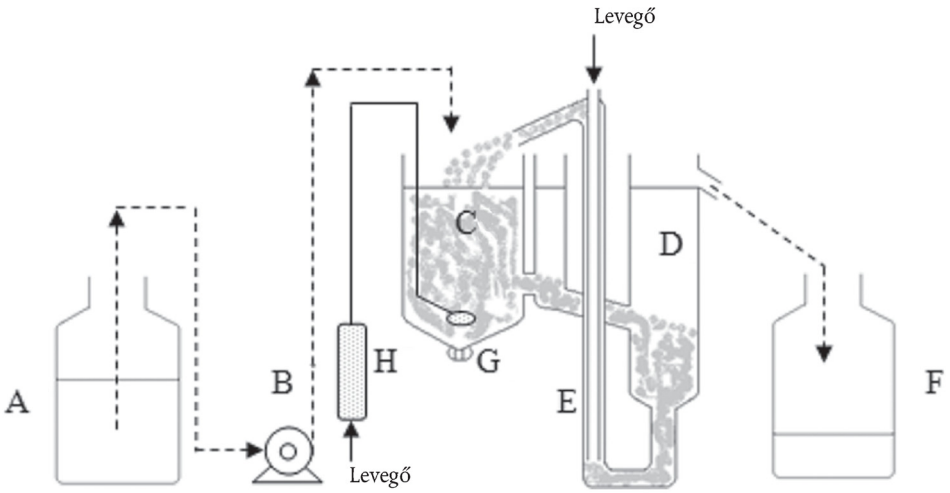
▼M4

1. függelék

1. ábra

A biológiai lebonthatóság értékelésére szolgáló készülék

Husmann-berendezés

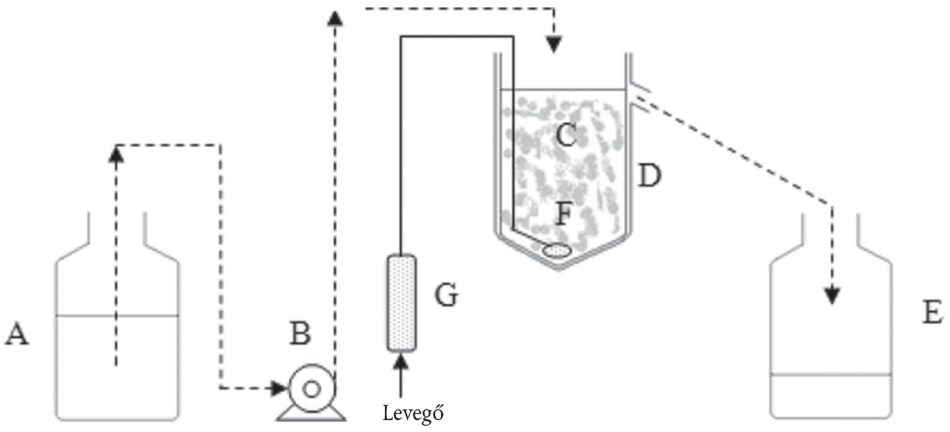


A. Tárolóedény
B. Adagolópumpa
C. Levegőztető kamra (térfogat: 3 l)
D. Ülepítőedény
E. Légpumpa
F. Gyűjtőedény
G. Levegőztető
H. Légáramlásmérő

2. ábra

A biológiai lebonthatóság értékelésére szolgáló készülék

Lyukacsos edény

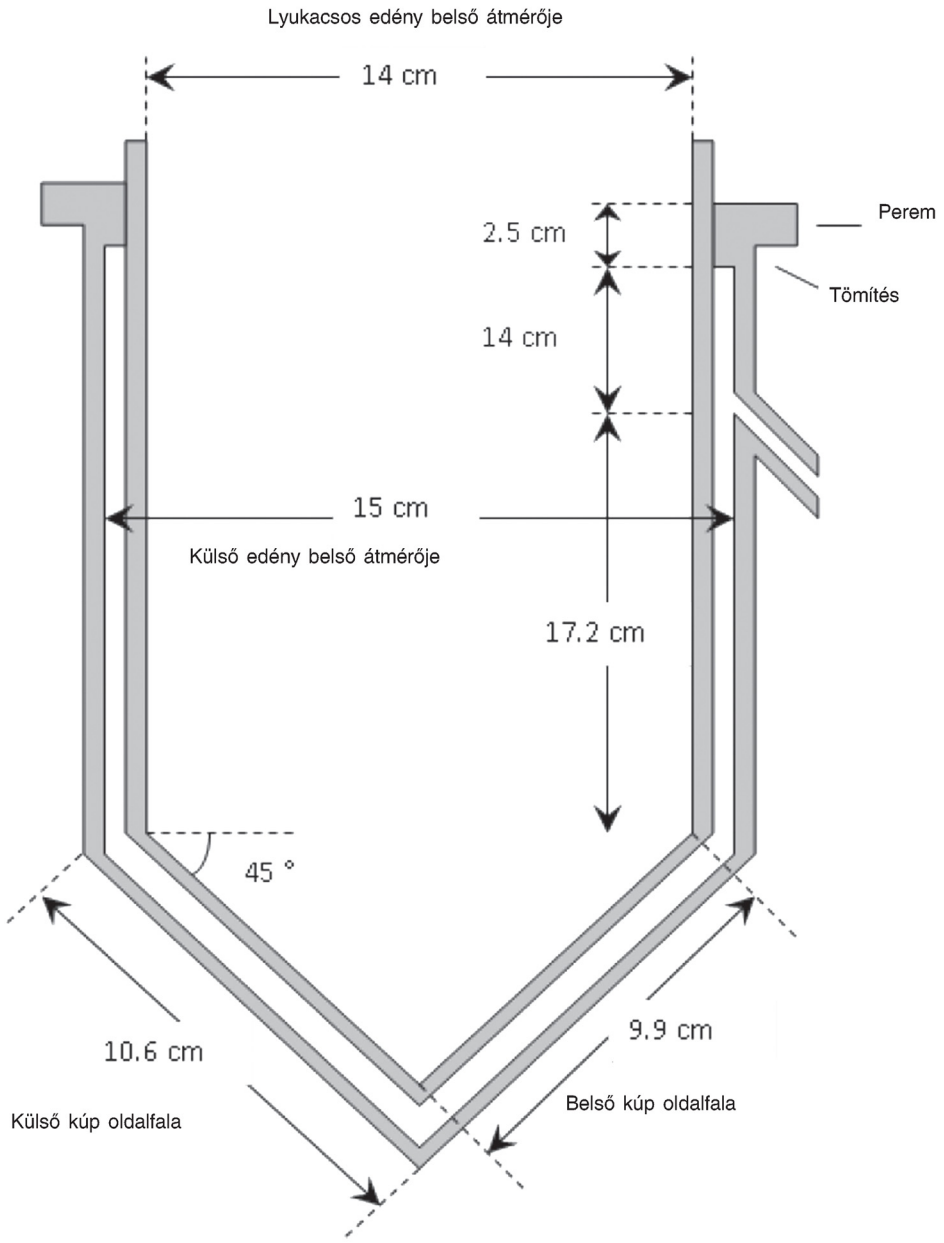


A. Tárolóedény
B. Adagolópumpa
C. Lyukacsos levegőztető edény
D. Nem áteresztő anyagú külső edény
E. Gyűjtőedény
F. Porlasztókő
G. Légáramlásmérő

▼M4

3. ábra

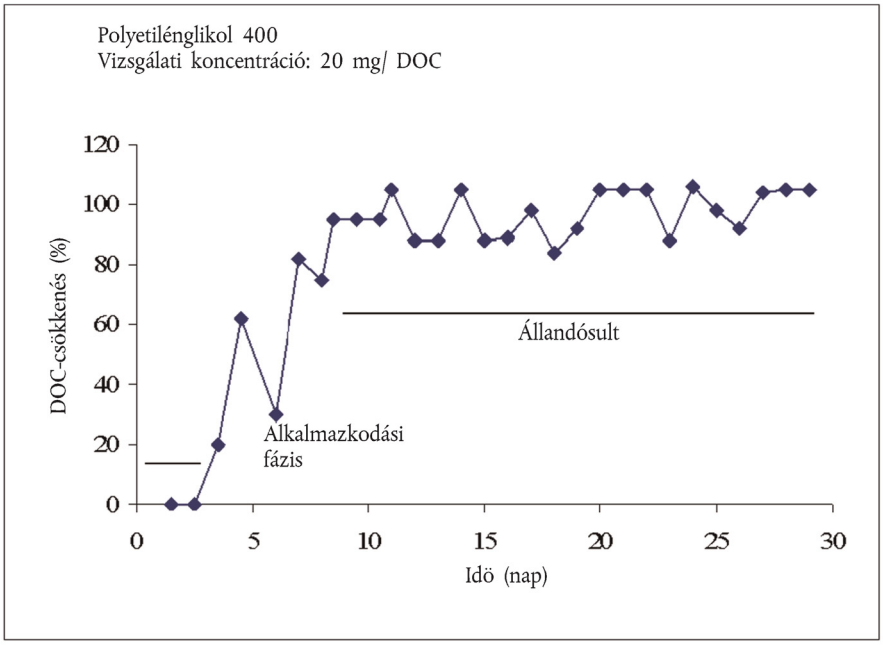
A háromliteres lyukacsos levegőztető edény részletes rajza



▼**M4**

2. függelék Á

Bomlási görbe példája



▼M4

3. függelék

[TÁJÉKOZTATÓ INFORMÁCIÓK]

KAPCSOLT BERENDEZÉSEK ALKALMAZÁSA

Az iszapcsere célja, hogy megpróbáljuk kiegyenlíteni az iszapokban kialakuló mikrobapopulációk nagyságát a vizsgálati berendezésben, amelybe a vizsgált vegyületet tartalmazó szennyvizet adagolunk, valamint a kontroll berendezésben, amelybe csak szennyvizet töltünk. (1). Az eljárás a „kapcsolt berendezések alkalmazása" nevet kapta, a módszer pedig „kapcsolt üzemmódként" ismert. Az eljárást eredetileg eleveniszapos Husmann-berendezésekkel alkalmazták, de a „lyukacsos edény" elrendezésben is sor került már a használatára (2)(3). Mivel a kapcsolt üzemmód sem a Husmann-berendezés, sem a lyukacsos edény esetén nem eredményezett jelentős eredménybeli eltérést a nem kapcsolt üzemmódhoz képest, a kapcsolt berendezések alkalmazásához szükséges idő és energia befektetése nem hoz különösebb hasznot.

Az iszapcsere következtében látszólag meglehetősen nagyarányú eltávolítás tapasztalható, mivel a vizsgált vegyi anyag egy része is áthelyezésre kerül, és ezáltal a vizsgált vegyi anyag koncentrációja közel egyenlő lesz a vizsgálati és a kontroll berendezésben. Ezért korrekciós tényezőt kell használni, amelynek értékét a kicserélt mennyiség és az átlagos hidraulikus tartózkodási idő határozza meg. A részletes számítás a szakirodalomban (1) megtalálható.

A korrigált DOC vagy COD csökkenési fok az általános képlettel számítható ki:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\%$$

ahol:

D_{tc} = korrigált %-os DOC vagy COD csökkenés

D_t = meghatározott %-os DOC vagy COD csökkenés

a = eleveniszap kicserélt hányada

r = átlagos hidraulikus tartózkodási idő (h)

Például, ha a levegőztető edény tartalmának felét cseréljük ki (a = 0,5), az átlagos hidraulikus tartózkodási idő pedig 6 óra, akkor korrigált érték kiszámításának képlete:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

SZAKIRODALOM

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Kémiai oxigénigény, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131–1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Szimulációs vizsgálat. pp. 113–138. In: 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, UK.

▼M4

4. függelék

ELEVENISZAP GÁTLÁS ÉRTÉKELÉSE

A vizsgált vegyi anyag hatása a folyamatra

1. Léteznek olyan vegyi anyagok (vagy szennyvizek), amelyek azon túl, hogy a szimulációs vizsgálat során nem bomlanak le, illetve távolítódnak el, gátló hatást gyakorolnak az iszapban található mikroorganizmusokra. Más vegyi anyagok alacsony koncentrációban biológiailag lebonthatók, nagyobb koncentrációban viszont gátló hatásúak (hormesis). A gátló hatást vagy egy korábbi szakaszban már észleltük, vagy a szimulációs vizsgálatban alkalmazotthoz hasonló vagy azzal azonos oltóanyaggal végzett toxicitás vizsgálattal állapítható meg (1). Ilyen módszerek az oxigénfogyasztás-gátlás mérése (e melléklet C.11. fejezete (2) és ISO 8192 (3)) vagy az iszapban található organizmusok növekedés-gátlásának értékelése (ISO 15522 (4)).

2. A szimulációs vizsgálat során a gátlás abból látható, hogy a kísérleti edény és a kontroll edény elfolyó oldott szerves szén (DOC) vagy kémiai oxigénigény (COD) értékének különbsége nagyobb, mint a vizsgált vegyi anyag formájában hozzáadott DOC. Másként kifejezve, a vizsgált vegyi anyag jelenléte következtében kisebb mértékű lesz a kezelt szerves közeg DOC (és biokémiai oxigénigény (BOD), kémiai oxigénigény (COD), és/vagy NH^{+}_{4}) értékének a százalékos csökkenése. Ennek előfordulása esetén ismételt vizsgálatot kell végrehajtani, amelynek során addig a szintig kell csökkenteni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját, amikor a gátlás megszűnik, vagy amíg a vegyi anyag biológiai lebontása bekövetkezik. Abban az esetben azonban, ha a vizsgált vegyi anyag (vagy szennyvíz) minden vizsgált koncentrációban hátrányos hatással van a folyamatra, arra lehet következtetni, hogy a vegyi anyag biológiai úton nehezen vagy egyáltalán nem bontható. Mindazonáltal érdemes a vizsgálatot megismételni más forrásból származó eleveniszappal és/vagy fokozatosabb alkalmazkodást engedve az iszapnak.

3. Fordított esetben, ha a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlása az első próbálkozásra bekövetkezik a szimulációs vizsgálat során, akkor növelni kell a koncentrációt annak megállapításához, hogy az esetleges gátló hatás megállapítható legyen.

4. A gátlás mértékének meghatározására tett kísérlet során nem szabad elfelejteni, hogy az eleveniszap mikroorganizmus-populációja változhat, azaz idővel ellenállóképességet szerezhet a gátló hatású vegyi anyaggal szemben.

5. A gátlás mértékének kiszámítása:

A teljes százalékos BOD, DOC, COD stb. csökkenés (R_o) a vizsgálati és a kontroll berendezésben a következő képlettel számítható ki:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

ahol:

I = a vizsgálati és a kontroll berendezés befolyó BOD, DOC, COD stb. értéke (mg/l)

E = a hozzá tartozó elfolyó koncentráció (mg/l).

Az I és E értéket korrigálni kell a vizsgálati berendezésbe adagolt vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható DOC-mennyiséggel, hogy a kiszámított százalékos gátlás helyes legyen.

▼**M4**

A vizsgált vegyi anyag jelenlétének tulajdonítható gátlás mértéke a következő képlettel számítható ki:

$$\%\text{gátlás} = 100(R_c - R_t)/R_c$$

ahol:

R_c = százalékos csökkenés a kontroll berendezésekben

R_t = százalékos csökkenés a vizsgálati berendezésekben

SZAKIRODALOM

(1) Reynolds L *et al*. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) E melléklet C.11. fejezete: Biológiai lebomlás – eleveniszap-légzésgátlási vizsgálat.

(3) ISO 8192 (2007) Vízminőség. Az eleven iszap oxigénfogyasztás-gátlásának vizsgálata szén- és ammóniumoxidációval.

(4) ISO 15522 (1999) Vízminőség. A víz alkotóelemei által az eleven iszap mikroorganizmusaira kifejtett gátló hatás meghatározása.

▼M4

5. függelék

Vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok – illékony vegyi anyagok

Vízben rosszul oldódó vegyi anyagok

A vízben rosszul oldódó és oldhatatlan vegyi anyagokkal végzett, szennyvíztisztítást szimuláló vizsgálatok szakirodalma nem túl gazdag (1)(2)(3).

Nem létezik olyan módszer a vizsgált vegyi anyag eloszlatására, amely valamennyi oldhatatlan vegyi anyagra alkalmazható lenne. Az ISO 10634 szabványban (4) leírt négy fajta módszer közül kettő – az emulgálószer használata és/vagy az ultrahangos emulgálás tűnik alkalmasnak arra, hogy a szimulációs vizsgálat céljára megkíséreljünk diszperziót készíteni a vizsgált vegyi anyagból. A diszperziónak legalább 24 órán keresztül meg kell őriznie a stabilitását. A kellőképpen stabilizált diszperziót állandó keverés mellett egy tartályból (38. bekezdés) adagoljuk a levegőztető edénybe a háztartási (mesterségesen készített) szennyvíztől elkülönítve.

Ha a diszperzió stabil, meg kell vizsgálni, hogy milyen módszert alkalmazhatunk a diszpergált vizsgált vegyi anyag meghatározására az elfolyó vízben, az elfolyó víz szilárdanyag-tartalmában és az eleveniszapban. Mivel a DOC általában nem alkalmas paraméter, a vizsgált vegyi anyagra specifikus módszert kell keresni. Ezt követően meghatározzuk, hogy mi történik a vizsgált vegyi anyaggal az eleveniszapos folyamat szimulációjának folyadék és szilárd fázisaiban. A vizsgált vegyi anyag biológiai lebonthatóságát a »tömegegyensúly« alapján ítéljük meg. Ez azonban csak az elsődleges biológiai lebonthatóságot jelzi. A teljes biológiai lebonthatóság kimutatását a gyors biológiai lebonthatóság respirométeres módszer (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő C, F vagy D módszer (5)) segítségével kísérelhetjük meg, amelyhez a szimulációs vizsgálat során a vizsgált vegyi anyag hatásának már kitett iszapot használunk oltóanyagként.

Illékony vegyi anyagok

A szennyvíztisztítás szimulációk illékony vegyi anyagok esetében történő alkalmazása egyaránt vitatott és problematikus. Vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagokhoz hasonlóan az illékony vegyi anyagokkal végzett szimulációs vizsgálatok szakirodalma sem túl gazdag. A tökéletes elegyítésre alkalmas hagyományos berendezésen a következő módosításokat hajtjuk végre: a levegőztető és ülepítő tartályokat légmentesen lezárjuk, a levegőáramlást áramlásmérő segítségével mérjük és szabályozzuk, az eltávozó gázt az illékony szerves anyagok elválasztására szolgáló csapdán vezetjük keresztül. Esetenként az eltávozó gázt egy vákuumpumpa segítségével Tenax és szilikagél töltetet tartalmazó tisztító csapdán vagy hűtött csapdán vezetjük keresztül gázkromatográfia céljára. A csapdázott vizsgált vegyi anyag meghatározásához analitikai módszert használunk.

A vizsgálat két részből áll. A berendezéseket először iszap nélkül üzemeltetjük, de a mesterségesen készített szennyvizet és a vizsgált vegyi anyagot a levegőztető edénybe pumpáljuk. Néhány napon keresztül elemezzük a befolyó és az elfolyó vízből, valamint az eltávozó gázból vett minták összetételét. A gyűjtött adatokból kiszámítható a vizsgált vegyi anyag sztrippeléssel történő százalékos eltávolítása (R_{VS}).

Ezt követően a sztrippelési vizsgálatnál alkalmazottal azonos feltételek mellett elvégezzük a szokásos biológiai vizsgálatot (iszappal). A berendezések hatékony működésének ellenőrzése céljából DOC vagy COD méréseket is végzünk. A vizsgálat első szakaszában alkalomszerűen meghatározzuk a vizsgált vegyi anyag jelenlétét a befolyó és az elfolyó vízben, valamint az eltávozó gázban; az alkalmazkodási fázist követően növeljük az analízisek gyakoriságát. Az állandósult állapot időszaka alatt gyűjtött adatokból kiszámítható a vizsgált vegyi anyag különféle (fizikai és biológiai) folyamatoknak tulajdonítható összes százalékos eltávolítása (R_T) a folyadékfázisban, valamint a sztrippeléssel eltávolított arány (R_V).

▼**M4**

Számítás:

a) A vizsgált vegyi anyag sztrippeléssel történő százalékos eltávolítása (R_{VP}) a nem biológiai vizsgálat során a következő képlettel számítható ki:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

ahol

R_{VP} = a vizsgált vegyi anyag illékonyságnak tulajdonítható eltávolítása (%),

S_{VP} = csapdázott vizsgált vegyi anyag, folyadékfázis koncentráció egyenértékben kifejezve (mg/l),

S_{IP} = a vizsgált vegyi anyag befolyó koncentrációja (mg/l).

b) A vizsgált vegyi anyag sztrippeléssel történő százalékos eltávolítása (R_V) a biológiai vizsgálat során a következő képlettel számítható ki:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

ahol

R_V = a vizsgált vegyi anyag illékonyságnak tulajdonítható eltávolítása (%),

S_V = a biológiai vizsgálat során csapdázott vizsgált vegyi anyag, befolyó-folyadékkoncentráció egyenértékben kifejezve (mg/l),

S_I = a vizsgált vegyi anyag befolyó koncentrációja (mg/l).

c) A vizsgált vegyi anyag különféle folyamatoknak tulajdonítható összes százalékos eltávolítása (R_T) a biológiai vizsgálat során:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

ahol

S_E = a vizsgált vegyi anyag befolyó (folyadék) koncentrációja (mg/l).

d) Következésképpen a biológia lebontással és adszorpcióval történő százalékos eltávolítás (R_{BA}) a következő képlettel számítható ki:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Az vizsgált vegyi anyag adszorbeálódásának megállapítására külön vizsgálatokat kell végezni; adszorbeálódás esetén további korrekció szükséges.

e) A biológiai kezelés vizsgált vegyi anyag légkörbe történő kibocsátására gyakorolt hatására a biológiai és a nem biológiai vizsgálat során mért, sztrippeléssel történő eltávolítási arányok (R_v és R_{vp}) összehasonlításából lehet következtetni.

Példa: Benzol

Iszaptartózkodási idő = 4 nap

Mesterségesen készített szennyvíz; tartózkodási idő = 8 h

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22{,}5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼**M4**

Tehát

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % and R_{BA} = 85 %.

Feltételezzük, hogy a benzol nem adszorbeálódik az iszapon.

SZAKIRODALOM

(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) Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítésére és kezelésére azok vizes közegben való biológiai lebonthatóságának értékeléséhez.

(5) E melléklet C.4. fejezete: A »gyors« biológiai lebonthatóság meghatározása.

▼M4

6. függelék

Az iszaptartózkodási idő (SRT) hatása a vegyi anyagok kezelhetőségére

BEVEZETÉS

1. A főszövegben ismertetett módszer annak megállapítására szolgál, hogy egy vizsgált vegyi anyag (amelyről általában tudott, hogy jellegénél fogva biológiailag lebontható, de nem gyorsan lebontható) biológiailag lebontható-e a szennyvíztisztító telepek korlátai között. Az eredményt százalékos eltávolításként vagy százalékos biológiai lebonthatóságként fejezzük ki. Az eleveniszapos berendezések üzemi feltételei és a befolyó szennyvíz típusa azonban nagymértékben befolyásolják a vegyi anyag elfolyó koncentrációját. A vizsgálatok során általában csak egy névleges lebegőanyag koncentrációt vagy névleges iszaptartózkodási időt (SRT) veszünk figyelembe, holott az SRT értéke az alkalmazott iszapelvételi módszertől függően napról napra, sőt egy napon belül is nagymértékben változhat.

2. Ennél a változatnál (1)(2) jóval szűkebb határok között tartjuk az SRT értékét az egyes 24 órás időszakokon belül (ahogy a nagyméretű üzemeknél is történik), melynek eredményeként az elfolyó koncentráció állandóbb értéket mutat. Háztartási szennyvíz használata ajánlott, mivel egységesebb és magasabb eltávolítási százalékot eredményez. A különböző SRT értékek hatásai mellett részletesebb vizsgálattal a hőmérséklet bizonyos tartományon belüli változásának elfolyó koncentrációra gyakorolt hatásai is meghatározhatók.

3. Még nincs általános egyetértés arról, hogy milyen kinetikai modellel írható le a vegyi anyagok szennyvíztisztítási körülmények közötti biológiai lebomlása. Mivel a módszert csak sok tonnára rúgó mennyiségben előállított és ennek következtében a szennyvízben 1 mg/l feletti koncentrációban előforduló vegyi anyagok esetén történő alkalmazásra szánjuk, a baktérium-szaporodási sebesség szubsztrátumtól való függésének Monod-féle modelljét választottuk a gyűjtött adatok feldolgozására (1)(2). Az egyszerűsített modell és az alkalmazott feltevések érvényességének megállapítására különböző elsődleges biológiai lebonthatósági fokkal rendelkező elemekből álló alkohol-etoxilát sorozatot használtunk (2)(3).

Megjegyzés: A módszernek ez a változata sokban hasonlít a C.10. fejezet A részében leírt vizsgálati módszerhez, ezért a következőkben csak az eltéréseket ismertetjük részletesen.

A VIZSGÁLAT ELVE

4. Az iszaptartózkodási idő (SRT vagy θ_s) nagyon pontos szabályozását lehetővé tevő, (szinte) folyamatos iszapelvételt biztosító »lyukacsos edény« típusú eleveniszapos berendezéseket különböző SRT és – igény szerint – hőmérsékleti értékekkel működtetünk nem kapcsolt üzemmódban. Az iszaptartózkodási időt általában 2–10 nap, a hőmérsékletet 5–20 °C között változtatjuk. A szennyvizet (lehetőleg háztartási) és a vizsgált vegyi anyag oldatát külön adagoljuk a berendezésbe úgy, hogy a kívánt iszaptartózkodási idő (3–6 óra) és befolyó vizsgált vegyi anyag koncentráció biztosított legyen. Az összehasonlítás céljára a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó kontroll berendezést működtetünk a vizsgálati berendezéssel párhuzamosan.

5. Más típusú készülék is használható, de különös gondot kell fordítani arra, hogy az SRT jól szabályozható legyen. Például, ülepítő edénnyel rendelkező berendezés használata esetén figyelembe kell venni az elfolyó lebegőanyag veszteséget. Különleges óvintézkedéseket kell tenni továbbá az ülepítő edényben lévő iszapmennyiség eltéréseiből adódó hibák elkerülése.

▼M4

6. Miután a választott üzemi feltételekkel működtetett berendezés elérte az egyensúlyi állapotot, körülbelül három héten keresztül figyeljük az állandósult állapothoz tartozó átlagos vizsgált vegyi anyag és – igény szerint – DOC-koncentrációt az elfolyó vízben. A százalékos vizsgált vegyi anyag eltávolítás és – igény szerint – DOC-csökkenés értékelése mellett grafikusan ábrázoljuk az üzemi feltételek és az elfolyó koncentráció közötti összefüggést. Ennek alapján tentatív kinetikai állandókat számíthatunk és meghatározhatjuk, hogy milyen feltételek mellett kezelhető a vizsgált vegyi anyag.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

7. A C.10. fejezet A részének 12–13. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

MEGFELELÉSI SZINTEK

8. A C.10. fejezet A részének 14–15. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. A C.10. fejezet A részének 16. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK MEGISMÉTELHETŐSÉGE

10. A C.10. fejezet A részének 17–18. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

11. Megfelelően módosított lyukacsos edény (6.1. függelék), amely egy 3,2 mm vastagságú és kb. 90 μm pórusátmérőjű porózus polietilénből, tompavarratos hegesztéssel készült belső edényből (vagy betétből) áll (ez a berendezés masszívabb, mint a C.10. fejezet A részének 21. bekezdésében leírt változat), amely egy áthatolhatatlan külső edényben helyezkedik el. Ez két részből áll: egy kerek alaplapból, amelybe két légvezeték és egy iszap elvezetésére szolgáló vezeték csatlakoztatására szolgáló lyukakat fúrtunk, és egy hengeres tartályból, amelyet csavarok rögzítenek az alaplaphoz, és amelynek a kimenete úgy van elhelyezve, hogy a lyukacsos edény térfogata ismert (3 l) legyen. Az egyik légvezetékhez egy porlasztókő van csatlakoztatva, a másik vége nyitott, és az edényben elhelyezett porlasztókővel derékszöget zár be. Ez a rendszer biztosítja a szükséges légáramlást ahhoz, hogy az edény tartalma tökéletesen elkeveredjen, és az oldott oxigén koncentráció értéke 2 mg/l felett legyen.

12. A megfelelő számú berendezést 5–20 °C (±1 °C) tartományon belüli szabályozott hőmérséklet mellett üzemeltetjük vízfürdőben vagy állandó hőmérsékletű helyiségben. A vizsgált vegyi anyag oldatát és az ülepített szennyvizet adagolópumpák segítségével juttatjuk a levegőztető edénybe a megfelelő adagolási sebességet (0–1,0 ml/perc, illetve 0–25 ml/perc) biztosítva, a levegőztető edényből történő iszapelvételre pedig egy harmadik szivattyút alkalmazunk. Az iszapelvételhez nagyon alacsony áramlási sebességet kell alkalmazni, amelyet a magasabb sebességre beállított szivattyú időkapcsoló segítségével történő, szakaszos működtetésével érhetünk el: például percenként 10 mp üzemidő esetén a 3 ml/percre beállított átviteli teljesítmény 0,5 ml/perc iszapelvételi sebességet biztosít.

Szűrőkészülék vagy centrifuga

13. A C.10. fejezet A részének 23. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Analitikai berendezések

14. A C.10. fejezet A részének 24. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Víz

▼M4

15. A C.10. fejezet A részének 25–26. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

Szerves közeg

16. A C.10. fejezet A részének 27. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Mesterségesen készített szennyvíz

17. A C.10. fejezet A részének 28. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Háztartási szennyvíz

18. A C.10. fejezet A részének 29. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

Eleveniszap

19. A C.10. fejezet A részének 30. bekezdésében foglaltak alkalmazandók.

A vizsgált vegyi anyag törzsoldatai

20. A C.10. fejezet A részének 31–32. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

ELJÁRÁS

Az oltóanyag előkészítése

21. A C.10. fejezet A részének 34. bekezdésében foglaltak alkalmazandók azzal, hogy csak eleveniszap használható (kb. 2,5 g/l).

A vizsgálati berendezések száma

22. Egy egyszerű vizsgálathoz – például a százalékos eltávolítás méréséhez – egyetlen SRT elegendő, de a kinetikai állandók számításához szükséges adatok gyűjtése már 4 vagy 5 SRT alkalmazását igényli. Általában 2–10 nap közötti értékeket kell választani. Gyakorlati szempontból kényelmes megoldás, ha egy hőmérséklet mellett párhuzamosan 4 vagy 5 különböző iszaptartózkodási idővel végezzük el a vizsgálatot; míg terjedelmesebb vizsgálatoknál ugyanazokat vagy esetleg más SRT értékeket használunk az 5–20 °C tartományon belüli más hőmérsékletekkel. Az elsődleges biológiai lebonthatóság vizsgálatához (a fő felhasználási terület) általában feltételrendszerenként egy berendezés elegendő. A teljes biológiai lebonthatóság megítéléséhez azonban minden feltételrendszerhez külön kontroll berendezés szükséges, amelybe csak szennyvizet adagolunk a vizsgált vegyi anyag nélkül. Ha feltételezhető, hogy a vizsgált vegyi anyag jelen van az alkalmazott szennyvízben, akkor az elsődleges biológiai lebonthatóság értékeléséhez is kell kontroll berendezés, a számítások során pedig el kell végezni a szükséges korrekciókat.

A szerves közeg és a vizsgált vegyi anyag adagolása

23. A C.10. fejezet A részének 36–39. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók, de a vizsgált vegyi anyag oldatát külön kell adagolni, és különböző iszapelvételi arányokat kell alkalmazni. Rendszeresen – például naponta kétszer – ellenőrizzük, hogy a befolyó, az elfolyó és az iszapelvételi sebesség a ±10 % tűréshatáron belül van, és szükség esetén állítsuk utána az áramlási sebességet. Ha háztartási szennyvizet használunk, és az analitikai módszerek alkalmazása során nehézséget tapasztalunk, akkor végezzük el a vizsgálatot mesterségen készített szennyvízzel, de gondoskodjunk arról, hogy az eltérő hordozóanyag ne eredményezzen eltérő kinetikai adatokat.

Az eleveniszapos berendezések kezelése

24. A C.10. fejezet A részének 40–43. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók, de csak az »állandó« iszap-elvétellel szabályozzuk az iszaptartózkodási időt.

Mintavétel és analízis

25. A C.10. fejezet A részének 44–50. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók azzal a kivétellel, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációját kell csak meghatározni, a DOC meghatározása választható; a COD nem alkalmazandó.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

26. A C.10. fejezet A részének 52–54. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

A vizsgálati eredmények bemutatása

27. A C.10. fejezet A részének 56–62. bekezdéseiben foglaltak alkalmazandók.

Kinetikai állandók számítása

28. A százalékos elsődleges biológiai lebonthatóságnál reálisabb képet nyújt, ha a vizsgált vegyi anyag állandósult állapothoz tartozó átlagos elfolyó koncentrációját adjuk meg, és leírjuk, hogy ez a paraméter hogyan változik az üzemi feltételek függvényében. Ehhez a 6.2. függelékben szereplő (6) egyenletet használhatjuk, amellyel meghatározható a K_S, a μ_m és a θ_{SC}, azaz a kritikus iszaptartózkodási idő.

(A másik lehetőség, hogy egy a 2. egyenlettel (6.2. függelék) megadott elméleti görbét a kapott kísérleti értékekhez illesztő egyszerű számítógépes programmal határozzuk meg a K_S és a μ_m közelítő értékeit. Bár egyetlen megoldás sem lesz egyértelmű, a K_S és μ_m elfogadható közelítését adja.)

A vizsgálati eredmények változatossága

29. Általános tapasztalat, hogy az egyes vegyi anyagok változatos kinetikai paramétereinek meghatározott értékei eltéréseket mutatnak. Vélhetőleg az iszapfejlődés körülményei és az alkalmazott vizsgálati körülmények (miként az 5. bekezdésben említett és más vizsgálatoknál) egyaránt jelentős hatást gyakorolnak a kapott értékekre. A változatosság egyik aspektusának elemzése során Grady et al (4) az »extant« és az »intrinzikus« kifejezéseket javasolta annak a két szélsőséges fiziológiai állapotnak a leírására, amelyeket egy baktériumkultúra egy kinetikai kísérlet során elérhet. Ha a vizsgálat során nem megengedett az állapotváltozás, akkor a kinetikai paraméterek értékei a mikroorganizmusok származási helyére jellemző környezeti feltételeket tükrözik; ezeket nevezzük extant, azaz »már meglévő« értékeknek. A másik szélsőség, amikor a vizsgálati körülmények a lehető leggyorsabb növekedési sebességet engedve a fehérjeszintetizáló rendszer teljes kifejlődését lehetővé teszik. Az így kapott kinetikai paraméterek intrizikusak, azaz kizárólag a szubsztrátum jellegétől és a baktériumkultúra típusától függenek. Útmutatásként elmondható, hogy ha a szubsztrátum-koncentráció kompetens mikroorganizmusokhoz viszonyított arányát (S_o/X_o) alacsonyan tartjuk (például 0,025), akkor extant értékeket kapunk, míg intrinzikus értékek akkor születnek, ha ez az arány magas (például legalább 20). Az S_o egyik esetben sem lehet kisebb, mint a K_s féltelítési állandó vonatkozó értéke.

30. A változatosság kérdésével és a biológiai lebonthatóság kinetikai vizsgálatának egyéb aspektusaival egy közelmúltban rendezett SETAC workshop is foglalkozott (5). Az ilyen és hasonló – már leírt illetve tervezett – kutatások egyre világosabb képet adnak a szennyvíztisztító telepeken végbenő folyamatok kinetikájáról, és ezáltal lehetővé teszik a jelenleg rendelkezésre álló adatok jobb értelmezését, valamint alapul szolgálnak a helytállóbb jövőbeli vizsgálati módszerek kialakításához.

SZAKIRODALOM:

(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**

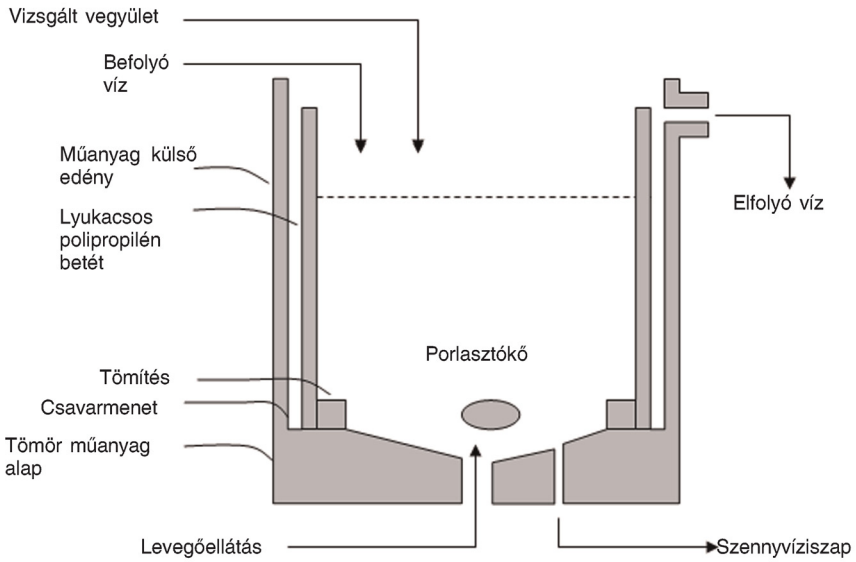
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742–748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

6.1. függelék

Lyukacsos edény SRT-szabályozással



▼M4

6.2. függelék

Kinetikai állandók számítása

1. Feltételezve a Monod-féle kinetikai modell alkalmazhatóságát, valamint az aktív szilárd anyagok és a szubsztrátum tömegegyensúlyát az eleveniszapos rendszerben (1), a következő egyenlettel írható le az állandósult állapot:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

vagy

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

ahol:

S_1 = elfolyó szubsztrátum koncentráció (mg/l)

K_S = féltelítési állandó, a koncentráció amelynél $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = fajlagos növekedési sebesség (d^{-1})

μ_m = μ_m maximális értéke (d^{-1})

K_d = aktív szilárd anyagok fajlagos bomlási sebessége (d^{-1})

θ_S = átlagos iszaptartózkodási idő, SRT (d)

Az egyenlet vizsgálatából az alábbi következtetések vonhatók le:

i. Az elfolyó koncentráció független a befolyó koncentrációtól (S_0); következésképpen a százalékos biológiai lebomlás az S_0 befolyó koncentrációnak megfelelően változik.

ii. Az S_1 koncentrációt befolyásoló egyetlen üzemszabályozási paraméter az θ_S iszaptartózkodási idő.

iii. Adott S_0 befolyó koncentráció mellett a kritikus iszaptartózkodási idő:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

ahol:

θ_{SC} = kritikus iszaptartózkodási idő, amely alatt a kompetens mikroorganizmusok kimosódnak az üzemből.

iv. Mivel a (2) egyenlet többi paramétere a növekedés kinetikájával áll összefüggésben, a hőmérséklet valószínűleg befolyásolja az elfolyó szubsztrátum-szintet és a kritikus iszaptartózkodási időt, azaz a hőmérséklet csökkenésével nő az adott tisztítási fok eléréséhez szükséges iszaptartózkodási idő.

2. Feltételezve, hogy az X_2 elfolyó lebegőanyag koncentráció a levegőztető edényben mért X_1 koncentrációhoz képest alacsony, a lebegőanyagok tömegegyensúlyát alapul véve a »lyukacsos edény« rendszerben az iszaptartózkodási idő:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

és

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

ahol:

V = a levegőztető edény térfogata (l)

X_1 = lebegőanyag koncentráció a levegőztető edényben (mg/l)

X_2 = elfolyó lebegőanyag koncentráció (mg/l)

Q_0 = befolyó áramlási sebesség (l/d)

Q_1 = iszapelvétel áramlási sebessége (l/d)

Tehát a Q_1 iszapelvételi sebesség szabályozásával az iszaptartózkodási idő az előre meghatározott értéken tartható.

Következtetések:

3. A vizsgálat elsődleges célja, hogy lehetővé tegye az elfolyó koncentráció és annak alapján a vizsgált vegyi anyag fogadó vizekben mérhető előfordulási szintjének az előrejelzését.

4. Egyes esetekben az S_1 alakulását a θ_S függvényében ábrázoló görbéről azonnal leolvasható a θ_{SC} kritikus iszaptartózkodási idő (például az 1. ábrán látható 3. számú görbe). Ha ez nem lehetséges, akkor az θ_{SC}, valamint a μ_m és a K_S közelítő értékeinek a kiszámításához a $S_1 \bullet \theta_S$ függvényében ábrázoljuk az S_1 alakulását.

Az (1) egyenlet átrendezése után a következő egyenletet kapjuk:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Ha a K_d alacsony, akkor $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$, és az [5] egyenlet a következőképpen írható fel:

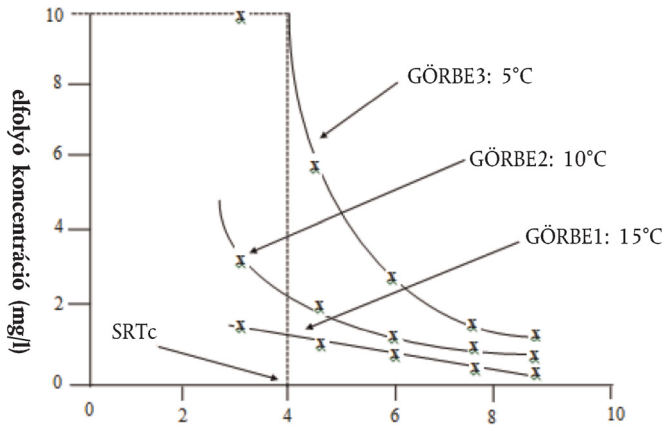
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Ez egy $1/\mu_m$ meredekségű egyenest ír le, amely áthalad a K_S/μ_m ponton; a $\theta_S \sim 1/\mu_m$ (lásd a 2. ábrát).

▼M4

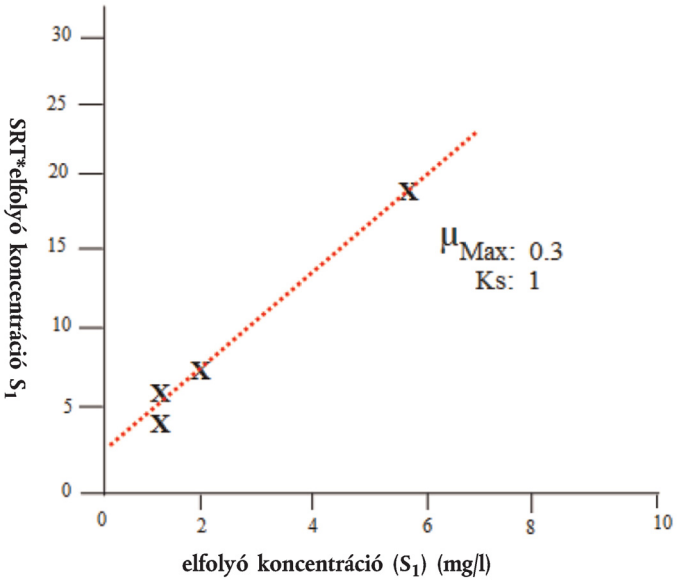
1. ábra

Az SRT alakulása három hőmérsékletérték mellett



2. ábra

Az SRT S_1 vs. S_1 regressziós egyenes T = 5 °C hőmérsékletérték mellett



Glosszárium:

elfolyó koncentráció

görbe

▼M4

7. függelék

ALACSONY (μg/l) KONCENTRÁCIÓ-TARTOMÁNYBAN VÉGZETT VIZSGÁLAT

1. Sok vegyi anyag általában rendkívül alacsony (μg/l) koncentrációban van jelen a vízi környezetben, sőt még a szennyvizekben is. Ilyen koncentrációban feltételezhetően nem szolgálnak elsődleges növekedési szubsztrátumként, hanem nagyobb a valószínűsége annak, hogy a természetesen előforduló különféle szénvegyületekhez hasonló módon, növekedést nem eredményező másodlagos szubsztrátumként kerülnek lebontásra. Következésképpen az ilyen vegyi anyagok lebomlása nem írható le a 6. függelékben bemutatott modellel. Számos alkalmazható modell létezik, és elképzelhető, hogy a szennyvíztisztító rendszerekben uralkodó körülmények között egyszerre több is működik párhuzamosan. E probléma megoldása még sok kutatást igényel.

2. A C.10. fejezet A része főszövegében ismertetett eljárás alkalmazható ugyan, de csak az elsődleges biológiai lebonthatóság értékelésére, megfelelően alacsony (< 100 μg/l) koncentrációk és validált analitikai eljárás használata mellett. A százalékos biológiai lebomlás kiszámítása (lásd a vizsgálati módszer 54. bekezdését) is lehetséges, de az abiotikus folyamatokat (adszorpció, illékonyság, stb.) is figyelembe kell venni. Példaként Nyholm és társai (1)(2) 4 órás ciklus és feltöltés-leszívás eljárás alkalmazásán alapuló kutatására lehet hivatkozni. A kutatók 5 vegyületre határoztak meg pszeudo-elsőrendű állandókat, amelyeket 5–100 μg/l koncentrációban adagoltak mesterségesen készített szennyvízhez. (A teljes biológiai lebonthatóság értékeléséhez ^{14}C-vel jelölt vizsgált vegyi anyagokat használhatunk. Ennek ismertetése meghaladja ennek a vizsgálati módszernek a kereteit, mivel elfogadott eljárások egyelőre nincsenek, bár az ISO 14592 szabvány (3) egyik javasolt módszerében útmutatást találunk a ^{14}C-vel jelölt vizsgált vegyi anyagok használatára.

SCAS vizsgálat

3. A későbbi javaslatokban egy egyszerűbb, kétlépcsős vizsgálat szerepelt (4)(5)(6), amelynek során a félfolyamatos eleveniszapos (SCAS) módszer alkalmazását követően a SCAS berendezésből gyűjtött mintákat rövid távú kinetikai vizsgálatoknak vetjük alá. A SCAS berendezést ismert iszapelvételi arányokkal (az eredeti C.12. vizsgálati módszerrel ellentétben) és az OECD iránymutatása szerinti, mesterségesen készített szennyvíz módosított változatával vagy háztartási szennyvízzel üzemeltetjük. A mesterségesen készített szennyvizet – a változó pH-érték és a rossz iszapülepedés miatt – foszfát puffer, élesztőkivonat, vas(III)-klorid és nyomelem mennyiségben sók hozzáadásával módosítjuk, COD tartalmát pedig a pepton és a húskivonat koncentrációjának növelésével mintegy 750 mg/l-re emeljük. A berendezéseket 24 órás ciklusokban működtetjük: a mesterségesen készített szennyvíz és a vizsgált vegyi anyag legfeljebb 100 μg/l (azaz a rövid távú vizsgálat során használttal hozzávetőlegesen megegyező) koncentrációban történő adagolását a 23 óráig tartó levegőztetést, az iszapelvételt, az ülepítést és a felülúszó (elfolyó) folyadék elvezetését követően kezdjük meg. A kiegyensúlyozott mikrobapopuláció fenntartása érdekében hetente egy alkalommal az összes iszap 10 %-át friss iszapra cseréljük.

4. A vizsgált vegyi anyag koncentrációját a ciklus elején és a levegőztetési periódus végén mérjük, és a vizsgálatot addig folytatjuk, amíg a vizsgált vegyi anyag eltávolítása állandó szintet ér el; ez egy héttől több hónapig tarthat.

Rövid távú vizsgálat

5. A rövid távú (például 8 órás) vizsgálat célja a vizsgált vegyi anyag különböző, ismert eredetű és múltú eleveniszapokban való lebomlása (pszeudo) elsőrendű sebességi állandójának a meghatározása. Az alkalmazkodási kísérlet (3–4. bekezdés) során a levegőztetési periódus végén, amikor a szerves szubsztrátum koncentráció alacsony, iszapmintákat veszünk a SCAS reaktorokból. Összehasonlítás céljára egy párhuzamosan üzemeltetett, a vizsgált vegyi anyagnak nem kitett SCAS berendezésből is vehetünk iszapot. Az iszap és a vizsgált vegyi anyag két vagy több eltérő, az 1–50 μg/l tartományon belüli koncentrációban adagolt keverékét mesterségesen készített

▼M4

szennyvíz vagy más szerves szubsztrátum hozzáadása nélkül levegőztetjük. Legfeljebb 24 órán keresztül rendszeres időközönként meghatározzuk az oldott vizsgált vegyi anyag maradék koncentrációját (például óránként, a vegyi anyag lebonthatóságától függően). A mintákat a megfelelő analízist megelőzően centrifugálni kell.

Számítások

6. A SCAS berendezésekből származó adatokat a vizsgált vegyi anyag százalékos eltávolításának a kiszámításához használjuk fel (54. bekezdés). Emellett a következőképpen számíthatjuk ki a (lebegőanyag koncentrációra vonatkoztatott) K_1 átlagos sebességi állandót:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln\frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

ahol:

t = levegőztetési idő (23 h)

C_e = koncentráció a levegőztetési periódus végén (μg/l)

C_i = koncentráció a levegőztetés kezdetén (μg/l)

SS = eleveniszap lebegőanyag koncentrációja (g/l)

7. A rövid távú vizsgálat során a log% maradék koncentrációt az idő függvényében ábrázoljuk. A görbe kezdeti szakaszának (10–50 % lebomlás) meredeksége a K_1 (pszeudo) elsőrendű állandónak felel meg. Az iszap lebegőanyag koncentrációjára vonatkoztatott állandó kiszámításához a meredekséget elosztjuk a lebegőanyag koncentrációval. Az eredmény bemutatásának a kiinduló vizsgált vegyi anyag és lebegőanyag koncentrációk, az iszaptartózkodási idő, az iszapterhelés és az iszap forrása, valamint a vizsgált vegyi anyagnak való kitétel előtti állapot (ha van ilyen) részletezését is tartalmaznia kell.

Az eredmények változatossága

8. A változatosság kérdésével és a biológiai lebonthatóság kinetikai vizsgálatának egyéb aspektusaival egy közelmúltban rendezett SETAC workshop is foglalkozott (7). Az ilyen és hasonló – már leírt illetve tervezett – kutatások egyre világosabb képet adnak a szennyvíztisztító telepeken végbenő folyamatok kinetikájáról, és ezáltal lehetővé teszik a jelenleg rendelkezésre álló adatok jobb értelmezését, valamint alapul szolgálnak a helytállóbb jövőbeli vizsgálati módszerek kialakításához.

SZAKIRODALOM

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and 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, and 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). Vízminőség. A vízben kis koncentrációban jelen lévő szerves vegyületek aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and 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 and 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) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

C.10-B: Biofilmek

BEVEZETÉS

1. Szimulációs vizsgálatot általában olyan vegyi anyagoknál alkalmazunk, amelyek a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló szűrővizsgálaton nem mentek át (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő A–F módszerek (9)), a jellegénél fogva biológiailag lebontható anyagok azonosítására szolgáló vizsgálaton viszont átmentek. Kivételesen akkor is alkalmazható szimulációs vizsgálat, ha valamely vegyi anyagról – különösen egy sok tonnára rúgó mennyiségben előállított vegyi anyagról – több információra van szükségünk, amely esetben általában eleveniszapos vizsgálatot (C.10. fejezet A része) végzünk. Bizonyos körülmények között azonban a vegyi anyag biofilmes szennyvíztisztítási módszerekkel – nevezetesen a csepegtetőtestes, forgó biológiai kontaktoros és a fluidágyas eljárásokkal – szembeni viselkedésére vonatkozó konkrét információ szükséges. Az ilyen igények kielégítésére különféle eszközöket fejlesztettek ki.

2. Gerike *et al*. (1) nagyméretű kísérleti csepegtetőtesteket alkalmazott, amelyeket kapcsolt üzemmódban működtetett. Ezek a berendezések nagy helyet foglaltak el, és viszonylag nagy mennyiségű szennyvizet vagy mesterségesen készített szennyvizet igényeltek. Truesdale *et al*. (2) kisebb (6 ft x 6 in. átmérőjű) szűrőket írt le, amelyekbe azonban még mindig elég nagy mennyiségben kellett a felületaktív anyagoktól mentes természetes szennyvizet tölteni. Az „érett” biofilm kialakulásához hosszú, 14 hetes időszak kellett, a vizsgált felületaktív anyag adagolásának megkezdése előtti alkalmazkodáshoz pedig további 4–8 hétre volt szükség.

3. Baumann *et al.* (3) egy jóval kisebb szűrőt fejlesztett ki, amelyben egy eleveniszapban előáztatott, gyapjúszerű poliészterszalagot használtak a biofilmképződést támogató semleges közegként. Kizárólagos szénforrásként a vizsgált vegyi anyag szolgált, a biológiai lebonthatóságot pedig a befolyó és az elfolyó víz oldott szerves szén (DOC), valamint az eltávozó gáz CO_2 tartalmának mérései alapján értékelték.

4. Egy egészen más megközelítést alkalmazott a forgótárcsás reaktort feltaláló Gloyna *et al.* (4). Ebben az esetben a biofilm-képződés a vízszinteshez viszonyítva kis dőlésszögben elhelyezett forgó cső ismert területű belső felületén megy végbe a felülről befolyó szennyvíz áthaladása következtében. A reaktort felületaktív anyagok biológiai lebonthatóságának tanulmányozására (5), valamint a biofilm optimális vastagságának és a filmen való optimális áthaladásnak a vizsgálatára használták (6). A reaktort ugyanezek a szerzők továbbfejlesztették, és többek között alkalmassá tették az eltávozó gáz CO_2 tartalmának a meghatározására.

5. A forgótárcsás reaktort a Standing Committee of Analysts (UK) a vegyi anyagok biológiai lebonthatósága (7), valamint a szennyvizek kezelhetősége és toxicitása (8) értékelésének szabványos módszereként fogadta el. Az itt bemutatott módszer előnye egyszerűségében, tömörségében, reprodukálhatóságában és viszonylag korlátozott szerves közeg igényében rejlik.

A VIZSGÁLAT ELVE

6. A mesterségesen készített vagy háztartási szennyvizet és a vizsgált vegyi anyagot keverék formájában vagy külön-külön egy lassan forgó, döntött cső belsejébe vezetjük. A belső felületen a bioszűrők közegén jelen lévőhöz hasonló mikroorganizmus-réteg képződik. A reaktor működési feltételeit úgy kell megválasztani, hogy megfelelő mértékű szerves anyag lebomlást és szükség esetén ammónium oxidációt biztosítson.

▼M4

7. A csőből kifolyó vizet felfogjuk, és ülepítjük vagy szűrjük, mielőtt az oldott szerves szén (DOC) és/vagy – egy specifikus módszerrel – a vizsgált vegyi anyag mennyiségét meghatározzuk. Összehasonlítás céljából azonos feltételek mellett egyidejűleg kontroll berendezéseket működtetünk, amelyekbe nem adagolunk vizsgált vegyi anyagot. Feltételezzük, hogy a vizsgálati és a kontroll berendezések elfolyó vizében mért DOC-koncentrációk különbsége a vizsgált vegyi anyagnak és szerves metabolitjainak tulajdonítható. A vizsgált vegyi anyag lebomlásának meghatározásához ezt a különbséget összehasonlítjuk a hozzáadott vizsgált vegyi anyag (DOC) koncentrációjával.

8. A lebomlást az idő függvényében ábrázoló görbe alapos vizsgálata általában lehetővé teszi a biológiai lebontás biológiai adszorpciótól való megkülönböztetését. Megerősítése általában a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló (oxigénfelvétel vagy széndioxid-termelés) vizsgálat segítségével lehetséges, amelyhez abból a rektorból kell a vizsgálat végén akklimatizált oltóanyagot gyűjteni, amelybe a vizsgált vegyi anyagot adagoltuk.

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

9. Az eredmények helyes értelmezéséhez ismerni kell a vizsgált vegyi anyag tisztasági, vízoldékonysági, illékonysági és adszorpciós jellemzőit.

10. Illékony és rosszul oldódó vegyi anyagok általában csak különleges óvintézkedések megtétele esetén vizsgálhatók (lásd a C.10. fejezet A részének 5. függelékét). Az elméleti értékek kiszámításához, illetve a paraméterek mért értékeinek ellenőrzéséhez (például elméleti oxigénigény (ThOD), (DOC) a kémiai szerkezet vagy legalább a tapasztalati képlet ismerete is szükséges.

11. A vizsgált vegyi anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk (lásd a C.10. fejezet A részének 4. függelékét) hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásánál és különösen fontosak lehetnek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezéséhez.

MEGFELELÉSI SZINTEK

12. Az eredeti követelmények szerint egy felületaktív anyagnak legalább 80 %-os elsődleges biológiai lebonthatósági szintet kellett elérnie ahhoz, hogy forgalmazható legyen. 80 % alatti érték esetén a felületaktív anyag csak akkor forgalmazható, ha az itt bemutatott szimulációs (igazoló) vizsgálat alkalmazása során a meghatározott vegyi anyag több mint 90 %-a eltávolítható. A vegyi anyagok többségénél a megfelelési szint általában nem vet fel kérdéseket, és az eltávolítás százalékos értéke a vegyi anyagok veszélyességének értékelése során alkalmazandó várható környezeti koncentráció közelítő becsléséhez használható fel. Számos vizsgálatban a tiszta vegyületek több mint háromnegyede 90 % feletti százalékos DOC-eltávolítást mutatott, a jelentősebb fokú biológiai lebonthatóságot mutató vegyületek több mint 90 %-a pedig 80 % feletti eredményt ért el.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

13. A kísérleti eljárás helyes végrehajtásának biztosítása érdekében időnként ajánlott ismert viselkedésű vegyi anyagokat is megvizsgálni. Ezek közé tartozik például az adipinsav, a 2-fenilfenol, az 1-naftol, a difénsav, az 1-naftoesav.

A VIZSGÁLATI EREDMÉNYEK MEGISMÉTELHETŐSÉGE

14. Az Egyesült Királyságban egy laboratórium megállapította, hogy a vizsgálatokon belüli relatív szórás 3,5 %, a vizsgálatok közötti 5 % volt (7).

▼M4

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

Forgótárcsás reaktorok

15. A készülék (lásd a 8. függelék 1. és 2. ábrját) fémállványra helyezett, gumikarimás tárcsákra szerelt akrilcsövekből áll, amelyek mindegyike 30,5 cm hosszú, és 5 cm belső átmérővel rendelkezik. Az egyes csöveket körülbelül 0,5 cm szélességű külső perem tartja a tárcsákon, belső felületük durva fémgyapottal van érdesítve, felső (adagoló) nyílásukon pedig egy 0,5 cm szélességű perem van kialakítva, amely megakadályozza a csövekbe kerülő folyadék kifolyását. A tiszta csőbe vezetett vizsgálati közeggel való kellő ideig tartó érintkezés eléréséhez a csöveket a vízszinteshez viszonyítva körülbelül 1 fokos dőlésszögben kell elhelyezni. A gumiabroncsos tárcsákat egy változtatható fordulatszámú motor forgatja lassú sebességgel. A csövek hőmérsékletének szabályozása végett egy állandó hőmérsékletű helyiségben állítjuk fel a készüléket.

16. Ha a forgótárcsás reaktorokat egy-egy valamivel nagyobb, fedeles csőbe helyezzük, és gondoskodunk arról, hogy a csatlakozásoknál ne szökhessenek ki gázok, akkor az eltávozó CO_2 a későbbi mérés céljából lúgos oldatban elnyelethető (6).

17. Minden egyes csőhöz egy 20 l űrtartalmú tárolóedény csatlakozik (A), amelyben 24 órára elegendő szerves közeg és – ha szükséges – hozzáadott vizsgált vegyi anyag van (lásd a 2. ábrát). Szükség esetén a vizsgált vegyi anyag oldata külön adagolható. A tárolóedény aljához közel egy kivezető nyílás van, amelyhez egy megfelelő – példáulédául szilikongumiból készült – cső segítségével egy perisztaltikus pumpán (B) keresztül egy, a döntött cső (C) felső (adagoló) nyílásába 2–4 cm-re benyúló üveg vagy akril továbbítócső csatlakozik. Az elfolyó víz a döntött cső alsó nyílásán egy másik tárolóedénybe (D) csepeg. Az analízist megelőzően az elfolyó vizet ülepítjük vagy szűrjük.

Szűrőkészülék – centrifuga

18. A minták szűrésére olyan, megfelelő pórusméretű (0,45 μm névleges lyukátmérőjű) membránszűrőket alkalmazunk, amelyek minimális mértékben adszorbeálják a szerves vegyületeket és bocsátanak ki szerves szenet. Szerves szenet kibocsátó szűrők alkalmazása esetén a kioldódó szén eltávolítása érdekében a szűrőket meleg vízzel gondosan ki kell mosni. A másik lehetséges megoldás a 40 000 m/s^2 gyorsulás elérésére képes centrifuga alkalmazása.

19. A következők meghatározására alkalmas analitikai berendezések:

— DOC/összes szerves szén (TOC) vagy kémiai oxigénigény (COD),

— meghatározott vegyi anyag (HPLC, GC stb.), ha szükséges,

— pH, hőmérséklet, kémhatás,

— ammónium, nitrit, nitrát, ha a vizsgálatok a nitrifikációt befolyásoló feltételek mellett kerülnek elvégzésre.

Víz

20. Kevesebb, mint 3 mg/l DOC-koncentrációjú csapvíz.

21. Kevesebb, mint 2 mg/l DOC-koncentrációjú ionmentesített vagy desztillált víz.

▼M4

Szerves közeg

22. Szerves közegként mesterségesen készített szennyvíz, háztartási szennyvíz vagy ezek keveréke használható. Kimutatták, hogy a háztartási szennyvíz önmagában történő alkalmazása sok esetben magasabb százalékos DOC-eltávolítást eredményez (eleveniszapos berendezésekben), sőt olyan vegyi anyagok eltávolítását és biológiai lebontását is lehetővé teszi, amelyek az OECD által meghatározott mesterségesen készített szennyvíz alkalmazása esetén nem bonthatók le biológiailag. Ezért háztartási szennyvíz alkalmazása ajánlott. Új tétel használata előtt mindig meg kell határozni a szerves közeg DOC- vagy COD-koncentrációját. A szerves közeg savasságát vagy lúgosságát ismerni kell. Ha a szerves közeg nem elég savas vagy lúgos, akkor megfelelő puffer (nátrium-hidrogén-karbonát vagy kálium-hidrogén-foszfát) hozzáadásával lehet fenntartani a 7,5 ± 0,5 körüli pH-értéket a reaktorban a vizsgálat során. Minden esetben egyedi alapon kell meghatározni, hogy mikor és mennyi puffert kell a szerves közeghez hozzáadni.

Mesterségesen készített szennyvíz

23. Csapvízben oldjunk fel literenként 160 mg peptont, 110 mg húskivonatot, 30 mg karbamidot, 28 mg dikálium-hidrogén-foszfátot (K_2HPO_4), 7 mg nátrium-kloridot (NaCl), 4 mg kalcium-klorid-dihidrátot ($CaCl_2.2H_2O$) és 2 mg magnézium-szulfát-heptahidrátot ($Mg_2SO_4.7H_2O$). Ezzel az OECD által meghatározott és e helyütt példaként megadott módszerrel körülbelül 100 mg/l átlagos DOC-koncentrációjú befolyó szennyvíz készíthető. Alternatívaként alkalmazható más olyan összetétel is, amely hozzávetőleg hasonló ehhez, és a valódi szennyvízéhez közelebb álló DOC-koncentrációt eredményez. Desztillált vízzel kevert olyan műszennyvíz-koncentrátumot is készíthetünk, amely 1 °C hőmérsékleten egy hétig tárolható. Szükség esetén hígítsuk csapvízzel. (Bár ez a közeg nem teljesen megfelelő, például a nitrogén koncentrációja túl magas, míg a széntartalom viszonylag alacsony, a foszfátpuffer hozzáadásán és a peptontartalom növelésén kívül jobb javaslat eddig nem született.)

Háztartási szennyvíz

24. Elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telepről származó, naponta frissen gyűjtött, ülepített szennyvizet használjunk. A durva részecskéktől jobbára mentes szennyvizet az elsődleges ülepítőtartály túlfolyójából vagy az eleveniszapos üzem betáplálási pontjáról kell gyűjteni. A szennyvíz felhasználás előtt több (általában legfeljebb hét) napig tárolható 4 °C hőmérsékleten, amennyiben bizonyítható, hogy a DOC-koncentráció (vagy a COD) nem csökken jelentős mértékben (azaz legalább 20 %-kal) a tárolás során. Új tétel használata előtt mindig be kell állítani a DOC-koncentrációt (vagy a COD-t) egy megfelelő állandó értékre, például csapvíz hozzáadásával, hogy a vizsgálat során minél kisebb zavar keletkezzen.

Kenőanyag

25. A perisztaltikus pumpa görgőit glicerinnel vagy olívaolajjal kenjük: mindkettő alkalmas a szilikongumi csövekkel való használatra.

A vizsgált vegyi anyag törzsoldatai

26. A megfelelően oldható vegyi anyagok törzsoldatait ionmentesített víz vagy a mesterségesen készített szennyvíz ásványi összetevőjének felhasználásával készítjük el a megfelelő koncentrációban (például 1 to 5 g/l). Az oldhatatlan vegyi anyagokra vonatkozóan lásd a C.10. fejezet A részének 5. függelékét. Illékony vegyi anyagok esetén ez a módszer csak akkor alkalmazható, ha módosítjuk a forgótárcsás reaktort (16. bekezdés). Határozzuk meg a törzsoldat DOC és összes szerves szén (TOC) tartalmát, és a későbbiekben minden új tételnél ismételjük meg a mérést. Ha a DOC és a TOC különbsége nagyobb, mint 20 %, akkor ellenőrizzük a vizsgált vegyi anyag

▼M4

vízoldékonyságát. A visszanyerési arány megfelelőségének ellenőrzéséhez (általában > 90 % várható) hasonlítsuk össze a DOC-tartalmat vagy a vizsgált vegyi anyag törzsoldat specifikus analízisével meghatározott koncentrációját a névleges értékkel. Különösen diszperziók esetén kell ellenőrizni, hogy a DOC használható analitikai paraméter, vagy csak a vizsgált vegyi anyagra specifikus analitikai módszert lehet alkalmazni. Diszperzió használata esetén a mintákat centrifugálni kell. Minden új tételre vonatkozóan meg kell határozni az oldott szerves széntartalmat, a kémiai oxigénigényt, illetve – specifikus analízissel – a vizsgált vegyi anyag tartalmat.

27. Határozzuk meg a törzsoldat pH értékét. A szélsőséges értékek azt jelzik, hogy a vegyi anyag hozzáadása hatással lehet az eleveniszap pH értékére a vizsgálati elrendezésben. Ebben az esetben kis mennyiségű szervetlen sav vagy bázis segítségével semlegesíthetjük a törzsoldatot, azaz a pH értéket 7 ± 0,5-re állíthatjuk be – ügyelve arra, hogy elkerüljük a vizsgált vegyi anyag kicsapódását.

ELJÁRÁS

A szerves közeg előkészítése az adagoláshoz

28. A vizsgálat megkezdésekor és a vizsgálat alatt mindvégig gondoskodjunk arról, hogy a befolyó szennyvizet és az elfolyó vizet tartalmazó tartályok és az elvezető csövek mindig alaposan meg legyenek tisztítva, hogy ne alakulhassanak ki rajtuk mikrobatenyészetek.

29. Minden nap friss műszennyvizet (23. bekezdés) használjunk, amelyet a szilárd anyagok vagy a törzsoldat koncentrátum csapvízzel történő hígításával készítünk. Egy mérőhenger segítségével mérjük ki a szükséges mennyiséget, és töltsük egy tiszta edénybe, amelyet a befolyó szennyvíz tárolására használunk. Szükség esetén a hígítás előtt adjunk megfelelő mennyiséget a vizsgált vegyi anyag vagy a referencia-vegyianyag törzsoldatából a mesterségesen készített szennyvízhez. Egy külön tartályban is elkészíthetjük a vizsgált vegyi anyag hígított oldatát, hogy egy külön adagolópumpa segítségével adagoljuk a döntött csövekbe, amennyiben ez a megoldás kényelmesebb, vagy a vizsgált vegyi anyaggal takarékoskodni kell.

30. Alternatívaként (és lehetőség szerint) használjunk ülepített háztartási szennyvizet (24. bekezdés), amelyet lehetőleg minden nap frissen gyűjtsünk.

A forgótárcsás reaktorok működtetése

31. Egy vizsgált vegyi anyag értékeléséhez két egyforma forgótárcsás reaktor szükséges, amelyeket állandó – szokásos körülmények között 22 ± 2 °C – hőmérsékletű helyiségben kell felállítani.

32. A perisztaltikus pumpák átviteli teljesítményét úgy állítsuk be, hogy óránként 250 ± 25 ml szerves közeget továbbítsanak (a vizsgált vegyi anyag nélkül) a 18 ± 2 rpm fordulatszámmal forgó döntött csövekbe. A berendezés megfelelő működésének biztosítása és élettartamának meghosszabbítása érdekében a vizsgálat megkezdésekor és a vizsgálat időszaka alatt rendszeres időközönként kenjük a pumpacsöveket (25. bekezdés).

33. A csövek vízszinteshez viszonyított dőlésszögét úgy állítsuk be, hogy a tiszta csőbe adagolt anyag tartózkodási ideje 125 ± 12,5 mp legyen. A tartózkodási idő becsléséhez adjunk nem biológiai markert (például NaCl, semleges festékanyag) a betöltött anyaghoz: az elfolyó csúcskoncentráció eléréséhez szükséges időt tekintjük átlagos tartózkodási időnek (ha a film eléri a maximális vastagságot, a tartózkodási idő kb. 30 percre nőhet).

34. Kimutatták, hogy ezekkel az átfolyási, sebesség és idő értékekkel megfelelő mértékű (> 80 %) DOC (vagy COD) csökkenés érhető el, és nitrifikált elfolyó szennyvíz keletkezik. Elégtelen eltávolítás vagy egy adott szennyvíztisztító telep teljesítményének szimulálása esetén változtatni kell az áramlási sebességen. Az utóbbi esetben a szerves közeg adagolási sebességét úgy kell módosítani, hogy a reaktor teljesítménye megfeleljen a szennyvíztisztító teljesítményének.

▼M4

Beoltás

35. Mesterségesen készített szennyvíz használata esetén a mikroorganizmusok növekedésének beindításához elegendő a levegővel történő érintkezés, máskülönben 3 napon keresztül adjunk literenként 1 ml ülepített szennyvizet a berendezésbe adagolt folyadékhoz.

Mérések

36. Rendszeres időközönként ellenőrizzük, hogy az adagolási és a forgási sebesség az előírt határértékek között van. Mérjük továbbá az elfolyó víz pH-értékét, különösen akkor, ha nitrifikációra számítunk.

Mintavétel és analízis

37. A vizsgálat céljának megfelelő mintavételi módszert, rendszert és gyakoriságot kell választani. Használhatunk például a befolyó és az elfolyó vízből vett gyors (vagy próba) mintákat, vagy hosszabb időszakon – például 3–6 órán – keresztül gyűjtött mintákat. Az első időszakban, amikor még nem adagoljuk a vizsgált vegyi anyagot, hetente kétszer vegyünk mintát. A mintákat membránszűrő segítségével szűrjük, vagy centrifugáljuk kb. 40 000 m/s^2 intenzitással körülbelül 15 percig (18. bekezdés). A membránszűrés előtt szükség lehet a minták ülepítésére és/vagy durva szűrésére. A DOC vagy COD meghatározását legalább egyszer meg kell ismételni, és adott esetben szükség lehet a BOD, ammónium és nitrit/nitrát meghatározására.

38. Minden analízist a mintavételt és a minták előkészítését követő lehető legkorábbi időpontban kell elvégezni. Ha az analízist későbbre kell halasztani, akkor a mintákkal teletöltött, szorosan lezárt üvegeket körülbelül 4 °C hőmérsékleten, sötétben kell tárolni. 48 óránál hosszabb ideig történő tárolás esetén a mintákat mélyhűtéssel, savanyítással vagy megfelelő toxikus anyag (például literenként 20 ml 10 g/l töménységű higany (II)-klorid-oldat) hozzáadásával kell tartósítani. A tartósítási módszer nem befolyásolhatja az analízis eredményét.

Bejáratási időszak

39. Ez alatt az általában 2 hétig tartó, de 6 hétnél nem hosszabb időszak alatt éri el a felületen képződő biofilm az optimális vastagságot. A DOC (vagy COD) csökkenés (44. bekezdés) mértéke nő, majd beáll egy állandó értékre. Miután egy hasonló érték mellett mindkét berendezésnél bekövetkezett az állandósult állapot elérése, kiválasztjuk, hogy melyiket használjuk kontroll berendezésként a vizsgálat hátralevő részében, amelynek során állandó teljesítményt kell mutatnia.

A vizsgált vegyi anyag bevezetése

40. Ebben a szakaszban kezdjük adagolni a vizsgált vegyi anyagot a másik reaktorba a megfelelő – általában 10–20 mg C/l – koncentrációban.

Akklimatizációs időszak

41. Folytatjuk a heti kétszeri DOC (vagy COD) analíziseket, és ha az elsődleges biológiai lebonthatóságot kell értékelni, akkor specifikus analízis segítségével mérjük a vizsgált vegyi anyag koncentrációját. A vizsgált vegyi anyag bevezetését követően egytől hat hétig tartó – különleges körülmények között hosszabb – időszak szükséges az alkalmazkodáshoz. Miután a százalékos eltávolítás (43–45. bekezdés) elérte a maximális szintet, az állandósult állapot időszaka alatt körülbelül 3 héten keresztül 12–15 érvényes értéket kell gyűjteni az átlagos százalékos eltávolítás értékeléséhez. A vizsgálatot akkor lehet befejezettnek tekinteni, amikor kellően magas lebomlási fokot sikerült elérni. Általában törekedni kell arra, hogy a vizsgált vegyi anyag adagolásának megkezdését követően a vizsgálat legfeljebb 12 hétig tartson.

▼M4

Biofilm leválás

42. Viszonylag rendszeres időközönként nagy mennyiségű fölös biofilm válik vagy szakad le a csövek faláról. A vizsgálatok időszaka legalább két teljes növekedési és leválási ciklusra terjedjen annak érdekében, hogy az eredmények összehasonlíthatóságát ez ne befolyásolja.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

43. A vizsgált vegyi anyag DOC (vagy COD) csökkenésének százalékos értékét a következő képlettel számítjuk ki az adott időpontokban történő értékeléshez:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

ahol:

D_t = százalékos DOC (vagy COD) csökkenés a t időpontban,

Cs = a vizsgált vegyi anyagnak tulajdonítható, lehetőleg a törzsoldat koncentrációja és hozzáadott mennyisége alapján becsült befolyó DOC (vagy COD) (mg/l),

E = a vizsgálati berendezés elfolyó vízében mért DOC (vagy COD) a t időpontban (mg/l),

Eo = a kontroll berendezés elfolyó vízében mért DOC (vagy COD) a t időpontban (mg/l).

A referencia-vegyianyag vizsgálata esetén a referencia-vegyianyagra vonatkozóan is végezzük el a számítást.

A kontroll reaktor teljesítménye

44. A kontroll reaktorokba adagolt szerves közeg DOC (vagy COD) csökkenésének foka hasznos információt nyújt a biofilm vizsgálat során megfigyelhető biológiai lebontó képességének az értékeléséhez. A százalékos lebomlás az alábbi képletből számítható ki:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

ahol:

Cm = a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg befolyó DOC vagy COD értéke (mg/l).

45. Amennyiben specifikus analitikai módszerrel mérjük a vizsgált vegyi anyag eltávolítását, a következő képlettel számítjuk ki a vizsgált vegyi anyag lebomlását:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\ \%$$

ahol:

Si = a vizsgált vegyi anyag mért vagy lehetőség szerint becsült koncentrációja a vizsgálati berendezés befolyó szennyvízében (mg/l)

Se = a vizsgált vegyi anyag mért koncentrációja a vizsgálati berendezés elfolyó vízében a t időpontban (mg/l)

▼M4

Ha nem módosított szennyvíz esetén az analitikai módszer az S_c mg/l értékével egyező pozitív eredményt ad, akkor a százalékos eltávolítás (D_{SC}) kiszámítása a következő:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

A vizsgálati eredmények bemutatása

46. A D_t és D_{ST} (vagy D_{SC}) százalékos lebomlást az idő függvényében ábrázoljuk (lásd a C.10. fejezet A részének 2. függelékét). A vizsgált vegyi anyag százalékos eltávolítását az állandósult állapothoz tartozó 12–15 D_T (és ha rendelkezésre áll, D_{ST}) érték (legközelebbi egész számra kerekített) számtani közepe és szórása alapján határozzuk meg. A bomlási görbe alakjából az eltávolítási folyamatokra vonatkozó következtéseket lehet levonni.

Adszorpció

47. Ha egy vizsgált vegyi anyag esetében a vizsgálat kezdetétől fogva nagyfokú DOC-csökkenés figyelhető meg, akkor a vizsgált vegyi anyag lebomlása valószínűleg a biofilmen való adszorbeálódásának köszönhető. Ezt a biofilmről levált szilárd anyagokon adszorbeálódott vizsgált vegyi anyag meghatározásával lehet bizonyítani. Az adszorbeálható vegyi anyagok DOC-csökkenése általában nem marad mindvégig nagyfokú a vizsgálat során; a kezdetben tapasztalható nagyfokú eltávolítás rendszerint fokozatosan csökken, majd eléri az egyensúlyi értéket. Ha azonban az adszorbeálható vegyi anyag valamilyen módon a mikrobapopuláció akklimatizálódását okozza, a vizsgált vegyi anyag DOC-csökkenése a későbbiekben növekszik, majd egy magas értéken állandósul.

Alkalmazkodási fázis

48. A statikus szűrővizsgálatokhoz hasonlóan a biológiai lebontást számos vizsgált vegyi anyag esetében egy alkalmazkodási fázis előzi meg. Az alkalmazkodási fázisban a kompetens baktériumok akklimatizálódnak (vagy alkalmazkodnak), és szinte egyáltalán nem figyelhető meg a vizsgált vegyi anyag eltávolítása; ezt a baktériumok szaporodásának kezdeti időszaka követi. Miután ez a szakasz véget ért, a lebontó fázis kezdetének önkényesen azt az időpontot tekintjük, amikor a vizsgált vegyi anyag kezdeti mennyiségének körülbelül 10 % százaléka kerül eltávolításra (figyelembe véve az esetleges adszorpciót). Az alkalmazkodási fázis általában rendkívül változatos és kevéssé reprodukálható.

Állandósult állapot

49. Egy folyamatos vizsgálat során a bomlási görbe állandó szakasza azt a fázist jelöli, amikor a legnagyobb fokú lebontás figyelhető meg. Az állandósult állapotnak legalább 3 hétig kell tartania, és körülbelül 12–15 mért értéknek kell tartoznia hozzá.

A vizsgált vegyi anyag átlagos lebomlási foka

50. Számítsuk ki a vizsgált vegyi anyag állandósult állapothoz tartozó D_t (és ha rendelkezésre áll, D_{st}) lebomlási értékeinek számtani közepét, majd kerekítsük a legközelebbi egész számra (1 %). Ez lesz a vizsgált vegyi anyag lebomlási foka. A számtani közép 95 %-os konfidencia intervallumát is ajánlott kiszámítani. Hasonlóképpen számítsuk ki a kontroll berendezésbe adagolt szerves közeg átlagos lebomlási fokát (D_B).

▼M4

A biológiai lebontás jele

51. Ha a vizsgált vegyi anyag nem adszorbeálódik jelentős mértékben a biofilmen, és a bomlási görbe a biológiai bomlási görbére jellemző tipikus alakot mutatja (alkalmazkodási fázis, lebontó fázis, állandósult állapot) (48–49. bekezdés), a mért csökkenést biztonsággal lehet a biológiai lebontásnak tulajdonítani. Ha kezdetben nagyfokú eltávolítás figyelhető meg, a szimulációs vizsgálat nem tud különbséget tenni a biológiai és az abiotikus bomlási folyamatok között. Ebben az esetben és minden más esetben, amikor a biológiai lebontással kapcsolatban kétségek merülnek fel (például sztrippelés esetén), biofilm mintákon analizálni kell az adszorbeált vizsgált vegyi anyagot, vagy a biológiai folyamatokra egyértelműen utaló paramétereken alapuló kiegészítő statikus biológiai lebonthatósági (szűrő-) vizsgálatokat kell végezni. Ilyenek például az oxigénfelvételt vizsgáló módszerek (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő D, E és F módszerek) (9) vagy a CO_2 képződést mérő vizsgálat (az e melléklet C.4. fejezetében szereplő C módszer vagy a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálata) (10); oltóanyagként a megfelelő reaktorból származó, a vizsgált vegyi anyagnak már kitett oltóanyagot használunk.

52. Ha a DOC-eltávolítást és az adott vegyi anyag eltávolítását is mértük, az eltávolítási százalékok jelentős különbsége (az előbbi alacsonyabb, mint az utóbbi) olyan szerves köztes termékek jelenlétére utal az elfolyó vízben, amelyek nehezebben lebonthatók lehetnek; ezt vizsgálatnak kell alávetni.

Validity of test results

53. A vizsgálatot akkor tekintjük érvényesnek, ha a DOC (vagy COD) csökkenés foka (D_B) a kontroll berendezés(ek)ben 2 hetes működtetést követően meghaladja a 80 %-ot, és semmilyen szokatlan jelenséget nem figyeltünk meg.

54. Gyorsan lebontható (referencia) vegyi anyag vizsgálata esetén a biológiai lebomlás fokának nagyobbnak kell lennie, mint 90 %, és a megismételt vizsgálat során kapott érték nem mutathat 5 %-nál nagyobb eltérést. Ha ez a két feltétel nem teljesül, felül kell vizsgálni a kísérleti eljárásokat és/vagy más forrásból kell háztartási szennyvizet szerezni.

55. Hasonlóképpen, az ugyanazt a vizsgált vegyi anyagot párhuzamosan kezelő berendezésekkel kapott biológiai lebonthatósági értékek között nem lehet 5 %-nál nagyobb eltérés (amennyiben párhuzamos berendezéseket használunk). Ha ez a feltétel nem teljesül, de az eltávolítás nagyfokú, akkor az elemzést még három hétig folytatni kell. Ha az eltávolítás foka alacsony, akkor meg kell vizsgálni a vizsgált vegyi anyag gátló hatásait, amennyiben még nem ismertek, és ha kivitelezhető, akkor a vizsgált vegyi anyagot alacsonyabb koncentrációban használva meg kell ismételni a vizsgálatot.

Vizsgálati jegyzőkönyv

56. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— azonosító adatok,

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálati elrendezés esetleges módosításai, különösen oldhatatlan és illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén,

— a szerves közeg típusa,

— a szennyvízben található ipari hulladékok aránya és jellege, amennyiben vannak és ismertek,

— a beoltás módja,

▼M4

— a vizsgált vegyi anyag törzsoldata – DOC (oldott szerves szén) és TOC (összes szerves szén) tartalom, szuszpenzió esetén az elkészítés módja, a vizsgálathoz használt koncentráció(k), 10-20 mg/l tartományon kívül eső DOC-koncentráció okai; a hozzáadás módszere és első időpontja, a koncentráció esetleges változtatásai,

— átlagos hidraulikus tartózkodási idő (amikor még nincs biofilm növekedés), cső forgási sebessége, hozzávetőleges dőlésszög, ha meghatározható,

— biofilm leválás részletei, idő és intenzitás,

— vizsgálati hőmérséklet és tartomány,

— alkalmazott analitikai módszerek,

Vizsgálati eredmények:

— mért adatok: DOC, COD, specifikus analízis, pH, hőmérséklet, N-vegyületek**,** ha releváns,

— a számított D_t (vagy D_{tc}), D_B, D_S adatok táblázatos formában és a bomlási görbék,

— az alkalmazkodási fázisra és az állandósult állapotra vonatkozó információk, a vizsgálat időtartama, a vizsgált vegyi anyag, a referencia-vegyianyag (ha vizsgált) és a szerves közeg (kontroll berendezésben) lebomlási foka, statisztikai adatokkal és a biológiai lebonthatóságra valamint a vizsgálat érvényességére vonatkozó megállapításokkal kiegészítve,

— az eredmények szöveges elemzése.

SZAKIRODALOM

(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) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása, A–F részek.

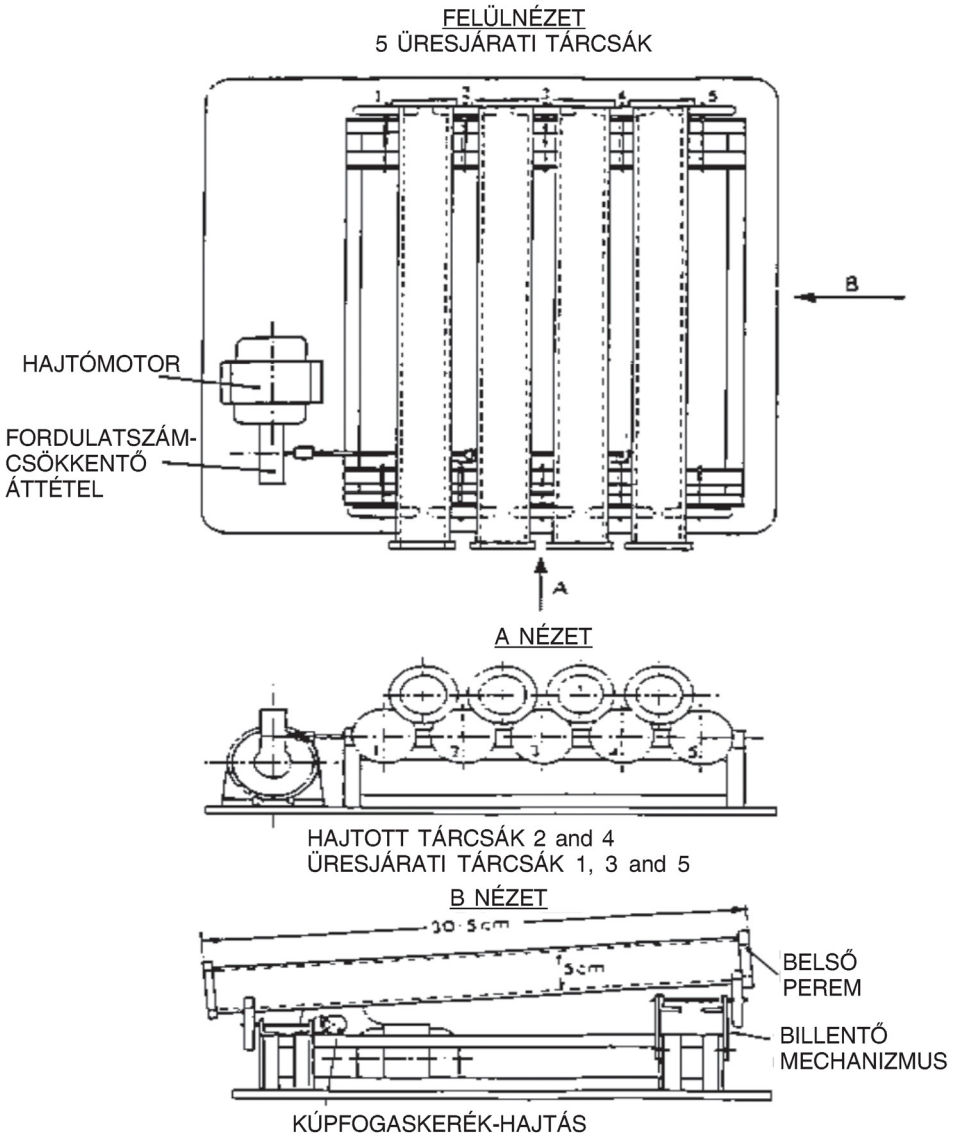
(10) ISO 14593 (1998). Vízminőség. Szerves vegyületek teljes aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése vizes közegben. A lezárt edényzet szervetlen széntartalmának meghatározásán alapuló módszer.

▼M4

8. függelék

1. ábra

Forgótárcsás reaktor



Glosszárium:

felülnézet

A/B nézet

hajtott tárcsák

üresjárati tárcsák

hajtómotor

fordulatszám-csökkentő áttétel

belső perem

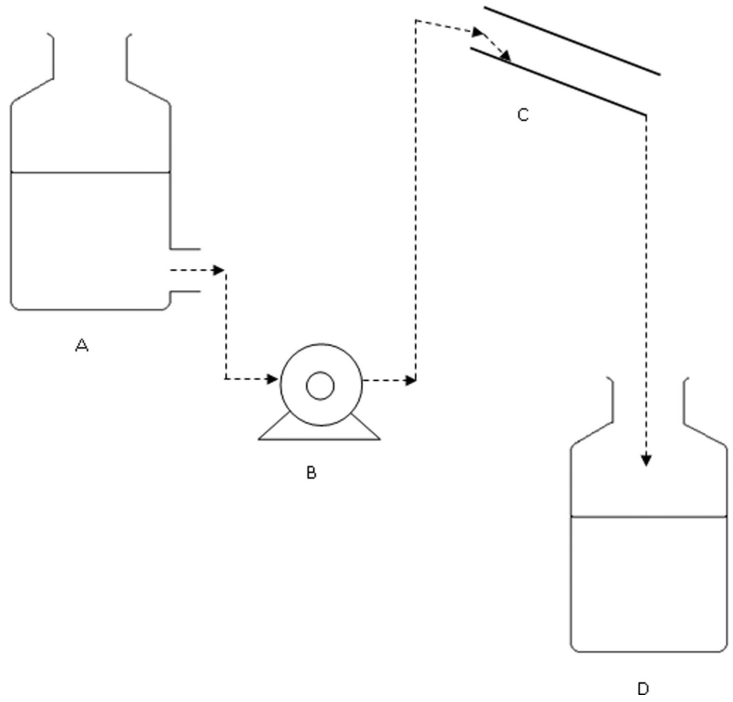
billentő mechanizmus

kúpfogaskerék-hajtás

▼**M4**

2. ábra

Áramlási diagram



A: Adagolótartány

B: Perisztaltikus pumpa

C: Forgó cső

D: Elfolyó víz gyűjtőtartálya

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK:

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

Vegyi anyagok: „Meg kell jegyezni, hogy a ’vegyi anyag’ kifejezést tág értelemben használják az UNCED-szerződésekben és a későbbi dokumentumokban, hogy a termékeket, keverékeket, készítményeket vagy a létező rendszerekben a hatály megjelölésére használt egyéb kifejezéseket magában foglalja”.

▼B

C.11. BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

ELEVENISZAP-LÉGZÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. BEVEZETÉS

A módszerrel úgy mutatható ki valamely vizsgált anyag hatása a mikroorganizmusok működésére, hogy meghatározott körülmények között a vizsgált anyag különböző koncentrációinak jelenlétében mérik a légzés sebességét.

A módszer célja, hogy gyors szűrést tegyen lehetővé a mikrobiológiai szennyvízkezelő telepeket hátrányosan érintő anyagok azonosítására, és jelezze, hogy melyek azok a koncentrációk, amelyek még nem gyakorolnak gátló hatást a biológiai lebonthatóságot vizsgáló kísérletekben.

A meghatározó vizsgálatot megelőzheti egy dózisbehatároló vizsgálat. Ezzel tájékozódunk arról a koncentrációtartományról, amelyet a meghatározó vizsgálat során használnunk kell.

A vizsgálati protokoll tartalmaz két kontrollt is, vizsgált anyag nélkül, egyet a vizsgálati sor elején, egy másikat pedig a végén. Az aktivált iszappal végzett minden vizsgálatot referenciaanyaggal is ellenőrizhetjük.

A módszert leginkább olyan anyagoknál lehet alkalmazni, amelyek vízoldékonyságuk és alacsony illékonyságuk miatt nagy valószínűséggel a vízben maradnak.

A vizsgálati közegben csak korlátozottan oldódó anyagok esetében nem biztos, hogy meghatározható az EC_{50}.

Az oxigén felvételén alapuló eredményekből téves következtetéseket vonhatnak le akkor, ha a vizsgált anyag hajlamos az oxidatív foszforiláció szétkapcsolására.

A vizsgálat elvégzésekor hasznos tudnivalók a következők:

— vízoldékonyság,

— páranyomás,

— szerkezeti képlet,

— a vizsgált anyag tisztasági foka.

Ajánlás

Az aktivált iszap esetlegesen patogén mikroorganizmusokat is tartalmaz, ezért kellő óvatossággal kell kezelni.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A légzési sebesség a szennyvízben található mikroorganizmusok oxigénfogyasztásának üteme aerob iszapban, amelyet rendszerint mg O_2/mg iszap/óra mértékegységben fejezik ki.

▼B

Az adott anyag egy bizonyos koncentrációnál kifejtett gátló hatásának kiszámításához a légzési sebességet a két kontrollban mért légzési sebesség átlagának százalékában fejezik ki:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{százalékos gátlás}$$

ahol:

R_s = az oxigén fogyásának sebessége a vizsgált anyag vizsgált koncentrációja mellett,

R_{c1} = az oxigén fogyásának sebessége az 1. kontrollnál,

R_{c2} = az oxigén fogyásának sebessége a 2. kontrollnál.

Az EC_{50} e módszer szerint a vizsgált anyagnak az a koncentrációja, amelynél a légzési sebesség a módszerben ismertetett körülmények mellett a kontrollban mérhetőnél 50 %-kal kevesebb.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Referenciaanyagként a 3,5-diklór-fenol, mint ismert légzésgátló anyag használatát javasolják, ezt kell az aktivált iszap minden sorozata esetében az EC_{50}-érték szempontjából vizsgálni, így ellenőrizve, hogy az iszap érzékenysége nem rendellenes-e.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALAPELVE

Szintetikus szennyvíz szabványos mennyiségeivel összekevert aktivált iszap légzési sebességét mérik harmincperces és/vagy háromórás érintkezési időt követően. Ugyanezen aktivált iszapnak a vizsgált anyag különféle koncentrációinak jelenlétében is megmérik a légzési sebességét minden más szempontból azonos feltételek mellett. A vizsgált anyag egy bizonyos koncentrációnál kifejtett gátló hatását a két kontrollban mért légzési sebesség átlagának százalékában fejezik ki. Az EC_{50}-értéket a különféle koncentrációknál mért meghatározások alapján számítják ki.

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

A vizsgálatok eredményei akkor érvényesek, ha:

— a két kontroll-légzésisebesség 15 %-nál jobban nem tér el egymástól,

— a 3,5-diklór-fenol hozzáadása mellett mért EC_{50}- (harmincperces és/vagy háromórás) érték az általánosan elfogadott 5–30 mg/liter tartományban van.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Reagensek*

1.6.1.1. A vizsgált anyag oldatai

A vizsgált anyag oldatait a törzsoldatból frissen készítik el a vizsgálat kezdetekor. Ha az alábbiakban ajánlott eljárást követik, a törzsoldat megfelelő koncentrációja 0,5 g/liter.

▼B

1.6.1.2. A kontrollanyag oldatainak elkészítése

A 3,5-diklór-fenol oldatát például elkészíthetik 0,5 g 3,5-diklór-fenol 10 ml 1 M-os NaOH-oldatban történő feloldásával, amelyet desztillált vízzel tovább hígítanak megközelítőleg 30 ml-re, majd állandó keverés közben 0,5 M H_2SO_4-oldatot adnak hozzá a kicsapódási pontig – ehhez körülbelül 8 ml 0,5 M H_2SO_4-re lesz szükség – és végül a keverék mennyiségét desztillált vízzel egy literre egészítik ki. Az oldat pH-ja ekkor 7 és 8 között kell, hogy legyen.

1.6.1.3. Szintetikus szennyvíz

Szintetikus szennyvíz előállításakor az alábbi anyagok megadott mennyiségeit oldják egy liter vízben:

— 16 g pepton,

— 11 g húskivonat,

— 3 g karbamid,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

1. megjegyzés: A szintetikus szennyvíz „A szintetikus detergensekben használt felületaktív anyagok biológiai lebonthatóságának meghatározásához javasolt módszer” című OECD-műszaki jelentésben megadott recept százszoros koncentrátuma (1976. június 11.), dikálium-hidrogén-foszfáttal kiegészítve.

2. megjegyzés: Ha az elkészített oldatot nem használják fel azonnal, sötét helyen 0–4 °C közötti hőmérsékleten egy hétnél nem tovább lehet tárolni, olyan körülmények között, amelyek nem okoznak változást az oldat összetételében. A tárolás előtt a közeget sterilizálhatják, vagy a peptont és a húskivonatot csak kevéssel a vizsgálatok megkezdése előtt adják hozzá. Használat előtt az oldatot össze kell keverni, és a pH-ját be kell állítani.

1.6.2. *Készülék*

Mérőberendezés: A készülék formája nem döntő jelentőségű. A folyadék felszíne felett azonban levegőt kell hagyni, és a mérőfejnek pontosan illeszkednie kell a mérőlombik nyakára.

Szokásos laboratóriumi berendezésekre van szükség, és különösen a következőkre:

— mérőberendezés,

— levegőztetőkészülék,

— pH-elektród és -mérő készülék,

— O_2-elektród.

1.6.3. *Az inokulum előkészítése*

A vizsgálathoz mikrobás inokulumként főleg kommunális szennyvizet kezelő szennyvíztisztító telepről származó aktivált szennyvíziszapot használnak.

Szükség esetén a laboratóriumba való visszatéréskor rövid ideig, például 15 percig tartó ülepítéssel a szennyvíziszapból a durva részecskék eltávolíthatók, majd a felhasználás előtt kidobják a felső rétegben található, finomabb szemcsés, szilárd anyagot. Az iszap azonban össze is keverhető néhány másodperces keveréssel.

▼B

Ezenkívül, feltételezve, hogy gátló anyag is jelen lehet, az iszapot csapvízben és izotóniás oldatban ki kell mosni. Centrifugálás után a felülúszót kidobják (ezt az eljárást háromszor kell megismételni).

Az iszap kis mennyiségének megmérik a súlyát, és megszárítják azt. Ebből az eredményből kiszámítható a nedves iszapnak az a mennyisége, amelyet vízben szuszpendálni kell ahhoz, hogy a kevert folyadékban olyan aktivált iszap jöjjön létre, amelynek szuszpendált szilárdrészecske-tartalma 2–4 g/liter között van. E szint a vizsgálati közegben 0,8–1,6 g/liter közötti koncentrációt eredményez, ha az alábbiakban ajánlott eljárást követik.

Ha az iszapot a begyűjtés napján nem tudják felhasználni, minden literjéhez 50 ml szintetikus szennyvizet adnak, amelyet a fentebb leírtak szerint készítettek el; ezt azután egy éjszakán át 20 ± 2 °C-os hőmérsékleten levegőztetik. A levegőztetést addig folytatják, amíg a nap folyamán sor nem kerül a felhasználásra. Használat előtt ellenőrzik a pH-t, és szükség esetén 6–8 közötti értékre állítják be. A kevert folyadékban a szuszpendált szilárd részecskék mennyiségét az előző bekezdésben foglaltak szerint kell megállapítani.

Ha ugyanazt az iszapminta-sorozatot további napokon is fel kell használni (legfeljebb négy napig), minden munkanap végén további 50 ml szintetikus szennyvizet adnak az iszap minden literjéhez.

1.6.4. *A kísérlet végrehajtása*

Időtartam/érintkezési idő:	30 perc és/vagy három óra, amely alatt folyamatosan levegőztetni kell
Víz:	ivóvíz (szükség esetén klórmentesített)
Levegőellátás:	tiszta, olajmentes levegő. Légáram 0,5–1 liter/perc
Mérőberendezés:	lapos fenekű lombik, például BOD-lombik
Oxigénmérő:	megfelelő oxigénelektród, regisztrálókészülékkel
Tápanyagoldat:	szintetikus szennyvíz (lásd fentebb)
Vizsgált anyag:	a vizsgált oldatot a vizsgálat kezdetekor frissen kell elkészíteni
Referenciaanyag:	pl. 3,5-diklór-fenol (legalább 3 koncentrációban)
Kontrollok:	inokulumot tartalmazó minta, a vizsgált anyag nélkül
Hőmérséklet:	20 ± 2 °C.

A háromórás érintkezési időre a vizsgált anyagra és a referenciaanyagra egyaránt javasolt vizsgálati eljárást az alábbiakban ismertetik:

Több edényt (például egyliteres főzőpoharakat) használnak.

Legalább öt koncentrációt használnak, amelyek egymástól egy állandó 3,2-szeres tényezőnél jobban nem különböznek.

Induláskor a nulladik percben a szintetikus szennyvíz 16 ml-ét vízzel 300 ml-re hígítják. Ehhez 200 ml mikrobás inokulumot adnak, majd a teljes keveréket (500 ml) beleöntik az első edénybe (első kontroll C_1).

▼B

A vizsgálati edényt folyamatosan levegőztetik annak biztosítására, hogy az oldott O_2-tartalom soha ne essen 2,5 mg/liter alá, és hogy a légzési sebesség mérését közvetlenül megelőzően az O_2 koncentrációja legalább 6,5 mg/liter legyen.

A tizenötödik percben (a 15 perc önkényesen választott, de megfelelő hosszúságú intervallum) a fentieket megismétlik, azzal a különbséggel, hogy most a vizsgált anyag törzsoldatának 100 ml-ét adják a 16 ml szintetikus szennyvízhez, mielőtt azt vízzel 300 ml-re kiegészítenék, és hozzáadnák a mikrobás inokulumot az 500 ml teljes térfogatig. E keveréket azután egy második edénybe öntik, és a fentiek szerint levegőztetik. Az eljárást a vizsgált anyag törzsoldatának különböző koncentrációival 15 percenként megismétlik, ami által a vizsgált anyag különböző koncentrációi fognak rendelkezésünkre állni. Végül elkészítenek egy második kontrollt (C_2).

Három óra elteltével a pH-t feljegyzik, és az első edény alaposan elkevert tartalmát beleöntik a mérőberendezésbe, majd legfeljebb 10 percen keresztül mérik a légzési sebességet.

A meghatározást 15 perces időközökben a többi edény tartalmával megismétlik úgy, hogy az érintkezési idő minden edényben három óra legyen.

A referenciaanyagot minden mikrobásinokulum-sorozat esetében azonos módon vizsgálják.

Ettől eltérő eljárást kell alkalmazni, például egynél több oxigénmérőre lesz szükség akkor, ha a méréseket 30 perces érintkezési idő után akarják elvégezni.

Ha a kémiai oxigénigény mérésére van szükség, további edényeket készítenek elő, amelyek tartalmazzák a vizsgált anyagot, a szintetikus tápoldatot, valamint vizet, de nincs bennük aktivált iszap. Az oxigénigényt 30 perces és/vagy háromórás (érintkezési idő) levegőztetés után mérik, és feljegyzik.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A légzési sebességet a rögzítőkészülék nyomvonalából számítják, megközelítőleg 6,5 mg O_2/liter és 2,5 mg O_2/liter között, vagy 10 perces időszak alatt, amikor a légzési sebesség lassú. A légzési görbének az a része, amely alatt a légzési sebességet mérjük, lineáris kell, hogy legyen.

Ha a két kontroll légzési sebessége között 15 %-nál nagyobb az eltérés, vagy ha a referenciaanyag EC_{50}-értéke (30 perces és/vagy háromórás) nincs az elfogadott tartományon belül (5–30 mg/liter között 3,5-diklór-fenolnál), a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni, és meg kell ismételni.

A százalékos gátlást minden egyes vizsgálati koncentrációra kiszámítják (lásd az 1.2. pontot). A százalékos gátlást normál logaritmusos papíron vagy log-probit papíron a koncentráció függvényében ábrázoljuk, és így számítjuk ki az EC_{50}-értéket.

Az EC_{50}-értékek 95 %-os konfidenciaszintjét a szabványos eljárásokkal határozhatjuk meg.

▼B

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— vizsgált anyag: kémiai azonosítási adatok,

— vizsgálati rendszer: az aktivált iszap forrása, koncentrációja és esetleges előzetes kezelése,

— vizsgálati körülmények:

  — a reakcióelegy pH-ja a légzési mérés előtt,

  — vizsgálati hőmérséklet,

  — vizsgálat időtartama,

  — referenciaanyag és mért EC_{50} értéke,

  — abiotikus oxigénfelvétel (ha van).

— eredmények:

  — valamennyi mért adat,

  — gátlási görbe és az EC_{50} kiszámításának módja,

  — EC_{50} és – ha lehetséges – a 95 %-os konfidenciahatárok, EC_{20}- és EC_{80}-értékek,

  — minden megfigyelés és minden eltérés a vizsgálati módszertől, amely az eredményeket befolyásolhatta.

3.2. AZ ADATOK ÉRTELMEZÉSE

Az EC_{50}-értéket úgy kell tekinteni, mint amely csupán iránymutatást jelent a vizsgált anyag esetleges vagy valószínű toxicitásának megítéléséhez akár az aktivált iszappal végzett szennyvízkezelés, akár a szennyvízben jelen lévő mikroorganizmusok tekintetében, hiszen a tényleges környezetben előforduló, igen bonyolult kölcsönhatásokat laboratóriumi vizsgálatokkal nem lehet pontosan utánozni. Ezenkívül az olyan típusú vizsgált anyag, amely az ammónia oxidációját gátolja, szintén adhat atipikus gátlási görbét. Ezért az ilyen grafikonokat kellő óvatossággal kell értelmezni.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) International Standard ISO 8192:1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11, 1977, p. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, p. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, also described by:

(5) Robra, B., Wasser/Abwasser 117, 1976, p. 80.

(6) Schefer, W., Textilveredlung 6, 1977, p. 247.

(7) OECD, Párizs, 1981, 209. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(84) 30 végleges.

▼B

C.12. **BIOLÓGIAI LEBOMLÁS**

MÓDOSÍTOTT SCAS-VIZSGÁLAT

1. **MÓDSZER**

1.1. BEVEZETÉS

E módszernek az a célja, hogy felmérje a vízoldékony, nem illékony szerves anyagok végső biológiai lebontásának lehetőségeit akkor, ha azok statikus vizsgálati körülmények között nagy töménységű mikroorganizmusnak vannak kitéve. A mikroorganizmusok életképességét ezen időszak alatt ülepítettszennyvíz-tápoldat naponkénti hozzáadásával lehet fenntartani. (A hétvégi követelményekhez a szennyvizet 4 °C-os hőmérsékleten lehet tárolni. Másik megoldásként az OECD-megerősítési vizsgálat szintetikus szennyvizét is felhasználhatják.)

A szuszpendált szilárd részecskéken fizikokémiai adszorpció is létrejöhet, amit az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd a 3.2. pontot).

A folyadékfázis hosszú visszatartási ideje (36 óra), valamint a tápanyagok szakaszos hozzáadása miatt a vizsgálat nem teljesen szimulálja a szennyvíztisztító telepen tapasztalható viszonyokat. A különféle vizsgált anyagokkal nyert eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati módszernek igen nagy a biológiai lebonthatósági potenciálja.

A vizsgálathoz előírt feltételek igen kedvezőek a vizsgált anyag lebontására képes mikroorganizmusok szelekciójához és/vagy adaptációjához. (Az eljárást más vizsgálatokhoz szükséges akklimatizált inokulum előállítására is felhasználhatják.)

E módszerben az oldott szerves szén koncentrációjának mérését használják a vizsgált anyag teljes biológiai lebonthatóságának meghatározására. A DOC-értéket kedvezőbb savanyítás és átszűrés után meghatározni, nem pedig a $C_{összes} - C_{szervetlen}$ különbségének értékeként.

A fenti módszer mellett párhuzamosan alkalmazott specifikus analitikai módszer segíthet az anyag primer lebomlásának értékelésében (a kiindulási molekulaszerkezet eltűnése).

A módszer csak olyan szerves vizsgált anyagokra megfelelő, amelyek(nek) a kísérletben használt koncentrációban:

— a vizsgálati körülmények között vízben oldódnak (literenként legalább 20 mg oldott szerves szén),

— páranyomása elhanyagolható,

— a baktériumokat nem gátolják,

— a vizsgálati rendszerben jelentős mértékben nem adszorbeálódnak,

— habképződés útján nem tűnnek el a vizsgált oldatból.

Meg kell határozni a vizsgált anyag szervesszén-tartalmát.

▼B

A vizsgált anyag főbb összetevői egymáshoz viszonyított részarányának ismerete hasznos lehet a kapott eredmények értékelése során, különösen azon esetekben, amikor az eredmények alacsony számértékűek vagy marginálisak.

Az anyag mikroorganizmusokra gyakorolt mérgező hatásának ismerete kívánatos az alacsony számértékű eredmények értékelésénél és a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásánál.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

C_t = a vizsgált anyag koncentrációja szerves szénben kifejezve a levegőztetési időszak kezdetén a szennyvízben jelen lévő, illetve ahhoz hozzáadott állapotban (mg/liter),

C_t = az oldott szerves szén mennyisége a vizsgált anyag felülúszó folyadékában a levegőztetési időszak végén (mg/liter),

C_c = az oldott szerves szén mennyisége a kontroll felülúszó folyadékában a levegőztetési időszak végén (mg/liter).

A biológiai lebonthatóság mértékét e módszerben a szerves szén eltűnésének arányában határozzuk meg. A biológiai lebonthatóságot az alábbiak szerint fejezhetjük ki:

1. A naponta hozzáadott anyag mennyiségére eső D_{da} százalékos eltávolítása:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

ahol:

D_{da} = biológiai lebonthatóság/napi hozzáadott mennyiség.

2. Az egyes napok kezdetén jelen lévő anyag mennyiségére eső D_{ssd} százalékos eltávolítása:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

ahol:

D_{ssd} = biológiai lebonthatóság/anyag mennyisége a nap elején;

az i és (i + 1) index a mérés napját jelzi.

A 2(a) képlet alkalmazása akkor ajánlott, ha a kifolyó vízben a DOC naponta változik, míg a 2(b) képletet inkább akkor használhatjuk, ha a kifolyó vízben a DOC viszonylag állandó szinten marad napról napra.

▼B

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Egyes esetekben, ha új anyagokat vizsgálunk, hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása; konkrét referenciaanyagokat azonban egyelőre nem tudunk ajánlani.

A körvizsgálatban értékelt számos vegyület adatait megadják az 1. függelékben, azért, hogy a módszer kalibrálását időről időre el lehessen végezni, és az eredmények egybevethetőek legyenek akkor is, ha azokat más módszer alkalmazásával nyerték.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ALAPELVE

Szennyvíztisztító telepről származó aktivált iszapot helyeznek egy félig folyamatos aktiváltiszap-egységbe (Semi-Continuous Activated Sladge unit = SCAS). Hozzáadják a vizsgált anyagot és az ülepített kommunális szennyvizet, majd a keveréket 23 órán keresztül levegőztetik. Ezután a levegőztetést leállítják, az iszapot ülepítik, és a felülúszó folyadékot eltávolítják.

A levegőztetőkamrában visszamaradó iszapot a vizsgált anyag és a kommunális szennyvíz további mennyiségével elkeverik, majd a ciklust megismétlik.

A biológiai lebonthatóságot a felülúszóban található oldott szerves szén mennyiségének meghatározásával állapítják meg. Ezt az értéket vetik egybe a csak ülepített szennyvízzel kezelt kontrollcsőben található folyadék hasonló értékével.

Ha specifikus analitikai módszert használunk, mérhető a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai bomlás következtében előállott változása is (elsődleges biológiai bomlás).

1.5. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

Az oldott szerves szén eltávolításán alapuló módszer reprodukálhatósága még nem került meghatározásra. (Az elsődleges bomlást tekintve, a nagymértékben bomló anyagokról igen pontos adatokat nyerhetünk.)

A módszer érzékenységét nagymértékben a kontrollértékek változékonysága és kisebb mértékben az oldott szerves szén, illetve a vizsgált vegyület folyadékkoncentrációjának az egyes ciklusok elején történő kimutatási pontossága határozza meg.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. *Előkészületek*

Megfelelő mennyiségű tiszta levegőztetőedényt vagy az eredeti 1,5 literes, SCAS-vizsgálathoz használt egységet alkalmazhatják, amelybe beillesztik a levegőbeeresztő csöveket (1. ábra) minden, a vizsgált anyagot tartalmazó, illetve kontrolledény esetében. Vattaszűrőn áteresztett sűrített levegőt vezetnek a vizsgálati egységekbe, amely szerves szenet nem tartalmazhat, és amelyet előzetesen vízzel telíteni kell a párolgási veszteségek csökkentésére.

Literenként 1–4 gramm szuszpendált szilárd részecskét tartalmazó kevert folyadékot szereznek be egy főként kommunális szennyvizet kezelő tisztítóműből. A kevert folyadék mintegy 150 ml-ére van szükség minden egyes levegőztetőegységhez.

▼B

A vizsgált anyag törzsoldatait desztillált vízzel állítják elő; normális esetben a szükséges koncentráció 400 mg szerves szén/liter, ami a vizsgált vegyület 20 mg szén/liter koncentrációját eredményezi minden levegőztetési ciklus elején, ha biológiai bomlás nem történik.

Ennél nagyobb koncentrációk is megengedettek, ha a mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitás lehetővé teszi.

A törzsoldat szervesszén-tartalmát meg kell mérni.

1.6.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot 20–25 °C közötti hőmérsékleten kell elvégezni.

Aerob mikroorganizmusok nagy koncentrációit használják (1–4 g/liter közötti szuszpendáltszilárdrészecske-tartalom), és a tényleges visszatartási idő 36 óra. A hozzáadott szennyvízben található széntartalmú anyagok rendszerint nyolc órával az egyes levegőztetési ciklusok megkezdését követően erőteljesen oxidálódnak. Ezt követően az iszap endogén módon lélegzik a levegőztetési időszak végéig, amely időszak alatt az egyetlen rendelkezésre álló szubsztrátum a vizsgált anyag, hacsak az is nem metabolizálódott. E jellemzők a keverék ismételt napi újraoltásával igen kedvező feltételeket teremtenek olyan esetekben, amikor kommunális szennyvizet használunk tápoldatként, mind az akklimatizáció, mind pedig a nagyfokú biológiai bomlás vizsgálatához.

1.6.3. *A kísérlet végrehajtása*

Kevert folyadékmintát vesznek egy főként háztartási szennyvizet kezelő tisztítóműből vagy laboratóriumi készülékből, és azt a laboratóriumi felhasználásig aerob körülmények között tartják. A kevert folyadékból mintegy 150 ml-t töltenek be minden egyes levegőztetőegységbe, a vizsgált anyagot tartalmazó és a kontrollegységbe egyaránt (ha az eredeti SCAS-egységet használják, az említett mennyiségeket tízzel kell megszorozni), és megkezdik a levegőztetést. 23 óra elteltével a levegőztetést leállítják, és az iszapot 45 percen át ülepítik. Egymás után megnyitják az edények csapjait, és levesznek a felülúszó folyadékból 100 ml-t. Közvetlenül felhasználás előtt mintát vesznek az ülepített kommunális szennyvízből, és ebből 100 ml-t hozzáadnak az egyes levegőztetőegységekben maradt iszaphoz. Ezután ismét elkezdik a levegőztetést. E szakaszban még nem adnak vizsgált anyagot az iszaphoz, és az egységeket naponta táplálják a kommunális szennyvízzel egészen addig, míg az ülepítés után tiszta felülúszó folyadékot nem nyernek. Ez rendszerint legfeljebb két hetet vesz igénybe, amikorra a felülúszó folyadékban található oldott szerves szén mennyisége az egyes ciklusok elején valamely állandó érték felé közelít.

Ezen időszak végén az ülepített iszapokat összekeverik, és az eredményül kapott vegyes iszapból minden egységhez 50 ml-t adnak.

A kontrollegységhez 95 ml ülepített szennyvizet és 5 ml vizet adnak, míg a vizsgálati egységhez 95 ml ülepített szennyvíz mellé 5 ml-t adnak hozzá a vizsgált anyag megfelelő törzsoldatából (400 mg/liter). Ismét megkezdik a levegőztetést, és újabb 23 órán keresztül folytatják. Ezután az iszapot 45 percen át ülepítik, majd a felülúszót leszívják, és meghatározzák az oldottszervesszén-tartalmat.

A fenti feltöltés-leszívás eljárást naponta kell ismételni az egész vizsgálat folyamán.

▼B

Az ülepítés előtt szükség lehet az egység falának megtisztítására, hogy a szilárd részecskék ne gyűljenek össze a folyadék szintje fölött. A (keresztbe) szennyeződés megakadályozása érdekében minden egységnél külön kefét vagy kaparót kell használni.

Ideális esetben az oldott szerves szén mennyiségét a felülúszó folyadékban naponta határozzák meg, ám ennél kevésbé gyakori meghatározás is megengedhető. Elemzés előtt a folyadékot mosott, 0,45 μm-es membránszűrőn átszűrik, és centrifugálják. A membránszűrők akkor megfelelők, ha biztosítható, hogy nem bocsátanak ki szenet, és nem nyelnek el semmit a vizsgált anyagból a szűrés során. A minta hőmérséklete a centrifugában nem haladhatja meg a 40 °C-ot.

A biológiai úton csekély mértékben vagy egyáltalán nem bomló anyagok esetében a vizsgálat ideje meghatározhatatlan, de a tapasztalatok szerint legalább 12 és legfeljebb 26 hétnek kell lennie.

2. ADATOK ES ÉRTÉKELÉS

A vizsgálati egységekben, illetve a kontrollegységekben található felülúszó folyadék oldottszervesszén-mennyiségének értékét ábrázolják az idő függvényében.

A biológiai bomlás folyamatának előrehaladásával a vizsgálati anyagban található szint közelíti a kontrollszintet. Amikor a két szint közötti különbség három egymást követő mérés során állandónak bizonyul, olyan számú további mérést végeznek, amely elegendő a kapott adatok statisztikai feldolgozásához, és kiszámítják a vizsgált anyag százalékos biológiai lebonthatóságát (D_{da} vagy D_{ssd}, lásd az 1.2. pont).

3. JELENTÉS

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

— minden információ a használt szennyvíz típusáról, a felhasznált egységről, a vizsgált anyagra vonatkozó vizsgálati eredményekről, a referenciaanyagról – ha volt –, valamint a vakpróbáról,

— hőmérséklet,

— biológiai bomlási görbe, a kiszámítás módjának leírásával (lásd az 1.2. pontot),

— dátum és helyszín, ahonnan a vizsgálati organizmusok mintáját vettük, adaptációs állapotuk, koncentráció stb.,

— a vizsgálati eljárás lépéseiben történt bármely változtatás tudományos okai,

— aláírás és dátum.

▼B

3.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Miután az ezzel a módszerrel vizsgálandó anyag biológiailag nem könnyen lebontható, a DOC kizárólag biológiai lebonthatóság révén való eltűnése rendes esetben fokozatosan, napok vagy hetek alatt játszódik le, kivéve azon eseteket, amikor a hirtelen akklimatizálódást néhány hét után az anyag átmenet nélküli eltűnése jelzi.

Bizonyos esetekben azonban a fizikokémiai felszívódás fontos szerepet játszhat; ezt az jelzi, ha rögtön az elején teljesen vagy részben eltűnik a hozzáadott DOC. Hogy ezt követően mi történik, az olyan tényezőkön múlik, mint az adszorpció mértéke vagy a szuszpendált szilárd részecskék koncentrációja a kiöntött kifolyó szennyvízben. A kontroll-, illetve a vizsgált anyagot is tartalmazó felülúszó DOC-koncentrációi közötti különbség rendszerint lassan emelkedik az eredeti alacsony értékről, és ez a különbség aztán meg is marad ezen az új értéken a vizsgálat további szakaszaiban, hacsak nem következik be akklimatizáció.

További vizsgálatokra van szükség, ha az adszorpciót és a tényleges (vagy részleges) biológiai bomlást el akarják különíteni. Ezt számos módon el lehet végezni, de a legmeggyőzőbb az, ha a felülúszót vagy az iszapot használják fel inokulumként egy alapbeállító vizsgálathoz (lehetőleg egy légzésmérő vizsgálathoz).

Az olyan típusú vizsgált anyagok, amelyek DOC-értékei ezen vizsgálatban gyorsan és nem felszívódás útján csökkennek, potenciálisan biológiailag lebonthatónak tekinthetők. A részleges és nem felszívódás útján történő csökkenés azt jelzi, hogy a vegyület legalább részben bomlik biológiailag.

Ha a DOC-érték nem vagy csak alig csökken, annak oka lehet az is, hogy a vizsgált anyag gátolja a mikroorganizmusokat, amit az is jelezhet, hogy az iszap szétesik és elvész, zavaros felülúszót eredményezve. Ilyenkor a vizsgálatot a vizsgált anyag alacsonyabb koncentrációjával kell megismételni.

A specifikus analitikai módszerek vagy a ^{14}C izotóppal jelölt vizsgált anyag használata nagyobb érzékenységet tesz lehetővé. Ha ^{14}C izotóppal jelölt vegyületet alkalmaznak, a biológiai bomlás tényét a $^{14}CO_2$ visszanyerési aránya fogja megerősíteni.

Ha az eredményeket elsődleges bomlás formájában is megadják, lehetőség szerint magyarázatot kell fűzni a kémiai szerkezet olyan jellegű változásához, amely a kiindulási vegyület reakciójának elmaradását okozza.

A vak vizsgálati közeg reakciója mellett az analitikai módszer hitelesítését is meg kell adni.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

(1) OECD, Párizs, 1981, 302. A. vizsgálati irányelv, a Tanács határozata, C(81) 30 végleges.

▼B

1. függelék

SCAS vizsgálat: az eredmény példái

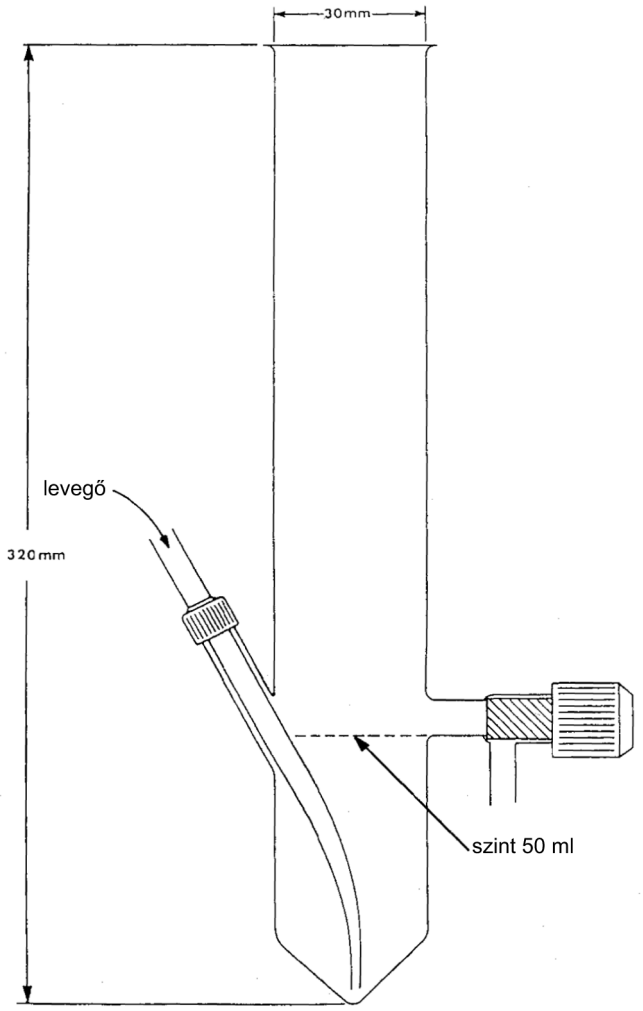
Anyag	C_t (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Százalékos bomlás D_{da}	Vizsgálat időtartama (nap)
4-acetil-aminobenzén-szulfonát	17,2	2,0	85	40
Tetra- propilén-benzol-szulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilén-glikol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentán-tetra-karboxilát	7,9	3,2	81,1	120

▼B

2. Függelék

A vizsgálati berendezés példája

1. ábra



▼B

C.13. **BIOKONCENTRÁCIÓ VIZSGÁLATA: ÁTFOLYÁSOS HAL VIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

Ez a biokoncentrációs módszer megfelel az OECD TG 305-nek (1996).

1.1. BEVEZETÉS

Ez a módszer a különböző anyagoknak a halakban található, átfolyásos körülmények közötti biokoncentrációs potenciáljának jellemzésére szolgáló eljárást ír le. Bár az átfolyásos vizsgálatot előnyben kell részesíteni, félstatikus rendszerek is megengedhetők, feltéve hogy az érvényességi követelményeknek megfelel.

A módszer elegendő részlettel szolgál a vizsgálat kivitelezéséhez, miközben kellő szabadságot enged a kísérlet kialakításának adaptálására az egyes laboratóriumok körülményeihez és a vizsgálati anyagok változó jellemzőihez. A módszer leghatékonyabban 1,5–6,0 log P_{ow}-értékkel rendelkező stabil szerves vegyi anyagokra alkalmazható (1), de még alkalmazható erőteljesen lipofil anyagokra (log P_{ow} > 6,0). Az előre becsülhető biokoncentrációs tényező (BCF), amit néha K_B-ként is jelölnek, az ilyen erősen lipofil anyagokra feltehetően nagyobb lesz, mint a laboratóriumi kísérletekből várt állandósult biokoncentrációs tényező (BCF_{ss}) értéke. A kb. 9,0-ig terjedő log P_{ow}-értékkel rendelkező szerves vegyi anyagok előre becsült biokoncentrációs tényezője Bintein és mtsai egyenletével kapható meg (2). A biokoncentrációs potenciált jellemző paraméterekhez tartozik a felvételi sebességi állandó (k_1), a tisztulási sebességi állandó (k_2) és a BCF_{ss}.

A radioaktívan jelzett vizsgálati anyagok megkönnyíthetik a víz- és halminták analízisét, és felhasználhatók annak eldöntésére, hogy kelle bomlástermék-azonosítást és -kvantifikálást végezni. Amennyiben valamennyi radioaktív maradékot megmérték (például égetéssel vagy szövetfeloldással), a BCF a kiindulási vegyületen, bármely visszatartott metaboliton és az asszimilált szénen is alapul. Valamennyi radioaktív maradékon alapuló BCF-eket ezért nem lehet közvetlenül összehasonlítani csak a kiindulási vegyület sajátos kémiai analíziséből nyert BCF-fel.

Radioaktív jelzési vizsgálatoknál kiürülési fázis alkalmazható a kiindulási vegyületre alapozott BCF meghatározása céljából, és a fő metabolitok jellemezhetők, amennyiben szükségesnek minősül. Az anyagmetabolizmus-vizsgálatot a biokoncentráció-vizsgálattal kombinálni is lehet a szövetekben levő maradékok analízise és azonosítása révén.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

A biokoncentráció/bioakkumuláció a vizsgált anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/en (meghatározott szöveteiben/n) a vizsgált anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva.

A biokoncentrációs tényező (BCF, vagy K_B) a vizsgált anyag halban/on, vagy meghatározott szöveteiben/n (C_f, µg/g [ppm]) lévő koncentrációja az akkumulációs vizsgálat felvételi fázisának bármely időpontjában és a vegyszer környező közegben lévő koncentrációjának hányadosa a (C_w, µg/ml [ppm]).

▼B

Az állandósult biokoncentrációs tényező (BCF_{ss}, vagy K_B) nem változik jelentősen egy hosszabb időtartam során, amely alatt a vizsgált anyag koncentrációja állandó a környező közegben.

Plató, vagy állandósult állapot látható a halban mért vizsgált anyag (C_f) időfüggő ábráján, amennyiben a görbe párhuzamos az időtengellyel, és C_f három egymást követő, legalább két nap különbséggel vett mintában ± 20 %-on belül vannak az analízisek egymáshoz képest, és nincs számottevő különbség a három mintavételi periódus között. Összevont minták analízisénél legalább négy egymást követő analízis szükséges. Olyan vizsgált anyagoknál, amelyek felvétele lassú, sokkal megfelelőbbek a hétnapos időközök.

A biokoncentrációs tényezőket, amelyeket kinetikus koncentrációs tényezőnek (BCF_K) neveznek, közvetlenül a kinetikai sebességállandókból (k_1/k_2) számolják.

Az oktanol-víz megoszlási együttható (P_{ow}) a vegyi anyag n-oktanolban és vízben, egyensúlyban mért oldhatóságának aránya (A.8. módszer), K_{ow}-vel is jelölik. A vegyi anyag vízi szervezetekbeli biokoncentrációs potenciálja jelzésére a P_{ow} logaritmusát használják.

Az expozíciós vagy felvételi fázis az az időtartam, amíg a hal érintkezik a vizsgált anyaggal.

A felvételi sebességi állandó (k_1) a vizsgált anyag koncentrációjának – halban/on (vagy meghatározott szöveteiben/n) való – növekedési sebességét definiáló numerikus érték, az expozíciós idő alatt (k_1 l/-nap^{-1}-ben van kifejezve).

Az expozíció utáni, vagy tisztulási (ürülési) fázis a kísérleti halból (vagy meghatározott szövetéből) a vizsgált anyagot tartalmazó közegből az anyagot nem tartalmazó közegbe történő kiürülésének (vagy nettó ürülése) időtartama.

A tisztulási (ürülési) sebességi állandó (k_2) a vizsgált anyag koncentrációjának a halban (vagy meghatározott szöveteiben) való csökkenési sebességét definiáló numerikus érték, a kísérleti halnak a kísérleti anyagot tartalmazó közegből az anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően (k_2 1/nap-ban van kifejezve).

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálat két fázisból áll: az expozíciós (felvételi) és az expozíció utáni (tisztulási) fázisból. A felvételi fázis alatt az egy fajhoz tartozó halak különálló csoportjai a vizsgált anyag legalább két koncentrációjával érintkeznek. Ezután átkerülnek a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe tisztulási fázisra. A tisztulási fázis mindig szükséges, kivéve, ha az anyag felvétele a felvételi fázis alatt elhanyagolható volt (pl. a BCF kisebb 10-nél). A vizsgált anyag koncentrációját a halban/on (vagy meghatározott szövetében/n) a vizsgálat mindkét fázisa alatt figyelemmel kísérik. A két kísérleti koncentráción túlmenően, a halak egy kontrollcsoportját azonos körülmények között tartják – leszámítva a vizsgált anyag hiányát – annak érdekében, hogy a biokoncentráció által okozott ártalmas hatások a megfelelő kontrollcsoporthoz legyenek viszonyíthatók, és meghatározható legyen a vizsgált anyag háttér-koncentrációja.

▼B

A felvételi fázis 28 napig tart, kivéve, ha az egyensúly bizonyítottan már korábban beáll. A 3. függelék egyenletével lehet következtetni a felvételi fázis hosszára és az állandósult állapot eléréséhez szükséges időre. A tisztulási periódus ezután a hal egy másik tiszta, ugyanolyan közeget, de vizsgált anyagot nem tartalmazó edénybe való áthelyezésével kezdődik. Amennyiben lehetséges, a biokoncentrációs tényezőt lehetőleg az állandósult állapotban a halban (C_f) és vízben mért (C_w) koncentráció arányaként (BCF_{ss}) is, továbbá a felvételi (k_1) és tisztulási (k_2) sebességi állandó arányával, elsőrendű kinetikát feltételezve, kinetikai biokoncentrációs tényezőként (BCF_K) kell kiszámítani. Amennyiben nyilvánvalóan nem elsőrendű a kinetika, összetettebb modelleket kell alkalmazni (5. függelék).

Amennyiben 28 nap alatt nem áll be az állandósult állapot, a felvételi fázist meg kell hosszabbítani az állandósult állapot eléréséig, vagy 60 napra, amelyik előbb következik be; ezután kezdődik a tisztulási fázis.

A felvételi sebességi állandót, a tisztulási (ürülési) sebességi állandót (vagy állandókat, amennyiben összetettebb modellt alkalmaztak), a biokoncentrációs tényezőt, és amennyiben lehetséges, e paraméterek mindegyike esetében a konfidenciahatárokat, a halban és a vízben mért vizsgálatianyag-koncentrációt legjobban leíró modell szerint számítják ki.

A BCF a hal teljes nedves tömegének függvényeként van kifejezve. Különleges célokra azonban meghatározott szövetek és szervek (pl. izom, máj) is használhatók, amennyiben a hal elég nagy, illetve ha a hal ehető (filé) és nem ehető (zsiger) részekre osztható. Mivel számos szerves anyagnál egyértelmű kapcsolat van a biokoncentrációs potenciál és a lipofilitás között, ezért ugyanilyen kapcsolat van a kísérleti hal lipidtartalma és az ilyen anyagok megfigyelt biokoncentrációja között is. Ezért a nagy lipofilitású (azaz log P_{ow} > 3) anyagokra kapott vizsgálati eredmények változatosságának e forrása csökkentéséhez a biokoncentrációt a teljes testtömegen kívül a lipidtartalom vonatkozásában is ki kell fejezni.

Amennyiben megvalósítható, a lipidtartalmat ugyanazon a biológiai anyagon kell meghatározni, mint amit a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására használtak.

1.4. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

A biokoncentrációs vizsgálat elvégzése előtt a vizsgált anyagról az alábbi adatokra van szükség:

— oldhatóság vízben,

— oktanol-víz megoszlási együttható P_{ow} (K_{ow}-vel is jelölik, az A.8-ban megadott HPLC módszerrel meghatározva),

— hidrolízis,

— fototranszformáció vízben nap- vagy szimulált napsugárzásnál és a biokoncentrációs vizsgálatnál alkalmazott sugárzási feltételek mellett,

▼B

— felületi feszültség (azaz olyan anyagoknál, ahol P_{ow}-t nem lehet meghatározni),

— gőznyomás,

— gyors biológiai lebonthatóság (adott esetben).

További megkövetelt információ a vizsgálat során használt halfajokra kifejtett toxicitás, lehetőleg az aszimptotikus (azaz az időtől független) LC_{50}. Legyen ismert pontosságú és érzékenységű analitikai módszer a vizsgált anyag kvantifikálására a vizsgált oldatokban és a biológiai anyagban, a mintakészítés és tárolás részleteivel együtt. A vizsgált anyag vízben és halszövetekben érvényes analitikai kimutatási határának is ismertnek kell lenni. Amennyiben ^{14}C-vel jelzett vizsgált anyagot használnak, ismerni kell a szennyező anyagokhoz tartozó százalékos radioaktivitást.

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

Az alábbi feltételeknek kell teljesülniük a vizsgálat érvényességéhez:

— a hőmérséklet-ingadozás kisebb ± 2 °C-nál,

— az oldott oxigén koncentrációja nem eshet 60 %-os telítettség alá,

— a kamrákban a vizsgált anyag koncentrációját a felvételi fázisban mért értékek átlagának ± 20 %-án belül kell tartani,

— a vizsgálat végén a kontroll és a kezelt halak mortalitásának és egyéb káros hatásoknak/betegségeknek 10 %-nál kisebbnek kell lenni; amennyiben a vizsgálat több hétig vagy hónapig tart, a pusztulásnak, vagy más ártalmas hatásnak a halak mindkét csoportjában kisebbnek kell lenni havi 5 %-nál, és nem haladhatja meg a 30 %-ot összesen.

1.6. REFERENCIAVEGYÜLETEK

Az ismert biokoncentrációs potenciálú referenciavegyületek használata hasznos lehet a kísérleti eljárások ellenőrzése során, amennyiben elvárt. Bár meghatározott anyagok még nem ajánlhatók.

1.7. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. *Eszközök*

A vizsgálat során kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, szorbeálódhatnak vagy kimosódhatnak az eszközökből, és ártalmasak lehetnek a halakra. Szabványos, kémiailag inert anyagból készült, a töltési sebességnek megfelelő térfogatú négyszögletes vagy hengeres tartályok használhatók. A puha műanyag csövek használatát minimalizálni kell. Teflon®, rozsdamentes acél és/vagy üvegcsövek használata ajánlott. A tapasztalatok alapján szükséges lehet a nagy abszorpciós együtthatójú anyagok, mint szintetikus piretroidok esetében, szilanizált üveg használata. Ilyen esetekben a felszerelést használat után el kell dobni.

▼B

1.7.2. *Víz*

A kísérletekhez általában természetes vizet kell használni, amely nem szennyezett, és állandó minőségű. A hígításra használt víz minőségének lehetővé kell tennie a választott halfajok túlélését az akklimatizációs és a kísérleti időszakok alatt anélkül, hogy bármilyen rendellenes külső megjelenés vagy viselkedés jelentkezne. Ideális esetben a vizsgált fajok bizonyítottan képesek túlélni, fejlődni és szaporodni a hígítóvízben (pl. laboratóriumi tenyészetben, vagy életciklusra vonatkozó toxicitásvizsgálatnál). A vizet legalább a pH-val, keménységgel, valamennyi szilárd anyaggal, összes szerves szénnel, és lehetőleg ammónium-, nitrittartalommal és alkalitással, és tengeri fajoknál sótartalommal is jellemezni kell. A halak optimális jólétéhez fontos paraméterek teljesen ismertek, de az 1. függelék megadja számos paraméter esetében az ajánlott maximális koncentrációt a vizsgált édes- és tengervízre.

A kísérleti időszak alatt a víznek állandó minőségűnek kell lenni. A pH-értékének 6,0 és 8,5 között kell lenni, de egy adott vizsgálat során ± 0,5 pH egységnyi tartományon belül kell maradnia. Analízis céljából időközönként mintákat kell venni, annak érdekében, hogy a hígítóvíz ne befolyásolhassa hátrányosan a vizsgálati eredményeket (például a vizsgált anyag komplexálásával), vagy ne legyen káros hatással a halállomány állapotára. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), főbb anionok és kationok (pl. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), peszticidek (pl. összes szerves foszforvegyület és összes szerves klórpeszticidek), összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag meghatározását el kell végezni, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvíz ismerten viszonylag állandó minőségű. Amennyiben legalább egy éven keresztül állandónak bizonyul a vízminőség, a vizsgálatot ritkábban és nagyobb időközönként is el lehet végezni (pl. minden hat hónapban).

A hígítóvíz természetes részecske- és a teljes szervesszén-tartalmának (TOC) is a lehető legalacsonyabbnak kell lenni, hogy a vizsgált anyag ne abszorbeálódjon szerves anyagon, ami csökkenthetné a biológia elérhetőségét (4). A maximális elfogadható érték 5 mg/l szemcsés anyagok esetében (szárazanyag 0,45 μm-es szűrőn nem jut át) és 2 mg/l az összes szerves szén esetében (lásd 1. függelék). A vizet szűrni kell felhasználás előtt, amennyiben szükséges. A kísérleti halaktól (ürülék) és a táplálékmaradékból származó szerves széntartalom járulékának a lehető legkisebbnek kell lenni a vízben. A vizsgálat során a kísérleti edényben a szerves szén koncentrációja nem haladhatja meg a vizsgált anyagból származó szerves szén koncentrációját, és, amennyiben alkalmazták, az oldószer koncentrációját 10 mg/l-nél nagyobb mértékben (± 20 %).

1.7.3. *Vizsgált oldat*

A vizsgált anyagból megfelelő koncentrációjú törzsoldat készül. A törzsoldatot célszerű a vizsgált anyagnak egyszerűen a hígítóvízbe keverésével vagy összerázással elkészíteni. Az oldószerek vagy diszpergálószerek (oldódást segítő szerek) használata nem ajánlott; néhány esetben azonban alkalmazhatók megfelelő töménységű törzsoldat készítése érdekében. A felhasználható oldószerek: etanol, metanol, etilén-glikol-metil-éter, etilénglikol-dimetil-éter, dimetilformamid és trietilén-glikol. A felhasználható diszpergálószerek: Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulóz 0,01 % és HCO-40. Gondosan kell eljárni a biológiailag könnyen lebontható szerek használata esetén, mivel átfolyásos vizsgálatokban baktériumnövekedés révén problémát okozhatnak. A vizsgált anyag radioaktívan is jelölhető, és a legnagyobb tisztaságúnak kell lenni (pl. lehetőleg > 98 %).

▼B

Átfolyásos vizsgálatokban a vizsgált anyag törzsoldatát folyamatosan adagoló és hígító rendszerre (pl. állandó áramlási sebességet biztosító pumpa, szabályozható hígító rendszer, telítőrendszer) van szükség a kísérleti koncentrációk kísérleti kamrákba juttatásához. Az egyes tartályok esetében a napi öt térfogatcsere a megengedhető. Az átfolyásos mód részesül előnyben, amennyiben nem alkalmazható (pl. ha a vizsgált szervezetekre károsan hat), félstatikus módszer használható, feltéve hogy az érvényességi követelmények teljesülnek. A törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét legalább naponta a vizsgálat előtt és után 48 órával ellenőrizni kell. Az ellenőrzés magában foglalja az áramlási sebesség meghatározását az egyes kísérleti tartályokban, és biztosítja, hogy ne változzon 20 %-nál nagyobb mértékben sem az egyes kamrákban, sem azok között.

1.7.4. *A fajok megválasztása*

A fajok megválasztásánál fontos követelmény, hogy könnyen és megfelelő méretben elérhetők, és a laboratóriumban kielégítő körülmények között tarthatók legyenek. A halfajok megválasztásának egyéb követelményei közé tartozik a fontosság rekreációs, kereskedelmi, ökológiai szempontból éppúgy, mint az összehasonlítható érzékenység, múltbeli sikeres használat stb.

Az ajánlott fajok a 2. függelékben találhatók. Más fajok is használhatók, de a kísérleti eljárást esetleg át kell dolgozni a megfelelő vizsgálati körülmények biztosításához. A fajok és a kísérleti módszer megválasztásának indoklását fel kell tüntetni a jelentésben.

1.7.5. *A halak tartása*

Legalább két hétig a vizsgálat során alkalmazott hőmérsékletű vízben akklimatizálják a törzspopulációt, és kielégítő, a vizsgálat alatt használttal megegyező típusú étrenden tartják őket.

48 órás betelepítési időszak után a mortalitást jegyzőkönyvezni kell, és az alábbi követelményeket kell alkalmazni:

— amennyiben a mortalitás a populáció 10 %-ánál nagyobb hét nap alatt: az egész halállományt ki kell cserélni,

— mortalitás a populáció 5–10 %-a hét nap alatt: további hét napig kell akklimatizálni,

— mortalitás a populáció 5 %-ánál kisebb hét nap alatt: a tételt kell elfogadni – ha a második hét nap alatt a mortalitás 5 %-nál több, az egész tételt ki kell selejtezni.

Beteg és rendellenesen fejlődött halak nem használhatók a vizsgálathoz. Minden beteg haltól meg kell szabadulni. A kísérletet megelőző két hétben és a kísérlet alatt a halak nem kaphatnak kezelést betegségre.

▼B

1.8. A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

1.8.1. *Elővizsgálat*

Hasznos lehet elővizsgálatokat végezni a vizsgálati körülmények optimalizására a döntő vizsgálathoz, pl. a vizsgált anyag koncentrációjának, a felvételi és tisztulási fázisok megválasztására.

1.8.2. *Az expozíció körülményei*

1.8.2.1. A felvételi fázis időtartama

A felvételi fázis időtartamának előrejelzése előzetes tapasztalatból (pl. előző vizsgálatból vagy akkumulációhoz kapcsolódó vegyi anyagból), vagy bizonyos, a vizsgált anyag vízben való oldhatósága, vagy oktanol/víz megoszlási együtthatója ismeretét felhasználó tapasztalati kapcsolatokból nyerhető (lásd 3. függelék).

A felvételi fázis 28 napig tart, kivéve ha igazolható, hogy az egyensúly korábban beállt. Amennyiben az állandósult állapot nem áll be 28 nap alatt, a felvételi fázist ki kell terjeszteni további méréseket végezve, amíg az állandósult állapot beáll, vagy legfeljebb 60 napig.

1.8.2.2. A tisztulási fázis időtartama

A felvételi fázis időtartamának a fele rendszerint elég az anyag megfelelő (pl. 95 %-os) csökkenéséhez (lásd 3. függeléket a becslés magyarázatához). Amennyiben a 95 %-os csökkenéshez szükséges idő aránytalanul hosszú, meghaladja például a felvételi fázis hosszának kétszeresét (azaz több mint 56 nap), rövidebb időtartam is használható (azaz amíg a vizsgált anyag koncentrációja kisebb lesz az állandósult állapotú koncentráció 10 %-ánál). Az elsőrendű kinetikát eredményező egyrekeszeshal-modellnél összetettebb felvételi és tisztulási fázissal rendelkező anyagoknál azonban az ürülési sebességi állandó meghatározására azonban hosszabb tisztulási fázis is megengedett. Az időtartamot azonban az a periódus szabhatja meg, ami után a halban a vizsgált anyag koncentrációja az analitikai detektálási határ fölött marad.

1.8.2.3. A kísérleti halak száma

A halak számát koncentrációnként úgy választják ki, hogy mintánként legalább négy hal álljon rendelkezésre minden mintavételnél. Amennyiben komolyabb statisztikai számításokat akarunk végezni, mintánként több hal szükséges.

Amennyiben kifejlett halakat használnak, rögzíteni kell, hogy hímeket és nőstényeket milyen arányban használnak a kísérletben. Amennyiben mindkét nemet használják, dokumentálni kell, hogy az expozíció kezdete előtt a két nem között a lipidtartalom különbsége jelentéktelen; szükséges lehet az összes hím és az összes nőstény hal egybegyűjtése.

▼B

Mindegyik vizsgálatban hasonló tömegű halakat kell kiválasztani, a legkisebbek ne legyenek kisebbek a legnagyobb hal tömegének kétharmadánál. Ugyanabba a korcsoportba tartozzanak, és a származásuk is azonos legyen. Mivel a halak tömege és kora időnként jelentős hatással lehet a BCF értékekre (1), ezeket a részleteket pontosan rögzíteni kell. Ajánlott az átlagtömeg becslése érdekében a vizsgálat előtt a halpopuláció egy mintacsoportját lemérni.

1.8.2.4. Feltöltés

A halak méretéhez viszonyítva nagy mennyiségű vizsgálati oldatot kell használni annak érdekében, hogy minimalizálni lehessen a vizsgálat kezdetén a halak hozzáadásával okozott C_w és az oldott oxigén koncentrációjának csökkenését. Fontos, hogy a feltöltési sebesség a használt kísérleti fajnak megfelelő legyen. Minden esetben 0,1–1,0 g hal (nedves tömeg) per liter víz per nap az ajánlott feltöltési sebesség. Akkor használható nagy töltési sebesség, amennyiben igazolt, hogy a vizsgált anyag megkövetelt koncentrációja fenntartható ± 20 %-os határon belül, és hogy az oldott oxigén koncentrációja nem esik 60 %-os telítettség alá.

A megfelelő feltöltési rendszerek kiválasztásánál a halfajok természetes életterét kell figyelembe venni. A fenéken élő halak például nagyobb alapterületű akváriumot igényelnek, mint a nyíltvízi halfajok.

1.8.2.5. Táplálás

Az akklimatizációs és kísérleti időszak alatt a halakat megfelelő, ismert lipid- és összfehérjetartalmú táplálékkal kell etetni, az egészségük megőrzéséhez és a testtömegük fenntartásához elegendő mennyiségben. A halak az akklimatizációs és kísérleti időszakban naponta kapnak enni, testtömegük körülbelül 1–2 %-ának megfelelő mennyiségben; ez a legtöbb halfaj esetén a lipidkoncentrációt viszonylag állandó szinten tartja a vizsgálat alatt. A táplálék mennyiségét újra kell számolni, például hetente egyszer, hogy egy állandó szinten legyen tartható a testtömeg és a lipidkoncentráció. Ennek kiszámításához az egyes tartályokban a halak tömege a tartályból legújabban vett halminta tömegéből becsülhető meg. A tartályban maradó halak nem mérhetők le.

A kísérleti tartályból a maradék eledelt és az ürüléket az etetést követően (30 perctől 1óráig) naponta szívócsövön keresztül el kell távolítani. A vizsgálat alatt a tartályokat a lehető legtisztábban kell tartani, hogy a szervesanyag-koncentráció a lehető legkisebb legyen, mivel a szerves szén jelenléte korlátozhatja a vizsgált anyag biológiai elérhetőségét (1).

Miután sok táplálék hallisztből származik, a táplálék vizsgálatianyag-tartalmát is vizsgálni kell. A táplálék peszticid- és nehézfémanalízise is kívánatos.

▼B

1.8.2.6. Fény és hőmérséklet

A fényperiódus rendszerint 12–16 órás, és a fajok számára megfelelő hőmérsékletet (± 2 °C) kell biztosítani (lásd 2. függelék). A megvilágítás típusának és jellemzőinek ismertnek kell lenni. Figyelmet kell fordítani a vizsgálati anyag – a vizsgálat besugárzási körülményei közötti – lehetséges fotoátalakulására. Megfelelő megvilágítást kell használni, hogy a fény hatására nem természetes bomlástermékek lehetőleg ne keletkezzenek. Néhány esetben megfelelő lehet a 290 nm alatti UV sugárzást kiszűrő ernyő használata.

1.8.2.7. Kísérleti koncentrációk

Átfolyási körülmények között legalább két koncentrációt kell készíteni. Általában a nagyobb (vagy legmagasabb) vizsgáltanyag-koncentráció akut aszimptotikus LC_{50}-értékének körülbelül 1 %-ánál és a használt analitikai módszerre vonatkozó vízben elérhető detektálási határnál legalább tízszer nagyobb legyen.

A legnagyobb kísérleti koncentráció az akut (96 órás)/krónikus LC_{50} aránnyal is megosztható legyen (néhány vegyi anyag esetében a megfelelő arány 3–100 lehet). Amennyiben lehetséges, a többi koncentráció(ka)t úgy kell megválasztani, hogy a fenti értéktől 10-es faktorral különbözzön. Amennyiben ez nem lehetséges az 1 %-os LC_{50} követelmény és az analitikai határ miatt, 10-nél kisebb faktor is használható, vagy fontolóra kell venni ^{14}C-vel jelzett vizsgált anyag használatát. A vizsgált anyag oldhatósága feletti koncentrációt nem szabad használni.

Amennyiben szolubilizáló anyagot használnak, annak koncentrációja nem lehet nagyobb 0,1 ml/l-nél, és minden kísérleti tartályban azonosnak kell lennie. Ismerni kell, hogy mennyivel járul hozzá a kísérleti víz teljes szervesszén-tartalmához. Mindent meg kell tenni azonban az ilyen anyagok használatának elkerülése érdekében.

1.8.2.8. Kontrollok

A vizsgált sorozat mellett a hígítóvíz-kontrollt, és adott esetben, egy szolubilizálószert tartalmazó kontrollt is be kell állítani, feltéve hogy biztosított, hogy a szernek nincs hatása a halakra. Amennyiben ez nem áll fenn, mindkét kontrollt el kell végezni.

1.8.3. *A vízminőség mérésének gyakorisága*

A vizsgálat során minden edényben mérni kell az oldott oxigént, TOC-t, pH-t és hőmérsékletet. A kontrollokban és a nagyobb (vagy legnagyobb) koncentrációjú edényben mérni kell a teljes keménységet és (adott esetben) a sótartalmat. Az oldott oxigént és (adott esetben) a sótartalmat legalább háromszor kell mérni a felvételi periódusban – annak elején, közepén és a végén – és egyszer egy héten a tisztulási periódusban. TOC-t a vizsgálat kezdetén (a felvételi fázis előtt 24 és 48 órával) a halak bevitele előtt, és a felvételi és tisztulási fázis alatt pedig legalább hetente egyszer kell mérni. A hőmérsékletet naponta, pH-t a periódusok kezdetén és végén, keménységet vizsgálatonként egyszer kell mérni. A hőmérsékletet ajánlott folyamatosan mérni, legalább egy edényben.

▼B

1.8.4. *Hal- és vízmintavételezés és -analízis*

1.8.4.1. Mintavételezési ütemterv

A kísérleti tartályokból a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározásához a halak bevitele előtt, valamint a felvételi és a tisztulási fázis alatt kell mintát venni. Vízmintát legalább a halmintával egy időben és etetés előtt kell venni. A felvételi fázis alatt meg kell határozni a vizsgált anyag koncentrációját az érvényességi követelmények teljesülésének ellenőrzése céljából.

A felvételi fázis alatt legalább ötször, a tisztulási fázis alatt legalább négyszer kell halmintát venni. Mivel egyes esetekben e mintaszámok alapján nehéz pontosan megbecsülni a BCF értékét, különösen, ha egyszerű elsőrendűtől eltérő tisztulási kinetika mutatkozik, tanácsos mindkét periódusban gyakrabban mintát venni (lásd 4. függelék). A külön minták tárolására és elemzésére csak akkor kerül sor, ha az elemzés első sorozata alkalmatlannak bizonyul a BCF kívánt pontosságú kiszámítására.

Az elfogadható mintavételi ütemterv egy példája a 4. függelékben található. Más feltételezett P_{ow}-értékkel más ütemtervet is gyorsan ki lehet dolgozni a 95 %-os felvétel expozíciós idejének kiszámolásával.

A mintavételezést a felvételi fázisban addig kell folytatni, amíg az állandósult állapot beáll, vagy legfeljebb 28 napig. Amennyiben az állandósult állapot nem áll be 28 nap alatt, a mintavételezést addig kell folytatni, amíg beáll az állandósult állapot, de legfeljebb 60 napig. A tisztulási fázis megkezdése előtt a halak átkerülnek a tiszta tartályokba.

1.8.4.2. Mintavételezés és mintakészítés

Az analízishez a vízmintákat, például inert csövön keresztül, a kísérleti tartály középső pontjából veszik. Mivel a vizsgált anyag biológiailag nem elérhető részét a biológiailag elérhetőtől nem mindig lehet centrifugálással vagy szűréssel elválasztani, (főleg erősen lipofil vegyszerek esetén, azaz log P_{ow} > 5 vegyszereknél) (1) (5), a mintákon nem lehet ezen eljárásokat alkalmazni.

Ehelyett a tartályokat minél tisztábban kell tartani, és a teljes szervesszén-tartalmat a felvételi és tisztulási fázis alatt is figyelemmel kell kísérni.

Minden mintavételezéskor megfelelő számú halat (általában legalább négyet) kell kivenni a kísérleti kamrákból. A mintahalakat gyorsan le kell öblíteni vízzel, „szárazra” törölni, azonnal megölni a legmegfelelőbb és humánus módszerrel, ezt követően lemérni.

A lebomlás vagy egyéb veszteségek elkerülése érdekében a halakat és a vizet lehetőleg rögtön mintavételezés után kell analizálni, és a vizsgálat előrehaladtával megközelítőleg ki kell számolni a felvételi és a tisztulási sebességet. Az azonnali analízis lehetővé teszi annak kiküszöbölését is, hogy egy platót késve ismerjenek fel.

▼B

Az azonnali analízis meghiúsulása esetén a mintákat megfelelő módszerrel tárolják. A vizsgálat kezdete előtt a különböző vizsgált anyagok tárolásának megfelelő módszeréről információkat kell szerezni – például mélyhűtés, 4 °C-on tartás, tárolás időhossza, extrakció stb.

1.8.4.3. Az analitikai módszer minősége

Mivel az egész eljárást alapvetően a vizsgált anyaghoz használt analitikai módszer pontossága és érzékenysége határozza meg, kísérlettel ellenőrizni kell a kémiai analízis pontosságát és reprodukálhatóságát, és a vizsgált anyag vízből és halakból való visszanyerését. Azt is ellenőrizni kell, hogy a vizsgált anyag ne legyen észlelhető a használt hígítóvízben.

A C_w és C_f vizsgálatból kapott értékét korrigálni kell – szükség szerint – visszanyeréssel és a kontrollok háttérértékével. A hal- és vízmintákkal végig úgy kell bánni, hogy minimális legyen a szennyezés és a (pl. a mintavevő eszköz adszorpciójából eredő) veszteség.

1.8.4.4. Halminta analízise

Amennyiben a vizsgálat során radioaktívan jelzett anyagokat használtak, mérhető az össz-radioaktivitás (a kiindulási vegyületét és metabolitokét együttesen), vagy a minták megtisztíthatók úgy, hogy a kiindulási vegyület külön analizálható legyen. A fő metabolitokat állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén (amelyik előbb bekövetkezik) szintén lehet jellemezni. Amennyiben az összes mért radioaktivitás százalékában kifejezett BCF > 1 000 %, tanácsos lehet, sőt bizonyos vegyszer-kategóriáknál, pl. peszticideknél erősen ajánlott, az állandósult állapotban a halszövetekben a teljes maradék 10 %-át meghaladó mennyiségű bomlástermékek azonosítása és kvantifikálása. Amennyiben a meghatározást elvégezték a halszövetben, el kell végezni a vízben is.

A vizsgált anyag koncentrációját rendszerint meg kell határozni minden lemért halban. Amennyiben ez nem lehetséges, az egyes mintavételi alkalmakkor egyesíthetők a minták, de az összesítés korlátozza az adatokra alkalmazható statisztikai eljárások számát. Amennyiben a statisztikai eljárás megkívánja, akkor a kívánt egyesítési eljárást és az ehhez szükséges halak számát a vizsgálati módszerben rögzíteni kell (6) (7).

BCF-et a teljes nedves tömeg függvényeként, és az erősen lipofil anyagok esetében a lipidtartalom függvényeként is ki kell fejteni. A hal lipidtartalmát amennyiben lehetséges, minden mintavételi alkalommal meg kell határozni. A lipidtartalom meghatározására megfelelő módszereket kell alkalmazni (3. függelék, 8. és 2. hivatkozás). Szabványmódszerként a kloroform/metanol extrakciós technika ajánlott (9). A különböző módszerek nem adnak azonos értékeket (10), ezért fontos megadni a használt módszer részleteit. Amennyiben lehetséges, a lipid analízisét a vizsgált anyag analíziséhez készítettel azonos extraktumon kell elvégezni, mert a lipideket gyakran el kell távolítani az extraktumból, mielőtt kromatográfiásan elemezhetők lennének. A hal lipidtartalma (mg/kg nedves tömeg) a kísérlet végén nem térhet el a kezdeti értéktől ± 25 %-nál jobban. A szövet szárazanyag-tartalmát szintén rögzíteni kell, hogy a lipidkoncentráció átváltható legyen nedves állapotban mértről száraz állapotban mértre.

▼B

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgált anyag felvételi görbéje a felvételi fázisban a halban/on (vagy meghatározott szövetben/en) mért koncentrációt az idő függvényében, aritmetikus skálán ábrázolják. Amennyiben a görbe platót ér el, vagyis megközelítőleg párhuzamos az időtengellyel, az állandósult BCF_{ss} a következő képlet alapján számolható:

$$\frac{C_f \text{ állandósult állapotban (átlag)}}{C_w \text{ állandósult állapotban (átlag)}}$$

Amennyiben nem következett be az állandósult állapot, a BCF_{ss} kielégítő pontossággal kiszámolható az „állandósult állapot”-ból, az egyensúly 80 %-ánál ($1{,}6/k_2$) vagy 95 %-ánál ($3{,}0/k_2$).

A koncentrációs faktort (BCF_K) is meghatározzák a két elsőrendű kinetikai állandó k_1/k_2 arányaként. A tisztulási sebességi állandó (k_2) rendszerint a tisztulási görbéből határozható meg (azaz a halban a vizsgált anyag koncentrációjának csökkenése az idő függvényében). A felvételi sebességi állandó (k_1) ezután kiszámolható az adott k_2 és a C_f egy, a felvételi görbéből levezetett értékéből (lásd 5. függeléket is). A BCF_K és a k_1, k_2 sebességi állandók kiszámításának megfelelő módszere a számítógéppel végzett nem lineáris paraméterbecslő módszer használata (11). Grafikus módszerek is használhatók a k_1 és k_2 kiszámítására. Amennyiben a tisztulási görbe nyilvánvalóan nem elsőrendű, összetettebb modelleket kell használni (lásd a 3. függelék hivatkozásait), és biostatisztikus tanácsát kell kikérni.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Amennyiben a vizsgált oldatok koncentrációi az analitikai módszer detektálási határához közeli szinten vannak, az eredményeket óvatosan kell értelmezni.

Az egyértelműen definiált felvételi és tisztulási görbe megbízható biokoncentrációs adatokat jelez. A két kísérleti koncentrációnál a felvételi/tisztulási állandók ingadozásának 20 % alatt kell lenni. A két alkalmazott kísérleti koncentráció felvételi/tisztulási sebességének jelentős különbségét rögzíteni kell, és meg kell adni rá a lehetséges magyarázatokat. A jól megtervezett vizsgálatokból kapott BCF-ek konfidenciahatára általában megközelíti a ± 20 %-ot.

3. **JELENTÉS**

A kísérleti jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

3.1. VIZSGÁLT ANYAG

— fizikai tulajdonság, és adott esetben, fizikai-kémiai tulajdonságok,

— kémiai jellemzők (a szervesszén-tartalmat is beleértve, amennyiben szükséges),

— amennyiben radioaktívan jelzett, a jelzett atom(ok) pontos helyzete, és a szennyezőkhöz kapcsolódó radioaktivitás százaléka.

▼B

3.2. VIZSGÁLT FAJOK

— tudományos név, törzs, származás, bármilyen előkezelés, akklimatizálás, kor, mérettartomány stb.

3.3. VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

— használt vizsgálati eljárás (pl. átfolyásos vagy fél sztatikus),

— a használt megvilágítás típusa és jellemzői és időtartama,

— a vizsgálat kialakítása (pl. a kísérleti tartályok száma és mérete, víztérfogat-csere sebessége, párhuzamos minták száma, halak száma mintánként, kísérleti koncentrációk száma, a felvételi és a tisztulási fázis hossza, hal- és vízminták mintavételi gyakorisága),

— törzsoldatok előállításának módszere és a megújítás gyakorisága (amennyiben használták, meg kell adni a szolubilizálószert, koncentrációját, és hogy a kísérleti víz szervesszén-tartalmához mennyiben járult hozzá),

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a kísérleti edényben mért értékek átlaga és ezek standard deviációja, és a kiszámítás módszere,

— a hígítóvíz eredete, bármely előkezelés leírása, minden olyan eredmény, amely igazolja, hogy a hígítóvíz megfelel a kísérleti hal igényeinek, és a víz jellemzői: pH, keménység, hőmérséklet, oldott oxigén koncentrációja, maradékklór-szintek (amennyiben mérték), összes szerves szén, szuszpendált szilárd anyagok, a vizsgált közeg sótartalma (amennyiben lehetséges), és bármilyen egyéb elvégzett mérés,

— vízminőség a kísérleti edényekben, pH, keménység, TOC, hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció,

— a táplálásra vonatkozó részletes információk (például a táplálék fajtája, eredete, összetétele – legalább a lipid- és fehérjetartalom, amennyiben lehetséges, az etetések számát és az adott táplálék mennyisége),

— információk a hal- és vízminták kezeléséről, beleértve az előállítás részleteit, tárolást, extrakciót és analitikai eljárásokat (és pontosságot) a vizsgált anyag és lipidtartalom vonatkozásában (amennyiben mérték).

3.4. EREDMÉNYEK

— minden elvégzett előzetes vizsgálat eredménye,

— a kontrollhalak és az egyes expozíciós kamrákban lévő halak mortalitása, és bármely megfigyelt rendellenes viselkedés,

— a halak lipidkoncentrációja (amennyiben a kísérlet alkalmával meghatározták),

— a halakban a vizsgált vegyi anyag felvételét és tisztulását mutató görbék (minden mért adatot feltüntetve), az állandósult állapotig eltelt idő,

▼B

— C_f és C_w (standard deviációval és tartománnyal, adott esetben) minden mintavételi időpontra (C_f µg/g teljes nedves testtömeg, vagy meghatározott szövetei, pl. lipid tömegében [ppm] kifejezve, és C_w µg/ml-ben [ppm]). A kontrollsorozat C_w értékei (a hátteret is rögzíteni kell),

— az állandósult biokoncentrációs tényező (BCFss) és/vagy kinetikus koncentrációs tényező (BCFK) és, adott esetben, a felvételi és tisztulási (ürülési) sebességi állandók 95 %-os konfidenciahatárai (valamennyit az állat teljes tömegére vagy meghatározott szöveteire, és amennyiben mérték, a teljes lipidtartalomra vonatkoztatva kell megadni), valamennyi használt kísérleti koncentrációnál a konfidenciahatárok és standard deviációk (ahogy megfelelőbb) és a számítás/adatelemzés módszerei,

— amennyiben radioaktívan jelzett anyagokat használtak, és amennyiben szükséges, bármely kimutatott metabolit akkumulációja bemutatható,

— bármi szokatlan dolog a vizsgálattal kapcsolatban, bármilyen eltérés ezektől az eljárásoktól, és bármely más vonatkozó információ,

A „detektálási határon belül nem kimutatott” eredményeket előzetes vizsgálati módszer fejlesztésével és kísérlettervezéssel kell minimalizálni, mert az ilyen eredmények nem használhatók sebességi állandók számolásához.

4. **IRODALOMJEGYZÉK**

(1) Connell D. W. (1988). Bioaccumlation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp. 117–156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Non-linear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, pp. 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 Document for the Procedure to Determine Bioaccumlation 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 or Animal 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 Publishing Office, the Hague, Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al, (1995). Limn. & Oceanogr. 30, pp. 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 to 1985. Final Report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (reapproved 1988). Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Mollucsc.

▼B

1. függelék

Egy megfelelő hígítóvíz kémiai jellemzői

	Anyag	Határkoncentráció
1	Lebegő anyag	5 mg/l
2	Teljes szerves szén	2 mg/l
3	Nem ionizált ammónia	1 µg/l
4	Maradék klór	10 µg/l
5	Szerves foszfortartalmú peszticidek	50 ng/l
6	Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
7	Összes szerves klór	25 ng/l
8	Alumínium	1 µg/l
9	Arzén	1 µg/l
10	Króm	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Réz	1 µg/l
13	Vas	1 µg/l
14	Ólom	1 µg/l
15	Nikkel	1 µg/l
16	Cink	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Higany	100 ng/l
19	Ezüst	100 ng/l

▼B

2. függelék

Vizsgálathoz ajánlott halfajok

	Ajánlott fajok	Ajánlott kísérleti hőmérséklet-tartomány (°C)	Kísérleti állat ajánlott teljes hossza (cm)
1	*Danio rerio* ([1]) (*Teleostei, Cyprinidae*) (Hamilton–-Buchanan) Zebradánió	20–25	3,0 ± 0,5
2	*Pimephales promelas* (*Teleostei, Cyprinidae*) (Rafinisque)	20–25	5,0 ± 2,0
3	*Cyprinus carpio* (*Teleostei, Cyprinidae*) (Linnaeus) Közönséges ponty	20–25	5,0 ± 3,0
4	*Oryzias latipes* (*Teleostei, Poeciliidae*) (Temminck és Schlegel) Japán rizshal	20–25	4,0 + 1,0
5	*Poecilia reticulata* (*Teleostei. Poeciliidae*) (Peters) Guppi	20–25	3,0 ± 1,0
6	*Lepomis macrochirus* (*Teleostei. Centrarchidae*) (Rafinesque)	20–25	5,0 ± 2,0
7	*Oncorhynchus mykiss* (*Teleostei, Salmonidae*) (Walbaum) Szivárványos pisztráng	13–17	8,0 ± 4,0
8	*Gasterosteus aculeatus* (*Teleostei, Gasterosteidae*) (Linnaeus) Tüskés pikó	18–20	3,0 ± 1,0

([1]) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London. Series B., Vol. 252, p. 231

A különböző országokban különböző torkolati és tengeri fajokat használnak, például:

Spot	*Leiosromus xanthurus*
Sheephead minnow	*Cyprinodon variegatus*
Silverside	*Menidia beryllina*
Shiner perch	*Cymatogaster aggregata*
English sole	*Parophrys vetulus*
Staghorn sculpin	*Leptocottus annatus*
Tüskés pikó	*Gasterosteus aculeatus*
Sea bass	*Dicentracus labrax*
Küsz	*Albumus albumus*

A halak beszerzése

A táblázatban felsorolt édesvízi halak könnyen tenyészthetők, és/vagy könnyen beszerezhetők egész évben, míg a tengeri és torkolati fajok bizonyos országokra korlátozódnak. A fent felsorolt halfajok halastóban vagy laboratóriumban is (betegségek és paraziták szempontjából ellenőrzött körülmények között) tenyészthetők. Célszerű tenyészetekből származó kísérleti halakat alkalmazni, mivel ezek egészségi állapota és származása is ismert. Ezek a halak a világ sok részében beszerezhetők.

▼B

3. függelék

A felvételi és tisztulási fázis időtartamának meghatározása

1. *A felvételi fázis időtartamának meghatározása*

A vizsgálat elvégzése előtt a k_2, és így az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő néhány százalékos hibával megbecsülhető a k_2 és az n-oktanol/víz megoszlási együttható (P_{ow}) vagy a k_2 és a vízben való oldhatóság (s) tapasztalati összefüggéséből.

A k_2 becsült értéke (nap^{-1}) megkapható például az alábbi tapasztalati összefüggésből (1):

$$\log_{10} k_2 = 0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47 \quad (r^2 = 0{,}95) \qquad \text{(1. egyenlet)}$$

Egyéb összefüggéseket lásd a (2) hivatkozásban.

Amennyiben a megoszlási hányados (P_{ow}) nem ismert, az anyag vízben való oldhatóságának (s) ismeretéből becsülhető meg (3):

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10} (s) + 0{,}710 \quad (r^2 = 0{,}994) \qquad \text{(2. egyenlet),}$$

ahol:

s = az oldhatóság (mol/l): (n = 36).

Ezek az összefüggések csak 2 és 6,5 közé eső log P_{ow}-értékkel rendelkező vegyszerekre alkalmazhatók (4).

A k_2-becslés felhasználásával, a felvételt és tisztulást leíró általános kinetikai egyenletből (elsőrendű kinetika) kiszámítható az állandósult állapot néhány százalékának eléréséhez szükséges idő:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

vagy ha C_w állandó:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \, (1 - e^{-k_2 t}) \qquad \text{(3. egyenlet)}$$

Az állandósult állapot közelítésekor ((t->∞), a 3. egyenlet egyszerűsíthető (5) (6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ vagy } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Ekkor $k_1/k_2 \cdot C_w$ a halakban mérhető koncentráció közelítése „állandósult állapotban” ($C_{f,\,s}$).

A 3. egyenlet átírható:

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ or } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{(4. egyenlet)}$$

A 4. egyenlet alkalmazásával megjósolható az állandósult állapot néhány százalékának eléréséhez szükséges idő, amennyiben az 1. vagy 2. egyenlet felhasználásával k_2 előre megbecsült.

▼B

Iránymutatóként: statisztikailag elfogadható adatok (BCF_K) előállításához a felvételi fázis statisztikailag optimális időtartama az a periódus, ami ahhoz szükséges, hogy a halban mérhető vizsgálatianyag-koncentráció logaritmusának görbéje lineáris időskálán felrajzolva elérje a felezőpontját, illetve $1,6/k_2$-t, vagy az állandósult állapot 80 %-át, de ne legyen nagyobb $3,0/-k_2$-nél, vagy az állandósult állapot 95 %-nál (7).

Az állandósult állapot 80 %-ának eléréséhez szükséges idő (4. egyenlet):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ or } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(5. egyenlet)}$$

A 95 %-os állandósult állapot hasonlóan:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(6. egyenlet)}$$

Például log P_{ow} = 4-es vizsgált anyag esetében a felvételi fázis (fel) időtartama (az 1., 5. és 6. egyenletet használva):

$\log_{10} k_2 = -0,414.(4) + 1,47$ $\qquad k_2 = 0,652$ nap^{-1}

vagy ff (80 %) = 1,6/0,652, azaz 2,45 nap (59 óra)

ff (95 %) = 3,0/0,652, azaz 4,60 nap (110 óra)

Hasonlóan, egy $s = 10^{-5}$ mól/l (log(s) = - 5,0) vizsgált anyag esetében az ff időtartama (az 1., 2., 5. és 6. egyenletet használva):

$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 (- 5,0) + 0,710 = 5,02$

$\log_{10} k_2 = 0,414 (5,02)+1,47$

$k_2 = 0,246$ nap^{-1}

Ff (80 %) = 1,6/0,246, azaz 6,5 nap (156 óra)

vagy ff (95 %) = 3,0/0,246, azaz 12,2 nap (293 óra)

Ezenkívül:

$T_{eq} = 6,54 \times 10 = {}^3P_{ow} + 55,31$ (óra)

kifejezés használható az effektív állandósult állapot eléréséhez szükséges idő kiszámolásához (4).

2. *A tisztulási fázis időtartamának előrejelzése*

A test anyagterhelésének a kezdeti koncentráció néhány százalékára való csökkentéséhez szükséges idő megbecsülhető a felvételi és tisztulási periódust leíró általános egyenletből (elsőrendű kinetika) (1) (8).

A tisztulási fázisban C_w nullának feltételezett. Az egyenlet egyszerűsíthető:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ vagy } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

ahol $C_{f,0}$ a koncentráció a tisztulási fázis kezdetén. Az 50 %-os tisztulás aztán t_{50} időpontban következik be:

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ vagy } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Hasonlóan, a 95 %-os tisztulás elérésének időpontja:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Amennyiben 80 %-os felvételt használnak az első periódusban ($1,6/k_2$), és 95 %-os ürülést a tisztulási fázisban ($3,0/k_2$), akkor a tisztulási fázis megközelítőleg kétszer hosszabb a felvételi fázisnál.

Fontos megjegyezni azonban, hogy a becslések azon a feltevésen alapulnak, hogy a felvételi és tisztulási mintázat elsőrendű kinetikát követ. Amennyiben nyilvánvalóan nem elsőrendű kinetikáról van szó, összetettebb modellt kell alkalmazni [pl. (1) hivatkozás].

IRODALOM (a 3. függelékhez)

(1) Spacie A. and Hamelink J. L. (1982). Alternative models for desribing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp. 309–320.

(2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCFs 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. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P. H. 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 Sauerhoff 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 Leuween K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. Chemosphere, 9, pp. 3–19.

▼B

4. függelék

Elméleti példa biokoncentrációs vizsgálatok mintavételezési ütemtervére log P_{ow} = 4 anyagok esetében

Halminta	Mintavételek		Vízminták száma	Halak száma mintánként
	Minimálisan megkövetelt gyakoriság (nap)	Járulékos mintavételezés		
Felvételi fázis	–1 0		2 (*) 2	45–80 hal telepítve
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Tisztulási fázis				Halak áthelyezve vizsgált vegyi anyagtól mentes vízbe
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

(*) Vízminta minimum három teljestérfogat csere után lett véve.

A zárójeles értékek a minták (víz, hal) számát jelentik, amennyiben járulékos mintavételezés történik.

Megjegyzés: k_2 vizsgálat előtti becslése 4,0-ás log P_{ow}-re 0,652 nap^{-1}. A kísérlet teljes időtartama 3 * ff = 3 * 4,6 nap. azaz 14 nap. A „ff” becslését lásd a 3. függelékben.

▼B

5. függelék

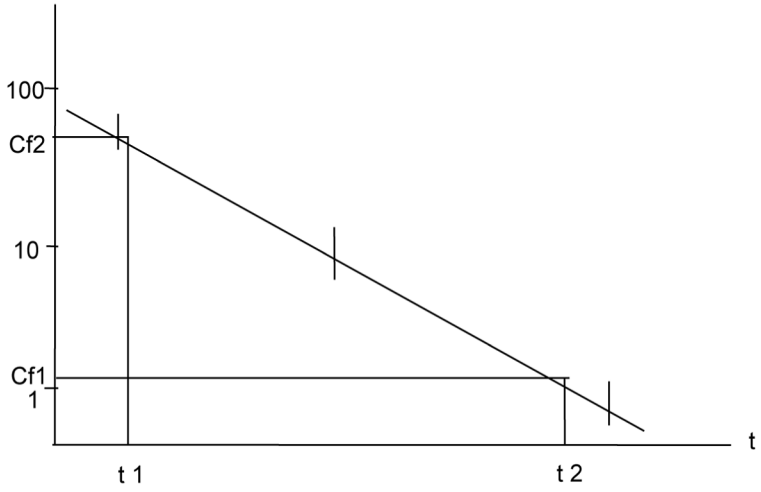
A megfelelő modell kiválasztása

A legtöbb biokoncentrációs adatról feltételezett, hogy jól leírható egy egyszerű kétváltozós modellel, amely a tisztulási fázisban (féllogaritmusos papíron ábrázolva) a halakban mérhető koncentrációk pontjaira illeszthető egyenest ad. (Amennyiben ezek a pontok nem írhatók le egyenessel meghatározott görbével, összetettebb modellt kell alkalmazni, lásd például Spacie és Hamelink, 3. függelék, 1. hivatkozás).

Grafikus módszer a k_2 tisztulási (ürülési) sebességi állandó meghatározására

Az egyes halmintákban talált vizsgált anyag koncentrációját a mintavételezési idő függvényében kell ábrázolni féllogaritmusos papíron. Az egyenes meredeksége k_2.

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Meg kell jegyezni, hogy az egyenes vonaltól való eltérések elsőrendűnél összetettebb tisztulási mintázatot jelezhetnek. Az elsőrendű kinetikától eltérő tisztulási típusok meghatározására grafikus módszer alkalmazható.

Grafikus módszer a k_1 felvételi sebességi állandó meghatározására

Amennyiben k_2 adott, k_1-et az alábbiaknak megfelelően kell kiszámítani:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(1. egyenlet)}$$

A log koncentrációt az idő függvényében (aritmetikus skálán) ábrázolva nyert szabályos felvételi görbe középpontjából olvasható le C_f érték.

▼B

Számitógépes módszer a felvételi és a tisztulási (ürülési) sebességi állandó számítására

A biokoncentrációs tényező továbbá a k_1 és k_2 sebességi állandó kiszámításának előnyben részesített módszere a nem lineáris paraméterbecslési módszer alkalmazása számítógépen. Ezek a programok k_1 és k_2 értékét az egymást követő idő koncentráció adatokból és az alábbi modell alapján találják meg:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(2. egyenlet)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t > t_c \qquad \text{(3. egyenlet)}$$

ahol t_c = idő a felvételi fázis végén.

Ez a megközelítés a k_1 és k_2 standard deviációjára ad becslést.

Mivel k_2 legtöbbször viszonylag nagy pontossággal megbecsülhető a tisztulási görbéből, és mert erős a korreláció a k_1 és k_2 paraméter között, amennyiben egyidejűleg becsülték meg őket, tanácsos lehet először csak a tisztulási adatokból kiszámolni k_2-t, és ezt követően nem lineáris regresszióval számolni k_1-et a felvételi adatokból.

▼B

C.14. HALIVADÉKOK NÖVEKEDÉSI VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

E növekedéssel kapcsolatos toxicitásvizsgálat megfelel az OECD TG 215-nek (2000).

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat célja annak megállapítása, hogy a halivadékok növekedésére milyen következményekkel jár, ha hosszabb időn keresztül vegyi anyagok hatásának vannak kitéve. E vizsgálat egy olyan módszeren alapul, amelyet az Európai Unión belül fejlesztettek ki, és körvizsgálatnak vetették alá (1) (2) annak felmérésére, hogy átfolyási feltételek mellett egyes vegyi anyagok milyen hatásokat gyakorolnak a szivárványos pisztráng ivadékának *(Oncorynchus mykiss)* növekedésére. Más, kellően dokumentált halfajok is felhasználhatók. Növekedési vizsgálatot végeztek már például zebrahalon *(Danio rerio)* ([1]) (3) (4) és rizshalon (medaka, *Oryzias Latipes)* (5) (6) (7).

Lásd még az Általános bevezetés C. részét.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC): a vizsgált anyag azon legalacsonyabb kísérleti koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető az anyag egy jelentős hatása ($p < 0,05$). Azonban a LOEC fölötti valamennyi kísérleti koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább azonos a LOEC-nél megfigyelttel, vagy erősebb annál.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül a LOEC alatti kísérleti koncentráció.

EC_x: e vizsgálati módszerben a vizsgált anyag azon koncentrációja, amely – a kontrollal összevetve – x % eltérést okoz a növekedés ütemében.

Betelepítési arány: a halak nedvesen mért tömege egységnyi mennyiségű vízben.

Betelepítési sűrűség: a halak száma egységnyi mennyiségű vízben.

Halegyedek specifikus növekedési üteme: az egyed növekedésének üteme, a kiindulási tömegéhez viszonyítva.

Specifikus növekedési ütem a tartály átlagában: egy tartályban lévő halpopuláció átlagos növekedési üteme egy adott koncentráció mellett.

Pszeudospecifikus növekedési ütem: az egyed növekedési üteme a tartályban lévő halpopuláció kezdeti súlyának átlagához viszonyítva.

([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. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A növekedési ütemük exponenciális szakaszában lévő halivadékokat – megmérésük után – kísérleti tartályban helyezik el, és szubletális koncentrációjú, vízben oldott vizsgált anyag hatásának teszik ki, átfolyást biztosítva, vagy amennyiben ez nem lehetséges, akkor megfelelő félstatikus (statikus-megújítási) feltételek mellett. A vizsgálat időtartama 28 nap. A halakat naponta etetik. A táplálék adagolását a halak kiindulási súlya alapján határozzák meg; az adagokat 14 nap után újra lehet számítani. A kísérlet végén a halakat ismét lemérik. Regressziós modell segítségével elemezni kell a vizsgált anyag hatásait a növekedés ütemére, azon koncentráció meghatározása érdekében, amely a növekedés ütemében x % eltérést okoz, azaz ECx (pl. EC_{10}, EC_{20}, EC_{30}) eltérést. Alternatív módon, az adatokat össze lehet hasonlítani a kontrollértékekkel, a „legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció” (LOEC), majd annak alapján a „megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció” (NOEC) meghatározása érdekében.

1.4. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

Rendelkezésre kell hogy álljanak az e vizsgálat céljára kiválasztott fajokkal lehetőleg korábban már elvégzett, akut toxicitási vizsgálatok eredményei (lásd a C.1. vizsgálati módszert). Ez azt jelenti, hogy a vizsgált anyag vízoldhatósága és gőznyomása ismert, és dokumentált pontosságú, megbízható analitikai módszer áll rendelkezésre a vizsgált oldatokban lévő vizsgált anyag számszerűsítéséhez, továbbá rendelkezésre állnak az észlelés korlátaira vonatkozó adatok is.

A hasznos információk közé tartozik még a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, stabilitása vízzel és fénnyel szemben, a pK_a- és P_{ow}-értékek, valamint a gyors biológiai lebomlásra vonatkozó vizsgálatok eredményei is (lásd a C.4. vizsgálati módszert).

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi feltételeknek kell teljesülniük:

— a vizsgálat végén a mortalitási arány a kontrollcsoportban nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— a kontrollcsoportbeli halak átlagos súlyának megfelelő mértékben kell növekednie ahhoz, hogy lehetővé tegye a növekedési ütemben egy már szignifikánsnak tekinthető minimális eltérés érzékelését. Egy „körvizsgálat” (2) kimutatta, hogy a szivárványos pisztráng esetében a kontrollcsoportbeli halak átlagos tömegének 28 nap alatt legalább a kiindulási átlagtömegük felével (azaz 50 %-kal) kell növekednie; pl. kiindulási tömege 1 g/hal (= 100 %), végső tömege 28 nap elteltével ≥ 1,5 g/hal (≥ 150 %),

— a kísérlet során az oldott oxigén koncentrációját mindvégig legalább a levegőtelítettségi érték (ASV) 60 %-án kell tartani,

— a kísérleti tartályokban a víz hőmérséklete a kísérlet során soha sem térhet el ± 1 °C- nál nagyobb mértékben, és a hőmérsékletet a vizsgált fajra nézve meghatározott hőmérséklet-tartományban egy 2 °C-nyi sávon belül kell tartani (1. függelék).

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Felszerelés**

Normál laboratóriumi felszerelés és különösen az alábbiak:

— oxigéntartalom- és pH-érték-mérők,

▼B

— a víz keménységi fokának és lúgosságának mérésére szolgáló berendezések,

— a hőmérséklet szabályozására és lehetőleg folyamatos figyelemmel kísérésére alkalmas készülékek,

— kémiailag semleges anyagból készült és az ajánlott betelepítési aránynak és betelepítési sűrűségnek megfelelő kapacitású tartályok (lásd 1.8.5. pont és az 1. függelék),

— megfelelő pontosságú mérleg (azaz ± 0,5 % pontosságú).

1.6.2. **Víz**

A vizsgálat céljaira bármilyen víz felhasználható, amelyben a vizsgált fajok kellően hosszú ideig túlélik a vizsgálati körülményeket, és növekednek. A víz minőségét a kísérlet során mindvégig azonos szinten kell tartani. A víz pH-értékének a 6,5–8,5 tartományon belül kell lennie, azonban egy adott vizsgálat során csak ± 0,5 pH-egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Javasolt a 140 mg/l ($CaCO_3$) vízkeménység választása. Annak biztosítására, hogy a víz összetétele ne befolyásolja túlzottan a vizsgálat eredményeit (pl. mert komplexet képez a vizsgált anyaggal), időnként mintákat kell venni elemzésre. Mérni kell a következőket: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca, Mg, Na, K, Cl és SO_4), a peszticidek (pl. összes szerves foszfor és összes szerves klór tartalmú peszticidek), az összes szerves szén és a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációját, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvízről tudott, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben a víz minősége bizonyítottan konstans legalább egy éven keresztül, akkor ritkábban, nagyobb időközökkel is lehet ellenőrző méréseket végezni (pl. csak hathavonta egyszer). Az elfogadható minőségű hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságának felsorolása a 2. függelékben található.

1.6.3. **Vizsgált oldatok**

A kiválasztott koncentrációjú vizsgált oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el.

A törzsoldatot lehetőleg a vizsgált anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) is felhasználhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez.

Egyes esetekben szükség lehet oldószerek vagy diszpergálószerek (oldódást segítő szerek) használatára a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. Ilyen alkalmas oldószer lehet az aceton, etanol, metanol, dimetil-szulfoxid, dimetil-formamid és a trietilénglikol. Alkalmas diszpergálószer lehet például: Cremophor, RH40, Tween 80, Metilcellulóz 0,01 % és a HCO-40. Kellő figyelemmel kell eljárni a biológiailag gyorsan lebomló szerek (pl. aceton) és/vagy az erősen illékony összetevők használatakor, mivel ezek az átfolyási vizsgálatok során fellépő baktériumszaporodás kapcsán gondokat okozhatnak. A diszpergálószerek nem gyakorolhatnak lényeges hatásokat a halak növekedésére és láthatóan kedvezőtlen hatásokat az ivadékokra, amit csak egy oldószerrel végzett ellenőrző vizsgálat tárhat fel.

▼B

Az átfolyási vizsgálatok céljára olyan rendszert kell használni, amely folyamatosan biztosítja és hígítja a vizsgált anyag törzsoldatát (pl. egy adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy egy telítőrendszer), annak érdekében, hogy a kísérleti tartályhoz eljusson a hígítóoldat. A kísérlet során időnként – lehetőleg naponta – ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben a vizsgálat során. Egy „körvizsgálat" (2) bizonyította, hogy a szivárványos pisztrángok esetében hat liter/gramm hal/nap mértékű vízcserélődési sebesség elfogadható (lásd 1.8.2.2. szakasz).

Félstatikus (megújítási) vizsgálatok során a közeg megújításának gyakorisága a vizsgált anyag stabilitásától függ, azonban ajánlott a víz napi cseréje. Amennyiben korábbi stabilitási vizsgálatok (lásd 1.4. pont) arra mutattak rá, hogy nem stabil a vizsgált anyag koncentrációja (azaz kívül esik a névleges koncentráció 80–120 %-os tartományán, vagy a kiinduláskor mért koncentráció 80 %-a alá csökken) a megújítási időszak során, akkor fontolóra kell venni egy átfolyási vizsgálat elvégzését.

1.6.4. **A halfajok kiválasztása**

E vizsgálat céljaira az ajánlott halfaj a szivárványos pisztráng *(Oncorhynchus mykiss),* mert a legtöbb tapasztalat eddig az e fajjal folytatott „körvizsgálatokból" származik (1) (2). Azonban más, kellően dokumentált halfajok is felhasználhatók, de ilyenkor az eljárást esetleg módosítani kell a megfelelő vizsgálati körülmények biztosítása érdekében. Például zebrahal *(Danio rerio)* (3) (4) és rizshal (medaka, *Oryzias Latipes)* (5) (6) (7) vizsgálatából is szereztek már növekedésivizsgálat-tapasztalatokat. Ebben az esetben a jelentésnek tartalmaznia kell az eltérő fajok és kísérleti módszer kiválasztásának indoklását.

1.6.5. **A halak tartása**

A kísérleti halakat egyetlen tenyészet – lehetőleg egy ivásból származó – populációjából kell kiválasztani, és a halakat a vizsgálat megkezdése előtt legalább két hétig a kísérlet során alkalmazandó körülmények, vízminőség és megvilágítás mellett kell tartani. A napi etetéskor minimálisan a testsúly 2 %-ának megfelelő adagokat kell kapniuk, a kéthetes tartási időszak és a vizsgálat ideje alatt pedig lehetőleg a testsúly 4 %-ának megfelelő mennyiséget.

Egy 48 órás szoktatási időszakot követően fel kell jegyezni a mortalitási arányt, és alkalmazni kell az alábbi kritériumokat:

— amennyiben hét nap alatt a populáció mortalitása 10 %-nál magasabb, az egész állományt ki kell cserélni,

— 5 és 10 % közötti mortalitás esetén: további hét nap akklimatizációs időszak beiktatása után – amennyiben a mortalitási arány ezt követően is magasabb 5 %-nál – az egész állományt ki kell cserélni,

— ha hét nap után a mortalitás 5 % alatt marad, az állomány elfogadható.

A halak a vizsgálat előtti két hétben és a vizsgálat során nem kaphatnak betegség miatti kezelést.

▼B

1.7. A VIZSGÁLAT KIALAKÍTÁSA

A „vizsgálat kialakítása” meghatározás a kísérleti koncentráció számának és osztásközeinek, az egyes koncentrációszintekhez használt tartályok számának és a halak tartályonként létszámának a megválasztását jelenti. Ideális esetben a vizsgálatot az alábbiakra tekintettel kell megtervezni:

— a vizsgálat célja,

— az alkalmazandó statisztikai elemzési módszer,

— a kísérlethez szükséges anyagok beszerezhetősége és költsége.

Amennyiben lehetséges, a kísérleti cél megfogalmazásában rögzíteni kell, hogy milyen statisztikai pontossági szinten kell egy adott nagyságú eltérésnek (pl. a növekedés ütemének) érzékelhetőnek lennie, vagy – alternatív módon – milyen pontossággal kell tudni megbecsülni az EC_x (pl. x = 10-nél, 20-nál vagy 30-nál, és lehetőleg nem kevesebb, mint 10) értékét. Ezek nélkül nem lehet határozott leírást adni a vizsgálatok terjedelméről.

Fontos annak felismerése, hogy a valamelyik statisztikai elemzési módszer alkalmazására optimálisnak (az erőforrások legjobb kihasználását biztosítónak) bizonyult módszer nem szükségszerűen optimális egy másik módszer esetében. A LOEC/NOEC becsléséhez ajánlott tervezés ezért nem feltétlenül azonos a regressziós analízis esetére ajánlottal.

A Stephan és Rogers (9) által tárgyalt okok miatt a regressziós elemzés a legtöbb esetben megfelelőbb, mint a varianciaelemzés. Amennyiben azonban nem található megfelelő regressziós modell ($r_2 < 0,9$), akkor a NOEC/LOEC módszert kell használni.

1.7.1. **A regressziós analízis kialakítása**

A regresszióval elemzendő vizsgálat kialakításakor a legfontosabb szempontok a következők:

— a vizsgálat során alkalmazott koncentrációnak magában kell foglalnia azon hatáskoncentrációt (pl. $EC_{10,20,30}$) és azon koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált anyag hatását értékelni szükséges. Azon pontossági szint, amellyel a hatáskoncentrációra vonatkozó becsléseket el lehet végezni, akkor lesz a legmegfelelőbb, ha a hatáskoncentráció a vizsgált koncentrációtartomány közepénél helyezkedik el. A megfelelő koncentrációértékek kiválasztásához hasznos lehet egy előzetes behatároló vizsgálat elvégzése,

— a megfelelő statisztikai modellezés érdekében a vizsgálat során legalább egy kontrolltartályt és még további öt, különböző koncentrációjú közeggel feltöltött kiegészítő tartályt kell alkalmazni. Adott esetben, diszpergálószer használatakor egy, a diszpergálószert a legmagasabb vizsgált koncentrációban tartalmazó kontrolltartályt kell beiktatni a vizsgált sorozat mellé (lásd 1.8.3. és 1.8.4. szakasz),

— megfelelő mértani vagy logaritmikus sorozatot (10) (lásd a 3. függelék) lehet használni. Ajánlott a kísérleti koncentrációk logaritmikus osztásközének használata,

▼B

— amennyiben hatnál több tartály áll rendelkezésre, akkor a többlettartályokat vagy párhuzamos vizsgálatra lehet felhasználni, vagy a koncentrációtartományt fel lehet osztani az osztásköz csökkentése érdekében. Mindkét módszer egyformán javasolt.

1.7.2. **A NOEC/LOEC becslésének módja varianciaelemzés (ANOVA) használatával**

Lehetőleg minden koncentrációszinten legyen egy ismétlőtartály, és a statisztikai elemzést az egyes tartályok esetében kell elvégezni (11). Az ilyen ismétlőtartályok nélkül a halak tömegének egyedi eltérésén túl nem lehet figyelembe venni a tartályok közötti eltéréseket. Korábbi tapasztalatok (12) azonban azt mutatják, hogy – a vizsgált esetben – a „tartályok közötti" változékonyság nagyon csekély volt a „tartályon belüli" (azaz a halak közötti) változékonyság képest. Ezért az egyes halak szintjén végzett statisztikai elemzés elvégzése viszonylag elfogadható alternatíva.

Hagyományosan legalább ötféle, mértani sorozatot alkotó kísérleti koncentrációt használnak, lehetőleg a 3.2 értéket meg nem haladó szorzótényező alkalmazásával.

Általában, ha a vizsgálatokat párhuzamos tartályok használatával végzik, az ilyen kontrolltartályok száma, s ennélfogva a halak száma is az egy koncentrációhoz tartozó teszttartályok számának (amelyek azonos méretűek) kétszerese (13) (14) (15). Ellenkező esetben, azaz párhuzamos tartályok nélkül a kontrollcsoportban lévő halak száma azonos az egyes kísérleti koncentrációk alapján vizsgált halak számával.

Amennyiben a varianciaelemzés (ANOVA) a tartályokon alapul, nem pedig az egyes halakon (ami megkövetelné a halak egyedi jelölését vagy „pszeudospecifikus" növekedési ütemek használatát a számításokhoz – lásd 2.1.2. szakasz), akkor elegendő számú párhuzamos tartályra van szükség az egyes „koncentrációszintek közötti tartályok" standard eltérésének meghatározásához. Ez azt jelenti, hogy a varianciaelemzésben a hibák szabadságfoka legalább 5 kell hogy legyen (11). Amennyiben csak a kontrollok számát duplázzák meg, fennáll a veszélye annak, hogy a hiba variabilitása torzul, mivel a kérdéses növekedési ütemek átlagértékét követve növekedhet. Mivel a növekedési ütem valószínűleg a koncentráció növekedésével arányosan csökken, ez általában a variabilitás túlbecsléséhez vezet.

1.8. ELJÁRÁS

1.8.1. **A vizsgálati halak kiválasztása és lemérése**

Fontos a halak testtömegeltéréseinek minimumra csökkentése a vizsgálat elején. A vizsgálatok során használatra javasolt különböző halfajok megfelelő mérettartományait az 1. függelék tartalmazza. A vizsgálathoz felhasznált teljes halállományon belül a vizsgálat kezdetén az egyedek testtömegének tartományát ideális esetben az átlagos testtömeg ±10 százalékán belül célszerű tartani, de az eltérés semmiképp sem lehet több 25 %-nál. Az átlagos testtömeg előzetes becslése céljából javasolt a vizsgálat előtt a halak egy részmintájának a tömegét lemérni.

▼B

A vizsgálat megkezdése előtt a halállomány populációjának táplálékát 24 órán keresztül vissza kell tartani. A halakat ezt követően kell véletlenszerűen kiválasztani. Általános altatószerrel (pl. MS 222 egy egységére számolt kétegységnyi szódabikarbonát hozzáadásával semlegesített 100 mg/l triazin-metán-szulfonát(MS 222) vizes oldata) elkábított halak nedves (itatóspapírral szárított) egyedi súlyát az 1. függelékben megadott pontossággal kell lemérni. A meghatározott mérettartományon belüli halakat kell megtartani és véletlenszerűen elosztani a tesztedények között. Fel kell jegyezni az egyes edényekbe helyezett halak nedvesen mért össztömegét. A halak altatása és megfogása (ideértve az itatóspapírral történő szárítást és a mérlegelést is) stresszt és a halivadékok sérülését okozhatja, különösen a kisméretű fajok esetében. Ezért a halivadékok kezelésekor maximális gonddal kell eljárni, hogy elkerüljük a stresszhatásokat és sérüléseket.

A halakat a kísérlet 28. napján újra le kell mérni (lásd 1.8.6. szakasz). Amennyiben azonban a táplálékadagolás újraszámítása szükséges, az ismételt mérlegelést már a 14. napon el lehet végezni (lásd 1.8.2.3. szakasz). A halláp adagolásának módosításához a halak méretének lefényképezése is megfelelő.

1.8.2. **Expozíciós feltételek**

1.8.2.1. *Időtartam*

A vizsgálat időtartama > 28 nap.

1.8.2.2. *Betelepedési arány és betelepedési sűrűség*

Fontos, hogy a betelepedési arány és a betelepedési sűrűség megfeleljen a kísérlethez felhasznált halfajoknak (lásd 1. függelék). Amennyiben túl magas a betelepedési sűrűség, akkor a túlzsúfoltság okozta stressz a növekedési ütem lassulásához és esetleg megbetegedésekhez vezet. A túl alacsony betelepedési sűrűség territóriumfoglalási viselkedésmódokat idézhet elő, ami szintén befolyásolja a növekedési ütemet. A betelepedési sűrűséget mindenképpen annyira alacsonyan kell tartani, hogy a vízben oldott oxigén koncentrációját külön levegőztetés nélkül is legalább a levegőtelítettségi érték 60 %-ának megfelelő szinten lehessen tartani. Egy körvizsgálat (3) kimutatta, hogy a szivárványos pisztrángok esetében 40 liternyi vízben 16 darab, egyenként 3–5 grammos hal elhelyezése az elfogadható. A vízcsere ajánlott gyakorisága a kísérlet során 6 liter/gramm hal/nap.

1.8.2.3. *Táplálás*

A halakat az elfogadható növekedési ütemet biztosítóan adagolt megfelelő haltáppal (1. függelék) kell etetni. Gondosan kerülni kell a mikrobatenyészetek kialakulását és a víz zavarossá válását. A szivárványos pisztrángok esetében a halak testsúlya 4 %-nak megfelelő arányú napi tápadagolás elégíti ki legvalószínűbben e feltételeket (3) (16) (17) (18). A napi adagot két egyenlő részre lehet osztani és beadagolni, legalább öt óra különbséggel. Az adagolást mindegyik tesztedény esetében a teljes kiindulási haltömeg alapján kell megállapítani. Amennyiben a halakat a 14. napon ismét lemérik, az adagolás mennyisége újraszámolható. A mérlegelés előtt a táplálékot 24 órán keresztül vissza kell tartani.

▼B

Az el nem fogyasztott tápot és az ürüléket minden nap gondosan, szívás útján kell eltávolítani a tartályok aljáról.

1.8.2.4. *Megvilágítás és hőmérséklet*

A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (1. függelék).

1.8.3. **Vizsgálati koncentrációk**

A vizsgálat felépítésétől függetlenül a vizsgált anyagból általában ötféle koncentráció használata szükséges (lásd 1.7.2. szakasz). A vizsgált anyag toxicitásának előzetes ismerete (pl. egy akut vizsgálat és/vagy tartománykeresési vizsgálatok alapján) segíthet a megfelelő koncentrációértékek kiválasztásában. Az ötnél kevesebb koncentrációszint alkalmazását indokolni kell. A legmagasabb kísérleti koncentráció nem haladhatja meg az anyag vízoldhatósági határértékét.

Amennyiben diszpergálószert használnak a törzsoldat előkészítéséhez, az oldat végső koncentrációja nem lehet több, mint 0,1 ml/liter, és lehetőleg azonosnak kell lennie az összes tesztedényben (lásd 1.6.3. szakasz). Mindenesetre minden lehetséges erőfeszítést meg kell tenni az ilyen anyagok használatának elkerülésére.

1.8.4. **Ellenőrzések**

A hígítóvíz-ellenőrzések száma a vizsgálat kialakításától függ (lásd 1.7–1.7.2. szakasz). Amennyiben diszpergálószert használnak, akkor ugyanannyi ellenőrzést kell végezni, mint amennyit a hígítóvíz-ellenőrzések esetében.

1.8.5. **Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága**

A vizsgálat során a vizsgált anyag koncentrációját rendszeres időközönként meg kell állapítani (lásd az alábbiakban).

Átfolyási vizsgálatok esetében a hígítóvíz és a mérgező hatású törzsoldat áramlási sebességét időszakosan – lehetőleg naponta egyszer – ellenőrizni kell, továbbá biztosítani kell, hogy ezen érték a vizsgálat során 10 %-nál nagyobb mértékben ne ingadozzon. Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belülre várhatók (azaz a 80–120 %-os sávon belül; lásd 1.6.2. és 1.6.3. szakasz), akkor minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb kísérleti koncentrációk elemzése a vizsgálat kezdetekor, majd azt követően hetente egyszer. Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei várhatóan nem maradnak a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül (a vizsgált anyag stabilitási adatai alapján), akkor javasolt az összes kísérleti koncentráció elemzése, de minden esetben ugyanazon eljárásrendnek megfelelően.

A félstatikus (megújítási) vizsgálatok esetében, ahol a vizsgált anyag koncentrációja várhatóan a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül marad, minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb kísérleti koncentrációk elemzése a frissen elkészített közegre nézve a vizsgálatok kezdetekor, közvetlenül a megújítást megelőzően, valamint azt követően hetente egyszer. Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei várhatóan nem maradnak meg a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül, az összes kísérleti koncentrációt a stabilabb anyagoknál alkalmazottal azonos eljárásrendnek megfelelően kell elemezni.

▼B

Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban megfelelő bizonyítékokkal támasztható alá az, hogy az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációját sikerült a vizsgálatok során mindvégig a névleges értékek vagy a kiindulási koncentráció ± 20 százalékos sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért értékekre is lehet alapozni.

Szükség lehet a minták szűrésére (0,45 mikron pórusméretű szűrőbetétet használva) vagy centrifugálására. A javasolt eljárás a centrifugálás. Amennyiben azonban a vizsgált anyag nem adszorbeálódik a filter felszínén, akkor a szűrés is elfogadható módszer.

A vizsgálat során mindegyik edényben mérni kell az oldottoxigénkoncentrációt, a pH-értéket és a hőmérsékletet. A vízkeménységet, a lúgosságot és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) mérni kell a kontrollmintákban és a legmagasabb koncentrációjú közeget tartalmazó egyik edényben. Minimális követelményként az oldottoxigén-koncentrációt és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) mérni kell három alkalommal (a vizsgálat elején, közepén és végén). A félstatikus (megújítási) vizsgálatok esetében javasolt az oldottoxigén gyakoribb mérése, lehetőleg minden vízcsere előtt és után, de hetente legalább egyszer. A pH-értéket a félstatikus megújítási vizsgálatok esetében minden vízcsere elején és végén mérni kell, az átfolyási vizsgálatok esetében pedig legalább hetente egyszer. A vízkeménységet és a lúgosságot vizsgálatonként egyszer kell megmérni. A hőmérsékletet legalább egy tesztedényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

1.8.6. **Megfigyelések**

Tömegmérés: a vizsgálat végén le kell mérni az összes életben maradt hal nedves (itatóspapírral szárított) tömegét; vagy tesztedényenként csoportosan mért vagy egyedi súlyt kell meghatározni. A halak tesztedényenkénti együttes tömegmérése kedvezőbb az egyedi mérésnél, mert ez utóbbinál minden egyes halat külön meg kell jelölni. Az egyes egyedek fajlagos növekedési üteme meghatározásához végzett egyedi testtömegmérések esetében a halak egyedi jelölésére stresszmentes módszert kell kiválasztani (megfelelőek lehetnek a fagyasztásos jelölés alternatívái, például a színes, vékony horgászzsinór használata).

A halakat a vizsgálat időszakában naponta meg kell vizsgálni és bármilyen külső rendellenességet (bevérzés, elszíneződés) vagy rendellenes viselkedésmódot fel kell jegyezni. Az elpusztulásokat fel kell jegyezni, és az elpusztult egyedeket a lehető legrövidebb idő alatt el kell távolítani a tartályból. Az elpusztult halakat nem kell pótolni, mivel a meghatározott telepítési tömeg és sűrűség elegendő – a halak edényben mért számában beálló változás révén – a növekedési ütem módosulásának elkerüléséhez. A táplálék arányát azonban ki kell igazítani.

2. ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS

2.1. AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

A vizsgálat kialakításába és eredményei elemzésébe ajánlott egy statisztikus bevonása, mivel e vizsgálati módszer jelentős eltéréseknek ad teret a kísérletek menetének kialakításában, például ami a tesztkamrák, a kísérleti koncentrációk, a halak stb. számát illeti. A vizsgálat kialakításában rejlő választási lehetőségekre való tekintettel a statisztikai módszerre vonatkozó külön eligazítás itt nem szerepel.

▼B

A 10 %-ot meghaladó mortalitási arányú tesztedényekre nézve nem kell kiszámítani a növekedési ütemet. A mortalitási arányt azonban az összes kísérleti koncentrációra nézve jelezni kell.

Bármilyen módszer is szolgáljon az adatok elemzésére, a központi kérdés az „r” specifikus növekedési ütem nagysága a „t_1” és „t_2” időpont között. Ezt különböző módokon lehet meghatározni, attól függően, hogy a halakat megjelölik-e egyedileg, illetve hogy szükség van-e az átlagos növekedési ráta kiszámítására.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

ahol:

r_1 = halegyedek specifikus növekedési üteme

r_2 = specifikus növekedési ütem a tartály átlagában

r_3 = pszeudospecifikus növekedési ütem

w_1, w_2 = egy adott hal tömege, a t_1, illetve t_2 időpontban

$\log_e w_1$ = egy adott hal vizsgálati időszak elején mért tömegének logaritmusa

$\log_e w_2$ = egy adott hal vizsgálati időszak végén mért tömegének logaritmusa

$\log_e W_1$ = a tesztkamrában lévő halakra vonatkozó w1 értékek logaritmusainak átlaga a vizsgálati időszak elején

$\log_e W_2$ = a tesztkamrában lévő halakra vonatkozó w_2 értékek logaritmusainak átlaga a vizsgálati időszak végén

t_1, t_2 = a vizsgálati időszak elejének és végének ideje (napja)

Az r_1, r_2, r_3 értékeket ki lehet számítani a 0–8. nap időszakára és – adott esetben (azaz amennyiben a 14. napon is végeznek méréseket) – a 0–14., illetve a 14–28. nap időszakára.

2.1.1. **Az eredmények regressziós elemzése (a koncentráció változására való reagálás modellezése)**

Ezen elemzési módszer a specifikus növekedési ütem és a koncentrációértékek között hoz létre alkalmas matematikai összefüggést, és ennélfogva lehetővé teszi az „EC_x” azaz bármely szükséges EC érték becslését. E módszer használatakor nem szükséges kiszámítani az „r” értékét az egyes halegyedekre (r_1), hanem ehelyett az „r”„kamraátlag” értékére (r_2) lehet a számítást alapozni. Lehetőleg ez utóbbi módszert kell alkalmazni. Ez egyben a legkisebb halfajok kísérleti felhasználásához is célszerűbb megoldás.

Az átlagos specifikus növekedési ráták (r_2) a koncentráció változásának függvényében grafikusan ábrázolhatók a koncentráció változására való reagálás összefüggéseinek megvizsgálása érdekében.

▼B

Az r_2 és a koncentráció alakulása közötti összefüggés kifejezése érdekében egy megfelelő indoklással alátámasztott választás szerinti, alkalmas modellt kell használni.

Amennyiben a kísérletet túlélő halak száma nem azonos a tesztedényekben, akkor a modellillesztéses folyamatot, függetlenül attól, hogy egyszerű vagy nem lineáris, súlyozni kell, a csoportok nem egyenlő létszámának a figyelembevétele érdekében.

A modellillesztéses módszer segítségével becsülhető kell, hogy legyen pl. az EC_{20} és a középértéktől való eltérés (akár a standard hibát, akár a konfidencia-intervallumot tekintve). Az illesztett modell grafikonját az adatokkal összevetve kell bemutatni úgy, hogy látható legyen a modell illeszkedésének megfelelő volta (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Az eredmények elemzése a LOEC becsléséhez**

Amennyiben a vizsgálat során párhuzamos tartályokat használnak valamennyi koncentrációszinten, akkor a LOEC becslését az átlagos specifikus növekedési ráták varianciaanalízisére (ANOVA) lehet alapozni (lásd 2.1. szakasz), amit egy célszerű módszer alkalmazása követ (pl. a Dunnett- vagy a Williams-vizsgálat (13) (14) (15) (22)), amellyel az átlagos „r” értéket lehet összevetni valamennyi koncentrációszint esetében a kontrollszámítások átlagával azon legalacsonyabb koncentráció megállapítására, amelyben 0,05-ös valószínűségi szinten szignifikáns a változás. Amennyiben nem teljesülnek a paraméteres módszerre nézve megkövetelt feltételek – nem normál eloszlás (pl. Shapiro-Wilk-próba) vagy heterogén variancia (Bartlett-próba) – akkor fontolóra lehet venni az adatok varianciahomogenizálása érdekében történő transzformálását az ANOVA elemzés elvégzése előtt, illetve egy súlyozott ANOVA elemzés végrehajtását.

Amennyiben a vizsgálat során nem használnak párhuzamos tartályokat valamennyi koncentrációszinten, akkor a tartályokra alapozott ANOVA elemzés érzéketlen vagy kivitelezhetetlen lesz. Ebben a helyzetben elfogadható kompromisszumot jelent, ha az ANOVA elemzést az egyes halegyedekre vonatkozó r_3 pszeudospecifikus növekedési ütemre alapozva végzik el.

Ekkor az egyes kísérleti koncentrációkhoz tartozó átlagos r_3 értékeket össze lehet hasonlítani a kontrollokra vonatkozó átlagos r_3 értékkel. A LOEC értékét ekkor a korábbiakban említettekkel azonos módon lehet megállapítani. Fel kell ismerni, hogy e módszer nem veszi figyelembe a tartályok közötti variabilitást – és nem is nyújt védelmet ellene – azon túl, amit az egyes halegyedek közötti variabilitás alapján lehet beszámítani. A tapasztalat azonban azt mutatta (9), hogy a tartályok közötti variabilitás nagyon csekély volt a tartályon belüli (azaz egyedek közötti) variabilitáshoz képest. Amennyiben egyes halegyedeket nem vonnak be az elemzésbe, akkor a kívül eső értékek azonosítására szolgáló módszert és alkalmazásának igazolását biztosítani kell.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az eredményeket kellő óvatossággal kell értelmezni, amennyiben a kísérleti oldatokban mért mérgezőanyag-koncentrációk az analitikai módszer észlelési határa közelében lévő szinteket érnek el, vagy – félstatikus (megújítási) vizsgálatok esetében – amennyiben a vizsgált anyag koncentrációja csökken az oldat frissen elkészített állapota és a megújítás előtti állapota között.

2.3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálatról készített jelentésben ki kell térni az alábbi információkra:

▼B

2.3.1. **A vizsgált anyag**

— a vizsgált anyag fizikai jellege és fontos fizikai-kémiai tulajdonságai,

— a kémiai azonosítási adatok, beleértve a kémiai tisztaságot és – adott esetben – a vizsgált anyag mennyiségének számszerűsítésére szolgáló analitikai módszert.

2.3.2. **A vizsgált fajok**

— lehetőség szerint a tudományos név,

— törzs, méret, szállító, esetleges előzetes kezelés stb.

2.3.3. **Vizsgálati körülmények**

— az alkalmazott vizsgálati eljárás (pl. félstatikus/megújítási, átfolyási, telepítési tömeg és sűrűség stb.),

— a vizsgálat kialakítása (pl. a tesztedények száma, a kísérleti koncentrációk és ismétlések, a halak tartályonként létszáma),

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni),

— a névleges kísérleti koncentrációk, a mért értékek átlaga és szórása a kísérleti tartályokban, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések valóban az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak,

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, lúgosság, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradványklór-szintek (amennyiben mérik), összes szerves szén, szuszpendált szilárd anyagok, a vizsgálati közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat,

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldottoxigén-koncentráció,

— részletes információk a tápanyagról (pl. a halláp típusa, beszerzési forrása, az adagolt mennyiség és az adagolás gyakorisága).

2.3.4. **Eredmények**

— annak bizonyítása, hogy a kontrollok teljesítették a túlélés érvényességi kritériumait, valamint adatok a különböző kísérleti koncentrációkban bekövetkező mortalitásról,

— a felhasznált statisztikai analitikai módszerek és hogy a statisztika párhuzamos vizsgálatok eredményein vagy az egyedekre vonatkozó adatokon alapul-e, az adatok kezelése és a felhasznált módszerek célszerűségének igazolása,

— táblázatokba foglalt adatok a halak egyedi és átlagtömegéről a 0., 14. (amennyiben mérik) és a 28. napon mérve, az átlagos specifikus növekedési ráta vagy a pszeudospecifikus növekedési ráta értékei a 0–28. nap időszakában vagy lehetőség szerint a 0–14. és a 14–28. nap időszakaiban,

— a statisztikai elemzés eredményei (azaz regressziós analízis vagy ANOVA) lehetőleg táblázatos és grafikus formában bemutatva, valamint a LOEC ($p = 0,05$) és a NOEC vagy lehetőség szerint az EC_x értékei, adott esetben a szórás feltüntetésével,

▼B

— a halak szokatlan reakcióinak és a vizsgált anyag által előidézett bármely látható elváltozás előfordulása.

3. SZAKIRODALOM

(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. 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, pp. 231-236.

(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, Toki o. (1975). Series of stock cultures in biological fielásd 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. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(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 l/RM/28, 81 pp.

(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 of fish. 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, pp. 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, pp. 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 pp.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 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, No 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, Minnesota. 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

1. függelék

A VIZSGÁLATHOZ JAVASOLT HALFAJOK ÉS A MEGFELELŐ VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK

Fajok	A vizsgálathoz javasolt hőmérséklet-tartomány (°C)	Megvilágítási időszak (óra)	Halak javasolt kiindulási tömege (gramm)	Megkövetelt mérési pontosság	Betelepítési tömeg (g/l)	Betelepítési sűrűség (literenként)	Táplálék	Vizsgált idő tartama (nap)
Javasolt fajok:								
Oncorhynchus mykiss Szivárványos pisztráng	12,5—16,0	12–16	1–5	Legközelebbi 100 mg	1,2—2,0	4	Lazacivadékok különleges szárított tápláléka	>28
Más, jól dokumentált fajok								
Danio rerio Zebrahal	21–25	12–16	0,050—0,100	Legközelebbi 1 mg	0,2—1,0	5–10	Élő táplálék *(Brachionus artemia)*	>28
Oryzias latipes Rizshal (Medaka)	21–25	12–16	0,050—0,100	Legközelebbi 1 mg	0,2—1,0	5–20	Élő táplálék *(Brachionus Artemia)*	>28

▼B

2. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

ANYAG MEGNEVEZÉSE	KONCENTRÁCIÓÉRTÉKEK
Lebegőanyag	< 20 mg/liter
Összes szerves szén	< 2 mg/liter
Nem ionizált ammónia	< 1 μg/liter
Maradek klór	< 10 μg/liter
Összes szerves foszfortartalmú peszticid	< 50 ng/liter
Összes szerves klórtartalmú peszticid pluszpoliklórozott bifenilek	< 50 ng/liter
Összes szerves klór	< 25 ng/liter

▼B

3. függelék

Toxicitási vizsgálatok céljaira alkalmas koncentrációértékek logaritmikus sorozatai (9)

Oszlop (koncentrációértékek száma 100 és 10 vagy 10 és 1 között) (*)						
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

(*) Egy oszlopból öt (vagy több) egymást követő koncentrációértéket lehet kiválasztani. Az x oszlopban szereplő koncentrációértékek közötti középértékek a (2x + 1) oszlopban találhatók meg. A felsorolt értékek mennyiség vagy tömegszázalék (mg/liter vagy mikrogramm/liter) formájában kifejezett koncentrációértékeket jelenthetnek. Az értékeket adott esetben a 10 bármely hatványával meg lehet szorozni vagy el lehet osztani. Az 1. oszlop adatai akkor használhatók, ha jelentős a bizonytalanság a toxicitás szintjét illetően.

▼B

C.15. RÖVID TÁVÚ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT HALEMBRIÓKKAL ÉS HALLÁRVÁKKAL

1. MÓDSZER

E rövid távú toxicitásvizsgálati módszer az OECD TG 212 (1998) megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

A halembriókon és hallárvákon végzett rövid távú toxicitásvizsgálat olyan rövid távú vizsgálat, amely az újonnan megtermékenyült petétől a szikzacskós ivadéki állapot végéig terjedő fejlődési szakaszokat fedi le. Az embrió- és lárvateszt során táplálék adagolására nem kerül sor, és ezért a vizsgálatot addig kell befejezni, amíg az ivadékokat még táplálja a saját szikzacskójuk.

A vizsgálata célja meghatározni a vizsgált fajokra és azok fejlődési szakaszaira vegyi anyagok által gyakorolt letális és – korlátozott mértékig – a szubletális hatásokat. E vizsgálat hasznos információkkal szolgálhat, amennyiben a) hidat képez a letális és szubletális vizsgálatok között; b) elővizsgálatként alkalmazható a korai életciklusra vonatkozó valamennyi vagy krónikus toxicitási vizsgálatok esetében; és c) olyan fajok vizsgálatára is felhasználható, amelyek tenyésztési módszerei nem kellően fejlettek ahhoz, hogy lefedjék az endogén táplálkozásról az exogén jellegűre való váltás időszakát.

Emlékeztetni kell arra, hogy csak a halak életciklusának minden szakaszát felölelő vizsgálatok képesek általában pontos becslést adni a vegyi anyagok halakra gyakorolt krónikus toxicitásáról, továbbá hogy az egyes életszakaszokban alkalmazott csökkentett expozíció csökkentheti a teszt érzékenységét, s ezért a krónikus toxicitás mértékének alábecsléséhez vezethet. Ezért várható, hogy a halembriókon és hallárvákon végzett toxicitási vizsgálat kevésbé lesz érzékeny, mint a halak korai életciklusát vizsgáló valamennyi vizsgálat, különösen ami a lipofil (log P_{ow} > 4), illetve a mérgező hatásukat sajátságos módon kifejtő vegyi anyagokat illeti. A kétféle vizsgálat között az érzékenység tekintetében mutatkozó kisebb különbségek a nem specifikus, narkotikus hatásmechanizmusú vegyi anyagok esetében várhatók (1).

E vizsgálat publikálását megelőzően a halembriók és hallárvák körében a legtöbb tapasztalatot az édesvízi *Danio rerio* Hamilton-Buchanan nevű hallal (Teleostei, Cyprinidae, közönséges nevén zebrahal) szerezték. Ezért a vizsgálatnak az e fajra vonatkozó végrehajtásáról az 1. függelék részletes útmutatást nyújt. Ez természetesen nem zárja ki olyan más fajok használatát, amelyekre nézve szintén ismertek tapasztalatok (lásd az IA. és IB. táblázatot).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC): a vizsgált anyag azon legalacsonyabb kísérleti koncentrációja, amelynél a kontrollal összevetve még megfigyelhető az anyag egy jelentős hatása ($p < 0,05$). Azonban a LOEC fölötti koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább azonos a LOEC-nél megfigyelttel, vagy súlyosabb annál.

Megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC): a közvetlenül a LOEC alatti kísérleti koncentráció.

▼B

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A halembriók és hallárvák a vízben oldott vizsgált anyag széles tartományon belüli koncentrációinak vannak kitéve. A tervezés során választani lehet a félstatikus és az átfolyási eljárás közül. A választást a vizsgált anyag jellege határozza meg. A vizsgálat azzal kezdődik, hogy frissen megtermékenyített petéket helyeznek a kísérleti kamrákba, és akkor ér véget, amikor a kísérleti kamrák valamelyikében bármelyik lárva szikzacskója teljesen felszívódik, vagy amennyiben elkezdődik a kontrollcsoportokban az éhezés miatti pusztulás. A letális és szubletális hatásokat ki kell értékelni, és össze kell hasonlítani a kontrollcsoportbeli értékekkel, a legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC), és ennek kapcsán a megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) meghatározása érdekében. Alternatív módon a hatásokat egy regressziós modellel lehet elemezni azon koncentráció megállapítása érdekében, amely egy adott százaléknyi hatást vált ki (azaz LC/EC_x, C/EC_x, ahol az x egy meghatározott százalék mértékű hatás).

1.4. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

Rendelkezésre kell hogy álljanak az e vizsgálat céljára kiválasztott fajokkal lehetőleg korábban már végzett, akut toxicitási vizsgálatok eredményei (lásd a C.1. vizsgálati módszert). Az eredmények hasznosak lehetnek a korai életszakaszokat vizsgáló vizsgálat során alkalmazandó kísérleti koncentrációk megfelelő tartományának kiválasztásában. Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldhatóságának (ideértve a vizsgálathoz felhasznált vizet is) és gőznyomásának értékeit. Megbízható analitikai módszerrel kell rendelkezni a kísérleti oldatokban lévő vizsgált anyag számszerűsítésére, amelynek pontossága és észlelésének korlátai ismertek és dokumentáltak.

A vizsgálati körülmények megállapítása tekintetében hasznos információk közé tartozik még a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, stabilitása fénnyel, illetve a vizsgálat körülményeivel szemben, a pKa és P_{ow} értékek, valamint a gyors biológiai lebomlásra vonatkozó vizsgálatok eredményei (lásd a C.4. vizsgálati módszert).

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi feltételeknek kell teljesülniük:

— a kontrollcsoportokban és – amennyiben szükséges – az oldószeres kontrollokban a megtermékenyített peték összesített túlélési arányszámai nagyobbak a 2. és 3. függelékben meghatározott határértékeknél vagy egyenlők azokkal,

— a kísérlet során az oldott oxigén koncentrációját mindvégig legalább a levegő telítettségi érték (ASV) 60 és 100 %-a között kell tartani,

— a víz hőmérséklete a vizsgálat során a tesztedényekben, illetve bármelyik két egymást követő nap között 1,5 °C-nál nagyobb mértékben nem változhat, és a hőmérsékletet a vizsgált fajra nézve meghatározott hőmérséklet-tartományon belül kell tartani (lásd 2. és 3. függelék).

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Tesztedények**

Üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból készült edényeket kell használni. Az edényeknek elég nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy lehetővé tegyék a betelepítési arány betartását (lásd 1.7.1.2. szakasz). Javasolt a tesztedények véletlenszerű elhelyezése a vizsgálatra kijelölt területen. A teljesen véletlenszerű elrendezéssel szemben célszerűbb a véletlenszerűen elhelyezett blokkok alkalmazása, ahol mindegyik blokkban képviselve van mindegyik kezelési mód, amennyiben léteznek a blokkelrendezés révén ellenőrizhető, szisztematikusan érvényesülő hatások a laboratóriumban. Amennyiben ilyen blokkokba rendezésre kerül sor, akkor ennek tényét az adatok későbbi elemzései során figyelembe kell venni. A tesztedényeket védeni kell a nem kívánt zavaró hatásoktól.

1.6.2. **A halfajok kiválasztása**

A vizsgálat céljaira javasolt halfajok listáját az 1A. táblázat tartalmazza. Ez nem zárja ki más fajok használatát (amelyre példák az 1B. táblázatban találhatók), de az eljárást ekkor esetleg módosítani kell a megfelelő feltételek biztosítása érdekében. Ebben az esetben a jelentésnek tartalmaznia kell a fajok és a kísérleti módszer kiválasztásának indoklását.

1.6.3. **A halivadék tartása**

A halivadék megfelelő feltételek melletti tartására vonatkozó részletek az OECD TG 210 jelű dokumentumban ([1]) és a (2) (3) (4) (5) (6) számú szakirodalmi hivatkozásban találhatók.

1.6.4. **Az embriók és lárvák kezelése**

Az embriókat és lárvákat a fő tartályon belül elhelyezett, oldalaiknál vagy végeiknél lukacsos kisebb edényekben lehet kitenni a tartályon átfolyó vizsgált oldat hatásának. E kisebb tartályokban a turbulenciamentes áramlást úgy lehet elérni, hogy az edényeket egy olyan karra függesztjük fel, amely fel-le mozgatható, ügyelve, hogy az organizmusok mindig a vizsgált oldatban legyenek; egy szifonzáras öblítőrendszert is be lehet építeni. Lazacfélék megtermékenyített petéit olyan rácsokon vagy hálókon lehet tartani, amelyek nyílásai elég nagyok ahhoz, hogy a petékből kibújó lárvák átessenek rajtuk. A teljes napi megújítással járó félstatikus vizsgálatok során Pasteur-pipettákat lehet használni az embriók és lárvák kiemelésére (lásd 1.6.6. szakasz).

Amennyiben a peték fő kísérleti tartályon belüli tartására kis tartályokat, rácsokat vagy hálókat használnak, akkor a lárvák kikelése után ezeket a visszatartó eszközöket el kell távolítani ([1]), kivéve, ha a halak szökésének megakadályozása érdekében van rájuk szükség. Amennyiben szükség lenne a lárvák áthelyezésére, akkor azokat nem szabad kitenni a levegő hatásának, és nem szabad hálót használni halaknak a peték tárolására használt tartályból való kiemelésére (ilyen elővigyázatosságra nincs feltétlenül szükség egyes kevésbé sérülékeny halfajok, pl. ponty esetén). Az ilyen áthelyezés időzítése az egyes fajoktól függően változik, és nincs mindig szükség rá. A félstatikus módszernél főzőpoharakat vagy alacsony falú edényeket lehet használni, és – amennyiben szükséges – ezeket a főzőpohár alja fölé kismértékben emelt hálóval lehet felszerelni. Amennyiben az ilyen tartóedények térfogata megfelelő a betelepítési szinttel kapcsolatos követelmények teljesítéséhez (lásd 1.7.1.2. szakasz), akkor nincs is feltétlenül szükség az embriók vagy lárvák áthelyezésére.

([1]) OECD, Párizs, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test”.

▼B

1.6.5. **Víz**

A vizsgálathoz bármely olyan víz felhasználható, amely megfelel a 4. függelékben az elfogadható minőségű hígítóvízre vonatkozó kémiai jellemzőknek, és amelyben a vizsgálatnak alávetett állatfajok legalább olyan jó túlélési eredményeket mutatnak, mint ami a 2. és 3. függelékben le van írva. A víz minőségét a kísérlet során mindvégig azonos szinten kell tartani. A víz pH-értéke az adott vizsgálat során mindvégig csak ± 0,5 pH-egységgel térhet el a kiindulási értéktől. Annak biztosítására, hogy a hígítóvíz ne gyakoroljon nem kívánt hatást a vizsgálat eredményeire (pl. mert komplexet képez a tesztanyaggal), illetve ne gyakoroljon kedvezőtlen hatásokat az ivadékállomány teljesítményére, időnként mintákat kell venni elemzésre. Mérni kell a következő összetevőket: a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a fontosabb anionok és kationok (pl. Ca, Mg, Na, K, Cl és SO_4), a peszticidek (pl. összes szervesfoszfor- és összes szervesklór-tartalmú peszticid), az összes szerves szén és a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációját, például háromhavonta, amennyiben a hígítóvízről tudott, hogy viszonylag állandó minőségű. Amennyiben a víz minősége bizonyítottan konstans legalább egy éven keresztül, akkor ritkábban, nagyobb időközökkel is lehet ellenőrző méréseket végezni (pl. csak hathavonta egyszer).

1.6.6. **Vizsgált oldatok**

A kiválasztott koncentrációjú vizsgált oldatok a törzsoldat hígításával készíthetők el.

A törzsoldatot lehetőleg a vizsgált anyagnak a hígítóvízbe, mechanikai eszközök (pl. keverő, ultrahang) segítségével történő bekeverésével vagy hozzákeverésével kell elkészíteni. Telítési oszlopok (oldhatósági oszlopok) is felhasználhatók a megfelelő koncentrációjú törzsoldat elkészítéséhez. A lehetőségekhez mérten kerülni kell az oldószerek vagy diszpergálószerek használatát, bár ilyen vegyületekre egyes esetekben szükség lehet egy megfelelő töménységű törzsoldat előállításához. Alkalmas oldószer lehet az aceton, etanol, metanol, dimetil-formamid és a trietilén-glikol. Alkalmas diszpergálószer lehet például: a Cremophor RH40, Tween 80, Metilcellulóz 0,01 % és a HCO-40. Kellő figyelemmel kell eljárni a biológiailag gyorsan lebomló szerek (pl. aceton) és/vagy az erősen illékony összetevők használatakor, mivel ezek az átfolyási vizsgálatok során fellépő bakteriális szintetikus aktivitás miatt okozhatnak gondokat. Amennyiben diszpergálószereket kell használni, azok nem gyakorolhatnak lényeges hatásokat a túlélésre, és láthatóan kedvezőtlen hatásokat a korai életszakaszban, amit csak egy oldószerrel végzett ellenőrző vizsgálat tárhat fel. Törekedni kell azonban az ilyen anyagok használatának kerülésére.

Félstatikus vizsgálatok során két különböző vízcseremódszer közül lehet választani: i. új vizsgált oldatokat készítenek tiszta edényekben és a kísérlet korábbi fázisait túlélő petéket és lárvákat a régi oldat kis mennyiségével együtt kíméletesen áttelepítik az új edényekbe, kerülve az élőlények érintkezését a levegővel; vagy ii. az organizmusokat visszatartják az edényben, miközben a vizsgálat céljaira használt víz egy részét (legalább háromnegyedét) lecserélik. A közeg megújításának gyakorisága a vizsgált anyag stabilitásától függ, azonban ajánlott a víz napi cseréje. Amennyiben a korábbi stabilitási vizsgálatok (lásd 1.4. szakasz) arra mutattak rá, hogy nem stabil a vizsgált anyag koncentrációja (azaz kívül esik a névleges koncentráció 80–120 %-os tartományán, vagy a kiinduláskor mért koncentráció 80 %-a alá csökken) a megújítási időszak során, akkor fontolóra kell venni egy átfolyási vizsgálat lefolytatását. Minden esetben gondosan ügyelni kell arra, hogy elkerüljük a lárvákat érő stresszhatásokat a vízcsereműveletek során.

▼B

Az átfolyási vizsgálatok céljára olyan rendszert kell használni, amely folyamatosan biztosítja és hígítja a vizsgált anyag törzsoldatát (pl. egy adagolószivattyú, proporcionális hígító vagy egy telítőrendszer), annak érdekében, hogy a kísérleti kamrákhoz eljusson a hígítóoldat. A kísérlet során megfelelő időnként – lehetőleg naponta – ellenőrizni kell a törzsoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét, amelynek értéke nem változhat 10 %-nál nagyobb mértékben a vizsgálat során. A 24 óránként legalább öt kísérleti kamrányi vízcserének megfelelő áramlási sebességet találták megfelelőnek.

1.7 ELJÁRÁS

A szakirodalom hasznos információkat tartalmaz a halembriók és hallárvák toxicitási vizsgálatai során mutatott teljesítményéről, amelyek közül néhányat példaként e szövegrész szakirodalmi hivatkozásai tartalmaznak (7) (8) (9).

1.7.1. **Expozíciós feltételek**

1.7.1.1. *Időtartam*

A vizsgálatot lehetőleg a peték megtermékenyítését követő 30 percen belül meg kell kezdeni. Az embriókat a csírakorong osztódásának kezdete előtt, vagy közvetlenül utána, vagy bármely időpontban, mielőtt a gasztrulastádium kialakulna, a tesztoldatba kell helyezni. A kereskedelmi szállítótól kapott peték esetében nincs mód a vizsgálat azonnali megkezdésére a megtermékenyítés után. Mivel a kezdés késleltetése komolyan befolyásolja a vizsgálat érzékenységét, a vizsgálatot a megtermékenyítést követő nyolc órán belül mindenképpen el kell kezdeni. Mivel az expozíciós idő alatt a lárvák nem kapnak táplálékot, a vizsgálatot még az előtt be kell fejezni, mielőtt a kísérleti kamrák valamelyikében bármelyik lárva szikzacskója teljesen felszívódik, vagy elkezdődik a kontrollcsoportokban az éhezés miatti pusztulás. Az időtartam a használt fajtól függ. Néhány javasolt időtartam a 2. és 3. függelékben található.

1.7.1.2. *Betelepítés*

A vizsgálat kezdetén használt megtermékenyített peték számának elegendőnek kell lennie a statisztikai követelmények kielégítéséhez. A petéket véletlenszerűen kell elosztani a különböző kezelési módok között, és koncentrációszintenként legalább három párhuzamos edény között egyenletesen elosztott, tartályonként legalább 30 megtermékenyített petét kell behelyezni (illetve törekedni kell a lehető legegyenletesebb elosztásra, mert egyes fajok esetében nehéz a teljesen egyenlő adagok kimérése). A betelepítési arányt (a vizsgált oldat egységnyi mennyiségére jutó biomassza) mindenképpen annyira alacsonyan kell tartani, hogy a vízben oldott oxigén koncentrációját külön levegőztetés nélkül is a levegőtelítettségi érték legalább 60 %-ának megfelelő szinten lehessen tartani. Az átfolyási vizsgálatok esetében javasolt a 24 órára számítottan 0,5 g/liternél, illetve bármely időpontban 5 g/liter oldatnál nem magasabb betelepítési arány tartása (2).

1.7.1.3. *Megvilágítás és hőmérséklet*

A megvilágítási időszakokat és a víz hőmérsékletét a vizsgált halfajok sajátosságaihoz kell igazítani (lásd 2. és 3. függelék). A hőmérséklet alakulásának figyelemmel kíséréséhez célszerű lehet egy további tesztedény beiktatása.

▼B

1.7.2. **Vizsgálati koncentrációk**

A vizsgált anyagból általában ötféle, egy 3.2 értékű konstans tényezőt meg nem haladó osztások szerint beállított koncentráció használata szükséges. A tényleges vizsgálatok során a kísérleti koncentrációk tartományának kiválasztásakor célszerű mérlegelni az LC50-et az expozíciós időszakhoz viszonyító görbét. Egyes esetekben célszerű lehet az ötnél kevesebb koncentrációszint alkalmazása (pl. a határérték-vizsgálatoknál), valamint a szűkebb koncentráció-intervallumok használata. Az ötnél kevesebb koncentrációszint alkalmazását indokolni kell. Nem szükséges vizsgálni a vizsgált anyag koncentrációját a 96 óránál LC50-nél vagy a 100 mg/l értéknél magasabb értékek esetében aszerint, hogy melyik érték az alacsonyabb. A vizsgált anyagokat a vizsgálathoz használt vízben való oldhatóságuk határértéke feletti tartományban nem kell vizsgálni.

Amennyiben diszpergálószert használnak a vizsgált oldat elkészítéséhez (lásd 1.6.6. szakasz), az oldat végső koncentrációja nem lehet több, mint 0,1 ml/liter, és azonosnak kell lennie az összes vizsgálati edényben.

1.7.3. **Ellenőrzések**

A normál vizsgált sorozatokon kívül egy hígítóvíz-kontrolltartályt (szükség szerint két példányban) és – amennyiben célszerű – egy, a diszpergálószert tartalmazó kontrolltartályt kell működtetni.

1.7.4. **Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága**

A vizsgálat során a vizsgált anyag koncentrációját rendszeres időközönként meg kell állapítani.

A félstatikus vizsgálatok során, amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belülre várhatók (azaz a 80–120 %-os sávon belül; lásd 1.4. és 1.6.6. szakasz), akkor minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb kísérleti koncentrációk elemzése, a frissen készült anyagon és közvetlenül a vízcsere előtt legalább három, a vizsgálat során időben egyenletesen elosztott alkalommal (azaz az elemzéseket az azonos oldatból vett mintán kell végezni, amikor az oldat frissen készült és a megújítás alkalmával).

Amennyiben a vizsgált anyag koncentrációértékei várhatóan nem maradnak a névleges értékek ± 20 százalékos sávján belül (a vizsgált anyag stabilitási adatai alapján), akkor javasolt az összes koncentráció elemzése ugyanazon eljárásrendnek megfelelően (legalább három, a vizsgálat során időben egyenletesen elosztott alkalommal). A vizsgált anyag koncentrációértékeinek a vízcserét megelőző meghatározását minden egyes kísérleti koncentráció esetében csak egyetlen párhuzamos tartályra nézve kell elvégezni. A meghatározások között legfeljebb hét nap telhet el. Az eredményeket célszerű a ténylegesen mért koncentrációértékekre alapozni. Amennyiben azonban megfelelő bizonyítékokkal támasztható alá, hogy az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációját sikerül a vizsgálatok során mindvégig a névleges értékek vagy a kiindulási koncentráció ± 20 százalékos sávján belül tartani, akkor az eredményeket a névleges vagy a mért kezdeti értékekre is lehet alapozni.

Az átfolyási vizsgálat esetében megfelelő lehet a félstatikus vizsgálatokkal kapcsolatban leírthoz hasonló mintavételi eljárás alkalmazása (azonban a „régi” oldatok mérése ebben az esetben nem alkalmazható). Amennyiben azonban a vizsgálat időtartama több mint hét nap, tanácsos a mintavételek számát az első héten növelni (pl. három méréssorozatra), a koncentrációértékek stabilan tartásának biztosítása érdekében.

▼B

Szükség lehet a minták centrifugálására vagy szűrésére (0,45 mikron pórusméretű szűrőbetétet használva). Mivel a centrifugálás és a szűrés sem képes mindenkor arra, hogy szétválassza a vizsgált anyag biológiailag nem használható részét a biológiailag használhatótól, a mintákat nem feltétlenül szükséges ilyen kezeléseknek alávetni.

A vizsgálat során valamennyi kísérleti tartályban mérni kell az oldottoxigén-koncentrációt, a pH-értéket és a hőmérsékletet. A vízkeménységet, a lúgosságot és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) mérni kell a kontrollmintákban és a legmagasabb koncentrációjú közeget tartalmazó egyik edényben. Minimális követelményként az oldottoxigén-koncentrációt és a sótartalmat (amennyiben ez mérvadó szempont) három alkalommal kell mérni (a vizsgálat elején, közepén és végén). A félstatikus vizsgálatok esetében javasolt az oldott oxigén gyakoribb mérése, lehetőleg minden vízcsere előtt és után, de hetente legalább egyszer. A pH-értéket a félstatikus vizsgálatok esetében minden vízcsere elején és végén mérni kell, az átfolyási vizsgálatok esetében pedig legalább hetente egyszer. A keménységet vizsgálatonként egyszer kell megmérni. A hőmérsékletet naponta mérni kell, és változásait lehetőleg legalább egy vizsgálati edényben folyamatosan figyelemmel kell kísérni.

1.7.5. **Megfigyelések**

1.7.5.1. *Az embrionális fejlődés fázisa*

A vizsgált anyag hatásának való expozíció kezdetén az embrionális (gasztrula) fejlődési fázis azonosítását a lehető legpontosabban kell elvégezni. Erre a megfelelően tartósított és megtisztított peték egy reprezentatív mintája használható. Az embrionális fázisok leírását és illusztrációját illetően még a szakirodalom is felhasználható (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *A peték kikelése és túlélése*

A kikelés és túlélés folyamatait naponta egyszer meg kell figyelni és a tapasztalt számadatokat fel kell jegyezni. A vizsgálat elején hasznos lehet az ennél gyakoribb megfigyelések végzése (pl. az első három órában félóránként), mivel egyes esetekben a túlélési idők hossza fontosabb lehet az elhullások számánál (pl. amennyiben akut toxikus hatások figyelhetők meg). Az elpusztult embriókat és lárvákat észlelésükkor azonnal el kell távolítani, mert gyorsan bomlásnak indulnak. Az elhullott egyedek kiemelésekor különös gonddal kell kerülni a szomszédos embriók/lárvák megütését, vagy fizikai megsértését, mivel e szervezetek igen sérülékenyek és érzékenyek. Az elhullás kritériumai az életciklus szakaszától függően változnak:

— **peték**: különösen a korai szakaszokban az áttetszőség jelentős csökkenése és színbeli elváltozás, amit a fehérjék koagulációja és/vagy kicsapódása okoz, ami fehér opálos színt eredményez,

— **embriók**: a testmozgás és/vagy szívverés hiánya, és/vagy opálos elszíneződés olyan fajoknál, amelyek embriói normál körülmények között áttetszők,

— **lárvák**: mozdulatlanság és/vagy légzőmozgások és/vagy a szívverés hiánya, és/vagy a központi idegrendszer opálos elszíneződése és/vagy reakció elmaradása fizikai ingerekre.

▼B

1.7.5.3. *Rendellenes küllem*

A vizsgálat időtartamától és a leírt rendellenesség jellegétől függően megfelelő időközönként fel kell jegyezni a rendellenes testformájú és/vagy pigmentációjú lárvák számát, illetve a szikzacskó felszívódásának mértékét. Meg kell jegyezni, hogy rendellenesen fejlődött embriók és lárvák természetes körülmények között is előfordulnak, és egyes fajok esetében a kontrollcsoportban mennyiségük akár néhány százalékot is elérhet. A rendellenesen fejlődött állatokat csak elpusztulásukkor kell a kísérleti edényből eltávolítani.

1.7.5.4. *Rendellenes viselkedés*

A rendellenes viselkedésmódokat – pl. hiperventilláció, koordinálatlan úszásmód és a fajra nem jellemző nyugalom – a vizsgálat teljes időtartamától függő időközönként fel kell jegyezni. Bár e hatásokat nehéz számszerűsíteni, de amennyiben megfigyelhetők, akkor segíthetnek a mortalitási adatok értelmezésében, azaz információkkal szolgálnak az anyag toxikus hatásmechanizmusáról.

1.7.5.5. *Hosszúság*

A vizsgálat végén ajánlott az egyedi hosszúságok megmérése: szabványos, villás elágazású vagy teljes hosszúságot lehet mérni. Amennyiben azonban a farokuszonyon rothadás vagy kimaródás, pusztulás jelei fordulnak elő, akkor a szabványos hosszakat kell használni. Általánosságban, egy jól végrehajtott vizsgálatban a párhuzamos kontrollok között előforduló hosszúságeltérések együtthatója < 20 % kell hogy legyen.

1.7.5.6. *A lárvák tömege*

A vizsgálat végén le lehet mérni az egyedek tömegét is; a száraztömeg-adatok (24 órán át 60 °C-on tartva) célszerűbbek az (itatóspapírral szárított) nedvestömeg-meghatározásnál. Általánosságban, egy jól végrehajtott vizsgálatban a párhuzamos kontrollok között előforduló súlyeltérések együtthatója < 20 % kell hogy legyen.

E megfigyelések eredménye az alábbi adatok némelyike vagy mindegyike, amelyek a statisztikai elemzések céljára rendelkezésre állnak majd:

— kumulált mortalitás,

— az egészséges lárvák száma a vizsgálat végén,

— a kikelés kezdetéig és végéig eltelt idő (azaz 90 %-os kikelés minden ismétlésben),

— a napi lárvakikelések száma,

— a vizsgálat végén túlélő állatok hosszúsága (és tömege),

— a deformált vagy rendellenes küllemű lárvák száma,

— a rendellenes viselkedésmódot mutató lárvák száma.

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgálat kialakításába és eredményei elemzésébe ajánlott egy statisztikus bevonása, mivel e vizsgálati módszer jelentős eltéréseknek ad teret a kísérletek menetének kialakításában, például ami a tesztkamrák, a kísérleti koncentrációk számát vagy a megtermékenyített peték induláskori számát és a mért paraméterek eltéréseit illeti. A vizsgálat kialakításában rejlő választási lehetőségekre tekintettel, a statisztikai módszerre vonatkozó külön eligazítás itt nem szerepel.

A LOEC és NOEC értékeinek becsléséhez szükséges a párhuzamos eredmények közti eltérések analízise (ANOVA) vagy a kontingenciatáblázatos módszerek alkalmazása. Az egyedi koncentrációszintek és a kontrollcsoport szintjei esetében kapott eredmények közötti összetett összehasonlítás érdekében hasznosnak bizonyulhat a Dunnett-módszer (12) (13). További hasznos példák is rendelkezésre állnak (14) (15). Ki kell számolni és jegyzőkönyvezni kell az ANOVA vagy más eljárások használatával feltárható hatások (azaz a vizsgálat teljesítőképességének) mértékét. Megjegyzendő, hogy nem minden, az 1.7.5.6. szakaszban felsorolt megfigyelés alkalmas az ANOVA használatával történő statisztikai elemzés céljaira. így például a kumulált mortalitást és a vizsgálat végén talált egészséges lárvák számát a probit módszerek használatával lehet elemezni.

Amennyiben az LC/EC_x értékeket kell megbecsülni, akkor megfelelő – pl. logisztikai – görbé(ke)t kell a vizsgált adatokhoz illeszteni olyan statisztikai módszerek használatával, mint amilyen a legkisebb négyzetek módszere vagy a nem lineáris legkisebb négyzetek módszere. A görbé(ke)t úgy kell paraméterezni, hogy az érdeklődésre számot tartó LC/EC_x értéket és annak standard hibáját közvetlenül lehessen megbecsülni. Ez nagymértékben megkönnyíti az LC/EC_x körüli konfidencia-határértékek kiszámítását. Kivéve, ha nyomós érvek szólnak a különböző konfidenciaszintek alkalmazása mellett, akkor kétoldali 95 %-os konfidenciaszintet célszerű meghatározni. Az illesztési eljárásnak lehetőleg eszközként kell szolgálnia az illeszkedés hiánya jelentőségének felmérésére. A görbék illesztésére grafikus módszerek is felhasználhatók. A regressziós elemzés az 1.7.5.6. szakaszban felsorolt összes megfigyelés elemzésére megfelelő.

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az eredményeket kellő óvatossággal kell értelmezni, amennyiben a kísérleti oldatokban mért mérgezőanyag-koncentrációk az analitikai módszer észlelési határához közel lévő szinteket érnek el. A vizsgált anyag vízoldhatóságát meghaladó koncentrációértékekre vonatkozó eredmények értelmezésekor kellő óvatossággal kell eljárni.

2.3. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

2.3.1. **A vizsgált anyag**

— a vizsgált anyag fizikai jellege és fizikai-kémiai tulajdonságai,

— a kémiai azonosítási adatok, beleértve a kémiai tisztaságot és – adott esetben – a vizsgált anyag mennyiségének számszerűsítésére szolgáló analitikai módszer.

▼B

2.3.2. **A vizsgált fajok**

— tudományos név, törzs, az ikrás nőstények száma (azaz hány nőstényt használtak a kísérlethez szükséges peteszám előállításához), szállító, valamint a megtermékenyített peték begyűjtésének módszere és az ezt követő kezelése.

2.3.3. **Vizsgálati körülmények**

— az alkalmazott vizsgálati eljárás/módszer (pl. félstatikus vagy átfolyási, a megtermékenyítéstől a vizsgálat elkezdéséig eltelt idő, betelepítés stb.),

— megvilágítási periódus(ok),

— a vizsgálat kialakítása (pl. a tesztedények és párhuzamosok száma, az embriók létszáma a párhuzamos edényekben),

— a törzsoldat elkészítésének módszere és a vízcsere gyakorisága (az esetleg használt diszpergálószer nevét és koncentrációját meg kell adni),

— a névleges kísérleti koncentrációk, a mért értékek és azok átlaga és szórása a tesztedényekben, az ilyen adatok megszerzésének módszerei és – amennyiben a vizsgált anyag vízben oldható a vizsgált koncentrációértékek szintje alatt is – bizonyítékok annak alátámasztására, hogy a mérések valóban az oldatban lévő vizsgált anyag koncentrációszintjeire vonatkoznak,

— a hígítóvíz jellemzői: pH-érték, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradványklórszintek (amennyiben mérik), összes szervesszén-tartalom, szuszpendált szilárd anyagok, a vizsgált közeg sótartalma (amennyiben mérik) és bármely más mérési adat,

— vízminőség a tesztedényekben: pH-érték, keménység, hőmérséklet és az oldottoxigén-koncentráció.

2.3.4. **Eredmények:**

— a vizsgált anyag stabilitására vonatkozó előzetes vizsgálatok eredményei,

— annak bizonyítása, hogy a kontrollok megfelelnek a vizsgált fajok teljes túlélési elfogadhatósági normáinak (lásd 2. és 3. függelék),

— adatok az embrió és lárva fejlődési fázisok mortalitási/túlélési arányairól és az összesített mortalitási/túlélési arányokról,

— a kikelésig eltelt napok és a kikelt példányok száma,

— hossz-(és tömeg-) adatok,

— az esetleges morfológiai rendellességek előfordulása és jellemzése,

— az esetleges viselkedésbeli eltérések előfordulása és leírása,

— az adatok statisztikai elemzése és kezelése,

— az ANOVA segítségével elemzett vizsgálatokra nézve a legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC) értéke $p = 0,05$-nél és megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció (NOEC) értéke minden egyes kiértékelt reakcióra nézve, beleértve a felhasznált statisztikai módszer leírását és annak jelzését, hogy milyen mértékű hatást sikerült feltárni,

▼B

— a regressziós analízissel elemzett vizsgálatok esetében az LC/EC_x értéke, a konfidencia-intervallumok és a számításhoz felhasznált illesztettmodell grafikonja,

— a leírt vizsgálati módszertől tett esetleges eltérések magyarázata.

3. **SZAKIRODALOM**

(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, Brachydanio 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., Espeldoorn 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 Hermes 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 reri o. 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, 252: 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., McIntyre 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. (1985). 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.

1. A. táblázat

A vizsgálatokhoz ajánlott halfajok

Édesvízi halak
Oncorhynchus mykiss
Szivárványos pisztráng (9) (16)
Danio rerio
Zebrahal (7) (17) (18)
Cyprinus caprio
Közönséges ponty (8) (19)
Oryzias latipes
Japán rizshal/Medaka (20) (21)
Pimephales promelas
Nagyfejű cselle (8) (22)

▼B

1. B. táblázat

Példák más, jól dokumentált és tesztelésre használható halfajokra

ÉDESVÍZI	TENGERI
Carassius auratus Ezüstkárász (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside (nincs magyar neve) (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Nagy naphal (8)	*Clupea harengus* Hering (24) (25)
	Gadus morhua Tőkehal (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Tarka fogasponty (23) (24) (25)

▼B

1. függelék

ÚTMUTATÓ ZEBRAHAL- *(BRACHYDANIO RERIO)* EMBRIÓK ÉS SZIKZACSKÓS LÁRVÁK TOXICITÁSI VIZSGÁLATÁNAK VÉGREHAJTÁSÁHOZ

BEVEZETÉS

A zebrahalak India keleti, koromandel partján, gyorsfolyású patakokban élnek. A pontyfélék családjához tartozó közönséges akváriumi halak, amelyek tartásával és életkörülményeivel kapcsolatos információk bármelyik, a trópusi halakkal foglalkozó szakkönyvben megtalálhatók. Biológiájukat és alkalmazásukat a halászati kutatásban Laale ismertette.

A zebrahal csak ritkán hosszabb 45 mm-nél. Hengeres testét 7–9 fémes-sötétkék vízszintes, ezüstösen csillogó csík díszíti. E mintázat a farokúszón és a farok alatti úszón folytatódik. A hal háta sárgászöld színű. A hímek karcsúbbak a nőstényeknél. A nőstények ezüstösebbek és hasuknál duzzadtabbak, különösen ívás előtt.

A felnőtt halak a víz hőmérséklete, pH-értéke és keménységi foka tekintetében jelentős ingadozásokat képesek elviselni. Az egészséges, jó minőségű ikrákat rakó halak tartásához azonban optimális körülményeket kell biztosítani.

A szaporodási időszakban a hím üldözi és fejével bökdösi a nőstényt, és a kipréselődött ikrákat azonnal meg is termékenyíti. Az átlátszó és nem tapadós ikrák a vízfenékre hullanak alá, ahol szüleik olykor meg is eszik őket. A fény befolyásolja a halak ívását. Amennyiben a reggeli fény megfelelő, a halak rendszerint a hajnalt követő korai órákban rakják le ikráikat.

A nőstény heti rendszerességgel alkalmanként több száz ikra lerakására képes.

A TENYÉSZHALAK TARTÁSÁNAK, SZAPORÍTÁSÁNAK ÉS A KORAI FEJLŐDÉSI STÁDIUMOKBAN LEVŐ EGYEDEK TARTÁSÁNAK FELTÉTELEI

Megfelelő számú egészséges halat kell kiválasztani, és megfelelő minőségű vízben kell tartani (lásd 4. függelék) a tervezett ikráztatás előtt legalább két hétig. Hagyni kell, hogy a halak csoportjának tagjai a vizsgálat során használandó ikrák lerakása előtt legalább egyszer párosodjanak. A halpopuláció sűrűsége ezen időszakban nem haladhatja meg az 1 gramm hal/liter fajlagos értéket. Rendszeres vízcsere vagy víztisztító rendszer használata esetén ennél magasabb egyedsűrűség is lehetséges. A tárolótartályokban a hőmérsékletet 25 ± 2 °C-on kell tartani. A halaknak változatos étrendet kell biztosítani, amely állhat például a kereskedelemben kapható szárított haleledelből, élő, frissen kikelt sóféregből, árvaszúnyoglárvából, Daphniából és televény férgekből (Enchytraeids).

Az alábbiakban vázolt kétféle eljárás a gyakorlatban az elvégzendő vizsgálathoz szükséges megfelelő nagyságú, egészséges és megtermékenyített ikrákat eredményez:

i) Nyolc nőstényt és 16 hímet 50 liter hígítóvizet tartalmazó, a közvetlen fénysugárzástól védett és legalább 48 óráig zavartalanul hagyott tartályban kell tartani. A vizsgálat megkezdése előtti nap délutánján az akvárium alján egy ívatótálcát kell elhelyezni. Az ívatótálca 5–7 cm magas (plexiüvegből vagy más alkalmas anyagból készült) keretből és felül 2–5 mm pórusméretű durva hálóból, alul pedig 10–30 mikron finomságú szitaszövetből áll. A nagyobb pórusméretű hálóhoz szétbontott nejlonkötelekből készült „ívatófákat” kell erősíteni. Miután a halakat 12 órán át sötétben tartják, gyenge fény bekapcsolására az ívás folyamata beindul. Az ívást követő kettő–négy óra múlva ki kell venni az ívatótálcát és be kell gyűjteni az ikrákat. Az ívatótálca használatával megakadályozható, hogy a halak felfalják az ikrákat, ugyanakkor az ikrák összegyűjtése is egyszerűbb. A vizsgálati célra szánt ikrák lerakása előtt a halakat legalább egyszer ívatni kell.

▼B

ii) A tervezett ívatás előtt legalább két hétig kell 5–10 nőstényt, illetve hímet egyedenként elkülönítve tartani. 5–10 nap elteltével a nőstények hasa kezd megduzzadni, és az ivarnyílás környéke kidudorodik. A hímeken ez nem látható. Az ívatásra a fent leírt ívatótálcával felszerelt akváriumban kerül sor. A tartályt hígítóvízzel töltik fel úgy, hogy a víz szintje 5–10 cm-rel ellepje a hálót. A tervezett ivást megelőző napon egy nőstényt és két hímet kell a tartályba helyezni. A víz hőmérsékletét fokozatosan egy fokkal az akklimatizációs hőmérséklet fölé kell emelni. A fény kikapcsolása után a lehető legnagyobb nyugalmat kell biztosítani a tartály környékén. Reggel gyenge fény bekapcsolására az ívás folyamata beindul. 2–4 óra elteltével a halakat ki kell venni és az ikrákat be kell gyűjteni. Amennyiben az egy nősténytől begyűjthetőnél több ikrára van szükség, akkor párhuzamosan több ikráztatótartályt lehet működtetni. Az egyes nőstényeknek a vizsgálat megkezdése előtti, korábbi szaporodási sikerét (az ikrák száma és minősége alapján) feljegyezve ki lehet választani a tenyésztési szempontból a legsikeresebbnek ígérkező példányokat.

Az ikrákat gumiballonnal felszerelt (legalább 4 mm belső átmérőjű) üvegcsövekben kell a tesztedényekbe áthelyezni. Az ikrákkal együtt áthelyezett víz mennyiségének a szállításkor a lehető legkisebb kell lennie. Az ikrák sűrűsége nagyobb, mint a vízé, tehát az ikrák lesüllyednek, és így kikerülnek a csőből. Ügyelni kell arra, hogy az ikrákat (és lárvákat) ne érje levegő. Az egyes adagokból származó mintákat mikroszkóppal megvizsgálva kell biztosítani, hogy ne történjenek rendellenességek az ivadékfejlődés kezdeti fázisaiban. Az ikrák fertőtlenítése nem megengedett.

Az ikrák mortalitása a megtermékenyítést követő első 24 órában a legmagasabb. Ebben az időszakban gyakran 5–40 %-os mortalitás tapasztalható. A sikertelen megtermékenyítés és a fejlődés rendellenességei miatt az ikrák degenerálódnak. Úgy tűnik, hogy az egyes ikraadagok minősége a nőstény hal adottságaitól függ, mivel egyes nőstények rendre jó minőségű ikrákat produkálnak, míg mások sohasem. A fejlődés üteme és az ikrák kikelési aránya is adagonként változó. A sikeresen megtermékenyített ikrák és a szikzacskós lárvák túlélési aránya jó, általában meghaladja a 90 %-ot. 25 °C-on az ikrák a megtermékenyítést követő 3–5 napon belül kikelnek, a szikzacskó pedig az ivadékok a megtermékenyítést követő mintegy 13 napon belül felszívódik.

Az embrionális fejlődés folyamatát Hisaoka és Battle írta le részletesen (2). Az ikrák és az éppen kikelt lárvák átlátszósága miatt a halak fejlődése jól nyomon követhető és a deformált változatok jelenléte megfigyelhető. Az ívást követő mintegy négy óra elteltével megkülönböztethetők a megtermékenyített és a meg nem termékenyített ikrák (3). E vizsgálat céljaira az ikrákat és lárvákat kis térfogatú tesztedényekbe helyezik, és mikroszkóp alatt tanulmányozzák.

A vizsgálatnak a korai egyedfejlődési stádiumokra alkalmazandó feltételeit a 2. függelék sorolja fel. A hígítóvíz optimális pH-értéke 7,8, keménysége 250 mg/-$CaCO_3$/liter víz.

SZÁMÍTÁSOK ÉS STATISZTIKA

Két szakaszból álló módszer használata ajánlott. Elsőként a mortalitásra, a rendellenes fejlődésre és a kikelési időre vonatkozó adatok statisztikai elemzésére kerül sor. Ezt követi a testhossz statisztikai elemzése azon koncentrációértékek tekintetében, amelyek esetében az előbb említett adatokkal kapcsolatban nem tapasztaltak kedvezőtlen hatásokat. E módszer használata azért tanácsos, mert a toxikus anyag specifikusan elpusztíthatja a kisebb halakat, késleltetheti a kikelési időt és jelentősen torzult egyedeket produkálhat, ezért eltorzított testhosszeredményekre vezethet. Továbbá így a kezelésenként megmérendő halak száma nagyjából azonos marad, biztosítván a vizsgálat statisztikájának érvényességét.

▼B

AZ LC_{50} ÉS EC_{50} MEGHATÁROZÁSA

Az életben maradt embriók és lárvák százalékos arányát ki kell számítani, és az Abbott-képlet (4) szerint a kontroll mortalitási értékeivel kell korrigálni:

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100\right)$$

ahol:

P = korrigált százalékos túlélés

P' = megfigyelt százalékos túlélés a teszt koncentrációinál

C = százalékos túlélés a kontrollban

Amennyiben lehetséges, az LC_{50}-et a vizsgálat végén egy megfelelő módszerrel meg kell határozni.

Amennyiben kívánatos a morfológiai rendellenességek befoglalása az LC_{50} statisztikákba, erre vonatkozóan Stephan idézett műve (5) ad útmutatást.

A LOEC ÉS A NOEC BECSLÉSE

Az ikra és ivadék túlélési kísérlet egyik célja a nem zéró koncentrációértékek összevetése a kontrollcsoporttal, azaz a LOEC értékének meghatározása. Ezért a többszörös összehasonlítás módszerét kell hasznosítani (6) (7) (8) (9) (10).

SZAKIRODALOM

(1) LAALE H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) 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 Zebrabärbling (*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. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 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.

▼B

2. függelék

VIZSGÁLATI KÖRÜLMÉNYEK, IDŐTARTAM ÉS A JAVASOLT FAJOK TÚLÉLÉSI KRITÉRIUMAI

Faj	Hőmérséklet (°C)	Sótartalom (0/00)	Megvilágítás (óra)	Fázisok időtartama (nap)		A vizsgálat átlagos időtartama	Kontrollcsoport túlélési aránya (min., %)	
				Embrió	Szikzacskós lárva		Kikelés sikeressége	A lárvák túlélése
ÉDESVÍZI								
Brachydanio rerio Zebrahal	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 5. napig (8-10 nap)	80	90
Oncorhynchus mykiss	10 ± 1 ([1]) 12 ± 1 ([2])	—	0 ([a])	30–35	25–30	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 20. napig (50–55 nap)	66	70
Cyprinus carpio Közönséges ponty	21–25	—	12–16	5	>4	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 4. napig (8-9 nap)	80	75
Oryzias latipes Japán rizshal/Medaka	24 ± 1 ([1]) 23 ± 1 ([2])	—	12–16	8–11	4–8	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 5. napig (13–16 nap)	80	80
Pimephales promelas Nagyfejű cselle	25 ± 2	—	16	4-5	5	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban) a kikelést követő 4. napig (8-9 nap)	60	70

([1]) Embriókra vonatkozik.
([2]) Lárvákra vonatkozik.
([a]) A lárvákat és embriókat a kikelés után egy hétig sötétben kell tartani, kivéve a vizsgálatok idejét. Ezt követően a vizsgálat folyamán mindvégig félhomályt kell fenntartani.

▼B

3. függelék

Más, jól dokumentált halfajokra vonatkozó vizsgálati körülmények, időtartam és túlélési kritériumok

Faj	Hőmérséklet (°C)	Sótartalom (0/00)	Megvilágítás (óra)	Fázisok idotartama (nap)		Az embrió- és a szikzacskóvizsgálat jellemző időtartama	Kontrollcsopo rt túlélési aránya, (min., %)	
				Embrió	Szikzacskós lárva		Kikelés sikeressége	A lárvák túlélése
ÉDESVÍZI FAJOK								
Carassius auratus Ezüstkárász	24 ± 1	—	—	3–4	>4	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 4. napig (7 nap)	—	80
Leopomis macrochirus Nagy naphal	21 ± 1	—	16	3	>4	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 4. napig (7 nap)	—	75
TENGERI								
Menidia peninsulae Tidewater silverside (nincs magyar neve)	22 –25	15–22	12	1,5	10	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 5. napig (6-7 nap)	80	60
Clupea harengus Hering	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 3. napig (23-27 nap)	60	80
Gadus morhua Tőkehal	5± 1	5–30	12	14–16	3–5	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 3. napig (18 nap)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow	25 ± 1	15–30	12	—	—	A megtermékenyítés után a lehető legkorábban (a korai gasztrula fejlődési szakaszban), a kikelést követő 4/7. napig (28 nap)	>75	80

▼B

4. függelék

AZ ELFOGADHATÓ MINŐSÉGŰ HÍGÍTÓVÍZ NÉHÁNY FONTOSABB KÉMIAI TULAJDONSÁGA

Anyag megnevezése	Koncentrációértékek
Lebegőanyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Nem ionizált ammónia	< 1 μg/l
Maradék klór	< 10 μg/1
Összes szerves foszfortartalmú peszticid	< 50 ng/l
Összes szerves klórtartalmú peszticid es poliklórozott bifenilek	< 50 ng/1
Összes szerves klór	< 25 ng/1

▼B

C.16. **HÁZIMÉH – AKUTORÁLISTOXICITÁS-VIZSGÁLAT**

1. **MÓDSZER**

Ezen akuttoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 213-nak (1998).

1.1. BEVEZETÉS

E toxicitásvizsgálat olyan laboratóriumi módszer, amelyet annak felmérésére dolgoztak ki, hogy a növényvédő szerek és más vegyi anyagok milyen mértékű akut orális toxicitást gyakorolnak a felnőtt dolgozó háziméhekre.

Az anyagok toxikus jellemzőinek a felmérése és értékelése a háziméhekre gyakorolt akut orális toxicitás mértékének a meghatározását igényelheti, pl. olyan körülmények között, amikor valószínű, hogy a méhek ki lesznek téve egy adott vegyi anyag hatásának. Az akutorálistoxicitás-vizsgálatot a peszticidek és más vegyi anyagok méhekre gyakorolt inherens toxicitásának meghatározására végzik. A vizsgálat eredményeit felhasználják annak meghatározására, hogy szükség van-e további minősítésre. E módszer különösen azon többlépcsős programokban használható jól, amelyekben a peszticidek méhekre kifejtett hatását először a laboratóriumokban, majd részlegesen terepen, végül terepen vizsgálják (1). A peszticideket hatóanyaguk formájában vagy formulázott termékként lehet vizsgálni.

Toxikus referenciaanyagot használnak a méhek érzékenységének és a vizsgálati eljárás pontosságának az ellenőrzésére.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut orális toxicitás: a vizsgált anyag egyszeri, orálisan adott dózisának beadásától számított legfeljebb 96 órás időszakon belül jelentkező károsító hatás.

Dózis: a vizsgált anyag elfogyasztott mennyisége. A dózis az egy kísérleti állatnak beadott vizsgált anyag mikrogrammban kifejezett mennyisége (mg/méh). Az egyes méhekre jutó dózis tényleges mennyisége nem számítható ki pontosan, mert a méheket kollektívan tápláljuk, ezért csak egy átlagos dózist lehet megbecsülni (az összesen elfogyasztott vizsgált anyag osztva az egy méhkasban lévő kísérleti méhek számával).

LD_{50} (közepes halálos dózis): szájon át: a vizsgált anyag statisztikailag megállapított egyszeri olyan dózisa, amely orálisan beadva az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50} értékét a vizsgált anyag egy méhre jutó mennyiségével (mg/méh) fejezik ki. A peszticidek esetében a vizsgált anyag lehet az aktív hatóanyag, vagy az egy vagy több hatóanyagot tartalmazó formulázott termék.

Mortalitás: egy állat akkor nyilvánítható elhullottnak, ha teljesen mozdulatlan.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálat során a kifejlett dolgozó háziméheknek *(Apis mellifera)* vizes cukoroldatban különböző töménységben diszpergált vizsgált anyagot adagolnak. Ezután a méheket tesztanyagot nem tartalmazó cukoroldattal táplálják. A mortalitást legalább 48 órán át naponta feljegyzik és összehasonlítják a kontrollcsoport adataival. Ha az elhullási arány a 24. és a 48. óra között is növekszik, míg a kontrollcsoportban elfogadható szinten, azaz < 10 %-on marad, helyénvaló a vizsgálat időtartamát maximum 96 órára meghosszabbítani. Az eredményeket elemzik a 24. és a 48. órai LD_{50} érték, illetve ha a vizsgálat időtartamát meghosszabbítják, akkor a 72. és a 96. órai LD_{50} érték meghatározásához.

▼B

1.4. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGÉNEK KRITÉRIUMAI

A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

— a vizsgálat végén a teljes kontrollcsoport létszámához viszonyított átlagos mortalitás nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— a toxikus referenciaanyag LD_{50} értéke megfelel a kijelölt tartománynak.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **A méhek befogása**

A vizsgálatokhoz azonos eredetű, fiatal, kifejlett dolgozó háziméheket használnak, azaz azonos életkorú, tápláltsági fokú stb. méheket. A méheket megfelelően táplált, egészséges, lehetőleg betegségektől mentes és királynővel rendelkező, ismert előéletű és fiziológiai állapotú kolóniákból fogják be. A méheket a felhasználás reggelén vagy azt megelőző estén célszerű befogni, és a következő napig a vizsgálati körülmények között tartják őket. Az utódokat nem tartalmazó keretekről gyűjtött méhek alkalmasak. Kerülni kell a kora tavasszal vagy késő ősszel történő befogást, mivel a méhek fiziológiája ebben az időszakban megváltozik. Ha a vizsgálatokat mégis kora tavasszal vagy késő ősszel végzik, a méheket „inkubátorban” elő lehet csalogatni és egy hétig „méhkenyérrel” (a lépből gyűjtött pollennel) és cukros vízzel lehet táplálni. A vegyi anyagokkal, pl. antibiotikumokkal, méhatka elleni szerekkel stb. kezelt méheket toxicitásvizsgálatok céljaira csak az utolsó kezeléstől számított négy hét elteltével szabad felhasználni.

1.5.2. **Tartási és etetési feltételek**

Könnyen tisztítható és jól szellőző dobozokat kell használni. Erre a célra bármilyen alkalmas anyag felhasználható, pl. rozsdamentes acél, drótháló, műanyagból készült, vagy eldobható, fából készült stb. doboz. Dobozonként tíz méhből álló csoportok használata javasolt. A vizsgálati dobozok méreteit a méhek létszámához igazítják, azért, hogy elegendő helyük legyen.

A méheket 25 ± 2 °C hőmérsékletű sötét kísérleti szobában tartják. A vizsgálat során végig megmérik és feljegyezik a relatív páratartalom értékét, amelyet általában 50–70 % között tartanak. A méhekkel kapcsolatos minden tevékenység, beleértve a kezelést és megfigyeléseket, végezhető világosban (nappali fény mellett). Táplálékként 500 g/liter (azaz 50 tömegszázalékos) végkoncentrációjú vizes cukoroldatot adnak. A meghatározott tesztanyagmennyiséget tartalmazó táplálékot az állatoknak tetszés szerinti módon adhatják. Az etetőrendszernek lehetővé kell tennie, hogy dobozonként fel lehessen jegyezni a táplálékbevitelt (lásd 1.6.3.1. szakasz). A táplálék beadásához egy (mintegy 50 mm hosszú és 10 mm széles, a nyitott végén kb. 2 mm átmérőre leszűkített) üvegcsövet lehet használni.

1.5.3. **A méhek előkészítése**

A befogott méheket a teszthelyiségben véletlenszerűen elhelyezett dobozok között osztják el.

▼B

A méheket a vizsgálat megkezdése előtt maximum két órán át éheztethetik. Javasolt a méhek táplálékának visszatartása a kezelés előtt, hogy valamennyi méh béltartalma azonos legyen a vizsgálat kezdetekor. A vizsgálat megkezdése előtt a haldokló méheket eltávolítják, és egészségesekkel pótolják.

1.5.4 **A dózisok előkészítése**

Ha a vizsgált anyag oldható vízben, akkor az közvetlenül belekeverhető az 50 %-os töménységű cukoroldatba. A vízben rosszul oldódó ipari termékek és anyagok esetében fel lehet használni a méhekre kis mértékben mérgező segédanyagokat – szerves oldószereket, emulgeáló- vagy diszpergálószereket (pl. aceton, dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid). A segédanyag töménysége a vizsgált anyag oldhatóságától függ, és azt az összes vizsgált koncentrációérték esetében azonos szinten tartják. Általában azonban megfelel az 1 %-os töménységű segédanyag, és ezt a szintet nem célszerű túllépni.

Megfelelő kontrolloldatokat készítenek elő, azaz ha oldószert vagy diszpergáló anyagot használnak a vizsgált anyag feloldásához, akkor két különálló kontrollcsoportot alkalmaznak: az egyiket a vizes oldatra, a másikat az oldatok adagolásához használt koncentrációjú oldószerrel/segédanyaggal javított cukoroldatra.

1.6. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

1.6.1. **Kezelt csoportok és kontrollcsoportok**

A vizsgált dózisok és a párhuzamos vizsgálatok száma meg kell, hogy feleljen az LD_{50} 95 %-os konfidenciahatár mellett történő meghatározására vonatkozó statisztikai követelményeknek. A vizsgálathoz szokványos esetben öt, olyan mértani sort képező dózisra van szükség, amelyek 2.2 értéket meg nem haladó szorzótényezővel különböznek egymástól és az LD_{50} tartományát fedik le. A hígítási tényezőt és az adagoláshoz használt koncentrációértékek számát azonban a hatásgörbe meredekségének függvényében (pusztulás a dózis függvényében) és az eredmények elemzéséhez kiválasztott statisztikai módszer figyelembevételével határozzák meg. A vizsgálat előtt elvégzett, dózisbehatároló vizsgálat lehetővé teszi az adagoláshoz megfelelő koncentrációértékek kiválasztását.

Legalább három, egyenként tíz méhből álló ún. párhuzamosan kezelt csoportnak adják be az egyes kísérleti koncentrációknak megfelelő dózist. A vizsgálatsorozatban részt vevőkön kívül legalább három, egyenként tíz méhből álló kontrollcsoportot kell vizsgálni. Ha szükséges (lásd 1.5.4. rész), külön oldószeres/segédanyagos kontrollokat is alkalmaznak.

1.6.2. **Toxikus referenciaanyag**

A tesztsorozattal párhuzamosan egy, a toxikus referenciaanyagot tartalmazó sorozatot is be kell állítani. A várható LD_{50} értékek lefedése érdekében legalább három dózist választanak ki. Mindegyik vizsgált dózis esetében legalább három, egyenként tíz méhet tartalmazó, ún. párhuzamosokat alkalmaznak. A leggyakrabban használt toxikus referenciaanyag a dimetoát, amelyre nézve a bizonyított orális LD_{50} 24 óra alatt a 0,10–0,35 mg hatóanyag/egyed tartományba esik (2). Egyéb toxikus referenciaanyagok is elfogadhatóak, de csak olyan esetekben, ahol elegendő adat áll rendelkezésre a várható dózisreakció ellenőrzésére (pl. parathion).

▼B

1.6.3. **Expozíció**

1.6.3.1. *A dózisok beadása*

Mindegyik kezelt csoport egyedeinek 100–200 ml-nyi, a vizsgált anyagot megfelelő koncentrációban tartalmazó 50 %-os cukoroldatot adnak be. Nagyobb mennyiségre van szükség, ha a készítményben rosszul oldódó, alacsony toxicitású vagy a formulázásból adódóan alacsony hatóanyag-tartalmú termékek vannak, mert ezeket nagyobb arányban kell a cukoroldathoz keverni. Megfigyelik, hogy az egyes csoportok milyen mennyiségben fogyasztottak a kezelt táplálékból. Ha elfogyasztották a felkínált élelmet (rendszerint 3-4 órán belül), akkor az etetőtálat kiveszik a dobozból, és helyére egy tisztán cukoroldatot tartalmazó tálat tesznek. Ezután a cukoroldatot korlátozás nélkül adagolják. Egyes vegyületek esetében magasabb koncentrációértékeknél a vizsgált dózis visszautasítása miatt a méhek esetleg keveset vagy semmit sem fogyasztanak. Maximum 6 óra elteltével az el nem fogyasztott, kezelt táplálékot tiszta cukoroldattal váltják fel. Megmérik, hogy mennyi fogyott a kezelt táplálékból (pl. a megmaradó táplálék térfogatának/tömegének mérésével).

1.6.3.2. *Időtartam*

A vizsgálat javasolt időtartama a vizsgált oldatok tisztán cukoroldattal való felváltását követően még 48 óra. Ha a mortalitás az első 24 óra után továbbra is 10 %-nál nagyobb mértékben növekszik, akkor a vizsgálat időtartamát maximum 96 órára kell meghosszabbítani, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

1.6.4. **Megfigyelések**

Feljegyezik a mortalitás alakulását a vizsgálat megkezdését követő 4. órában, majd azt követően a 24. és 48. órában (azaz a dózis beadását követően). Ha a meghosszabbított megfigyelési időszakra van szükség, akkor a további értékeléseket 24 órás időközönként kell elvégezni, legfeljebb a 96. óráig, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

Megmérik az egyes csoportok által elfogyasztott táplálék mennyiségét. Az adott 6 óra alatt a kezelt és a kezeletlen táplálékból való fogyasztás mértékének összevetése tájékoztat a kezelt étrend ízletességéről.

A vizsgálat időszaka alatt feljegyeznek minden, a normálistól eltérő magatartásformát.

1.6.5. **Tűrésteszt**

Egyes esetekben (pl. amikor a vizsgált anyag várható toxicitása alacsony) tűrésteszt lehet végezni, 100 mg aktív hatóanyag/egyed felhasználásával, annak bemutatására, hogy az LD_{50} nagyobb ezen értéknél. Ugyanezt az eljárást követik, beleértve a vizsgált dózisra vonatkozó három ún. párhuzamosan kezelt csoportot, a megfelelő kontrollokat, az elfogyasztott kezelt táplálék mennyiségének értékelő felmérését és a toxikus referenciaanyag használatát. Ha mortalitás tapasztalható, a teljes körű vizsgálatot végzik el. Ha szubletális hatások figyelhetők meg (lásd 1.6.4. szakasz), azokat feljegyezik.

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. ADATOK

Az adatokat táblázat formájában foglalják össze, mindegyik kezelt csoportnál, valamint kontroll- és toxikusreferenciaanyag-csoportnál feltüntetve a kísérlethez felhasznált méhek számát, az egyes megfigyelési időpontokban tapasztalt mortalitást, valamint a rendellenes magatartást mutató méhek számát. A mortalitási adatokat a megfelelő statisztikai módszerekkel elemzik (pl. probitanalízis, mozgóátlag, binomiális valószínűség) (3) (4). A hatásgörbéket mindegyik ajánlott megfigyelési időpontban grafikonon rögzítik, és a görbék meredekségét és a közepes halálos dózisokat (LD_{50}) a 95 %-os konfidenciahatárhoz kiszámítják. A kontrollcsoport mortalitásának korrekcióját az Abbott-képlet használatával lehet elvégezni (4) (5). Ha a méhek nem fogyasztották el a vizsgált anyaggal kezelt táplálék teljes mennyiségét, meghatározzák az egyes csoportok által elfogyasztott vizsgált anyaggal bevitt dózis nagyságát. Az LD_{50} értékét az egy méhre jutó vizsgált anyag mg-jában fejezik ki.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésben a következő információk szerepelnek:

2.2.1 **A vizsgált anyag:**

— az anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. stabilitása vízben, gőznyomás),

— kémiai azonosító adatok, beleértve a szerkezeti képletet és a kémiai tisztaságot (azaz peszticidek esetében a hatóanyag(ok) megnevezését és koncentrációját).

2.2.2. **A vizsgált fajok:**

— tudományos név, származás, hozzávetőleges életkor (hetekben kifejezve), a befogás módszere és dátuma,

— a kolóniákra vonatkozó információk, ahonnan a begyűjtött állatok származnak, beleértve a méhek egészségi állapotát, bármilyen kifejlett kori betegséget, esetleges előkezeléseket stb.

2.2.3. **Vizsgálati körülmények:**

— a kísérleti helyiség hőmérséklete és relatív páratartalma,

— elhelyezési körülmények, pl. a dobozok típusa, mérete és anyaga,

— a törzsoldat és a vizsgált oldatok készítésének módszere (ha oldószert használnak, meg kell adni a nevét és töménységét),

— a törzsoldat készítésének módja és az újrakezdés gyakorisága (az esetlegesen használt, oldódást segítő szer nevét és koncentrációját meg kell adni), a vizsgálat körülményei, pl. a felhasznált kísérleti koncentrációk száma, a kontrollok száma; minden egyes kísérleti koncentrációra és kontrollra nézve az ún. párhuzamosok és az egy dobozban lévő méhek száma,

— a vizsgálat időpontja.

▼B

2.2.4. **Eredmények:**

— előzetes koncentrációhatárokat felmérő vizsgálat eredményei, ha végeztek ilyet,

— nyers adatok: mortalitás minden egyes vizsgált dózisra és minden egyes megfigyelési időpontra nézve,

— a hatásgörbék grafikonja a vizsgálat végén,

— LD_{50} értékek 95 % konfidenciahatárhoz, minden egyes javasolt megfigyelési időpontokban, a vizsgált anyagra és a toxikus referenciaanyagra nézve,

— az LD_{50} meghatározásához használt statisztikai eljárások,

— mortalitás a kontrollcsoportokban,

— más megfigyelt vagy mért biológiai hatások, pl. a méhek abnormális viselkedése (beleértve a vizsgált dózis elutasítását), az elfogyasztott táplálék mértéke kezelt és a kezeletlen csoportoknál,

— bármilyen eltérés az itt leírt vizsgálati módszerektől, valamint bármely más releváns információ.

3. **SZAKIRODALOM**

(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., Mclndoe, 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. HÁZIMÉH – AKUTKONTAKTTOXICITÁS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ezen akutkontakttoxicitás-vizsgálat megfelel az OECD TG 214-nek (1998).

1.1. BEVEZETÉS

E toxicitásvizsgálat olyan laboratóriumi módszer, amelyet annak felmérésére dolgoztak ki, hogy a növényvédő szerek és más vegyi anyagok milyen mértékű akut kontakt toxicitást gyakorolnak a felnőtt dolgozó háziméhekre.

Az anyagok toxikus jellemzőinek a felmérése és értékelése a háziméhekre gyakorolt akut kontakt toxicitás mértékének a meghatározását igényelheti, pl. olyan körülmények között, amikor valószínű, hogy a méhek ki lesznek téve egy adott vegyi anyag hatásának. Az akutkontakttoxicitás-vizsgálatot a peszticideknek és más vegyi anyagoknak a méhekre gyakorolt inherens toxicitásának meghatározására végzik. A vizsgálat eredményeit felhasználják annak meghatározására, hogy szükség van-e további minősítésre. E módszer különösen azon többlépcsős programokban használható jól, amelyekben a peszticidek méhekre kifejtett hatását először a laboratóriumban, majd részlegesen terepen, végül terepen vizsgálják (1). A peszticideket hatóanyaguk formájában (a.s.) vagy formulázott termékként lehet vizsgálni.

Toxikus referenciaanyagot kell használni a méhek érzékenységének és a vizsgálati eljárás pontosságának az ellenőrzésére.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Akut kontakt toxicitás: egyszeri, helyileg alkalmazott tesztanyagdózis, maximum 96 órán belül jelentkező károsító hatása.

Dózis: a vizsgált anyag elfogyasztott mennyisége. A dózis az egy kísérleti állatnak beadott vizsgált anyag mikrogrammban kifejezett mennyisége (μg/méh).

Kontakt LD_{50} (közepes halálos dózis): valamely anyag statisztikailag megállapított egyszeri olyan dózisa, amely érintkezés útján az állatok 50 %-ának elhullását okozza. Az LD_{50} értéket a vizsgált anyag egy méhre jutó mennyiségével (μg/méh) fejezzük ki. A peszticidek esetében a vizsgált anyag lehet a hatóanyag, vagy egy vagy több hatóanyagot tartalmazó formulázott termék is.

Halálozás: egy állat akkor nyilvánítható elhullottnak, ha teljesen mozdulatlan.

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A vizsgálat során a kifejlett dolgozó háziméheket *(Apis mellifera)* a vizsgált anyag megfelelő hordozóanyagban, különböző töménységben oldott dózisaival kezelik úgy, hogy azt közvetlenül a torra cseppentik. A vizsgálat időtartama 48 óra. Ha az elhullási arány a 24. és 48. óra között is növekszik, míg a kontrollcsoportban egy elfogadható szinten, azaz £ 10 %-on marad, helyénvaló a vizsgálat időtartamát legfeljebb 96 órára meghosszabbítani. A elhullást naponta rögzítik és összehasonlítják a kontrollértékekkel. Az eredményeket elemzik a 24. és a 48. órai LD_{50} érték, illetve ha a vizsgálatot meghosszabbítják, akkor a 72. és 96. órai LD_{50} érték meghatározásához.

▼B

1.4. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGÉNEK KRITÉRIUMAI

A vizsgálat érvényességéhez a következő feltételeknek kell teljesülniük:

— a vizsgálat végére a teljes kontrollcsoport létszámához viszonyított átlagos mortalitás nem haladhatja meg a 10 %-ot,

— a toxikus referenciaanyag LD_{50} értéke megfelel a kijelölt tartománynak.

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.5.1. **A méhek befogása**

A vizsgálatokhoz fiatal, kifejlett dolgozó háziméheket használnak, azaz azonos életkorú, tápláltsági fokú, fajú stb. méheket. A méheket megfelelően táplált, és – amennyire csak lehetséges – betegségektől mentes és királynővel rendelkező, ismert előéletű és fiziológiai állapotú kolóniákból fogják be. A méheket a felhasználás reggelén vagy az azt megelőző estén célszerű befogni, és a következő napig a vizsgálati körülmények között tartják őket. Az ivadékokat nem tartalmazó keretekről gyűjtött méhek alkalmasak. Kerülni kell a kora tavasszal vagy késő ősszel történő befogást, mivel a méhek fiziológiája ezen időszakban megváltozik. Ha a vizsgálatokat mégis kora tavasszal vagy késő ősszel végzik, a méheket inkubátorba téve elő lehet csalogatni és egy hétig „méhkenyérrel” (a lépről gyűjtött pollennel) és cukros vízzel lehet táplálni. A vegyi anyagokkal, pl. antibiotikummal, méhatka elleni szerekkel stb. kezelt méheket toxicitásvizsgálatok céljaira csak az utolsó kezeléstől számított négy hét elteltével szabad felhasználni.

1.5.2. **Tartási és etetési feltételek**

Könnyen tisztítható és jól szellőző dobozokat kell használni. E célra bármilyen alkalmas anyag felhasználható, pl. rozsdamentes acél, drótháló, műanyag vagy eldobható, fából készült stb. dobozok. A vizsgálati dobozok méreteit a méhek létszámához igazítják, hogy elegendő helyük legyen. Dobozonként tíz méhből álló csoportok használata javasolt.

A méheket 25 ± 2 °C hőmérsékletű sötét teszthelyiségben tartják. A vizsgálat során végig megmérik és feljegyzik a relatív páratartalom értékét, amelyet általában 50–70 % között tartanak. A méhekkel kapcsolatos minden tevékenység, beleértve a kezelést és megfigyeléseket, végezhető világosban (nappali fény mellett). Táplálékként 500 g/liter (azaz 50 tömegszázalékos) végkoncentrációjú vizes cukoroldatot alkalmaznak, és a vizsgálat ideje alatt korlátozás nélkül adagolják méhetető berendezés felhasználásával. Ez lehet egy üvegcső (körülbelül 50 mm hosszú és 10 mm széles, amelynek nyitott végén körülbelül 2 mm átmérőre leszűkített).

1.5.3. **A méhek előkészítése**

A befogott méheket a vizsgált anyag elhelyezése érdekében szén-dioxiddal vagy nitrogénnel lehet elkábítani. Minimalizálni kell az alkalmazott narkotikum mennyiségét és az expozíció időtartamát. A vizsgálat megkezdése előtt a haldokló méheket eltávolítják, és egészségesekkel pótolják.

1.5.4. **A dózisok előkészítése**

A vizsgált anyagot valamilyen hordozóanyagban, azaz szerves oldószerben oldva vagy detergenst tartalmazó vizes oldatban alkalmazzák. Szerves oldószerként előnyben részesül az aceton, de a méhekre kis mértékben mérgező egyéb szerves oldószereket is lehet használni (pl. dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid). A vízben diszpergált formulázott termékek és az erősen poláros szerves anyagok esetében, amelyek szerves oldószerekben nem oldódnak, a kísérlethez használt oldatokat könnyebb felvinni, ha azt a kereskedelemben szokásos detergens (pl. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween) híg oldatában készítik elő.

▼B

A megfelelő kontrolloldatokat előkészítik, azaz ha oldószert vagy diszpergálószert használnak a vizsgált anyag feloldásához, akkor két különálló kontrollcsoportot alkalmaznak, egyet vízzel, egyet pedig az oldószerrel/diszpergálószerrel kezelve.

1.6. VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

1.6.1. **Kezelt csoportok és kontrollcsoportok**

A vizsgált dózisok és a párhuzamos vizsgálatok száma meg kell, hogy feleljen az LD_{50} 95 %-os konfidenciahatár mellett történő meghatározására vonatkozó statisztikai követelményeknek. A vizsgálathoz szokványos esetben öt, olyan mértani sort képező dózisra van szükség, amelyek 2.2 értéket meg nem haladó szorzótényezővel különböznek egymástól, és az LD_{50} tartományát fedik le. A dózisok számát azonban a hatásgörbe (pusztulás a dózis függvényében) meredekségének függvényében és az eredmények elemzéséhez kiválasztott statisztikai módszer figyelembevételével határozzák meg. A vizsgálat előtt elvégzett, dózisbehatároló vizsgálat lehetővé teszi a megfelelő dózisok kiválasztását.

Legalább három, egyenként tíz méhből álló ún. párhuzamos kezelt csoportot használnak fel minden egyes kísérleti koncentrációnak megfelelő dózishoz.

A vizsgálatsorozatban részt vevőkön kívül legalább három, egyenként tíz méhből álló kontrollcsoportot vizsgálnak. Ha szerves oldószert vagy detergenst használnak, az oldószerre vagy a detergensre nézve három további, egyenként tíz méhből álló kontrollcsoportot vizsgálnak.

1.6.2. **Toxikus referenciaanyagok**

A tesztsorozattal párhuzamosan egy, a toxikus referenciaanyagot tartalmazó sorozatot is be kell állítani. A várható LD_{50} értékek lefedése érdekében legalább három dózist választanak ki. Mindegyik vizsgált dózis esetében legalább három, egyenként tíz méhet tartalmazó, ún. párhuzamost alkalmaznak. A javasolt referenciaanyag a dimetoát, amelynek 24 órás kontakt LD_{50} értéke a 0,10–0,30 μg hatóanyag/egyed (2) tartományba esik. Egyéb toxikus referenciaanyagok is elfogadhatóak, azonban csak olyan esetekben, ahol elegendő adat áll rendelkezésre a várható dózisreakció ellenőrzésére (pl. paration).

1.6.3. **Expozíció**

1.6.3.1. *A dózisok beadása*

Az elkábított méheket egyenként kezelik külsőleg a vizsgált anyaggal. A méheket véletlenszerűen rendelik a különböző vizsgált dózisokhoz és kontrollokhoz. Mindegyik méh torának háti részére viszik fel mikroapplikátorral a vizsgált anyagot a megfelelő koncentrációban tartalmazó oldat egy μl mennyiségét. Indokolt esetben más mennyiségeket lehet alkalmazni. A felvitelt követően a méheket elosztják a kísérleti dobozok között, és ellátják cukoroldattal.

1.6.3.2. *Időtartam*

A vizsgálat időtartama lehetőség szerint 48 óra. Ha a mortalitás a 24. és a 48. óra között 10 %-nál nagyobb mértékben növekszik, a vizsgálat időtartamát maximum 96 órára meghosszabbítják, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

▼B

1.6.4. **Megfigyelések**

Feljegyzik a mortalitás alakulását a dózis bevitelét követő negyedik órában, ezt követően a 24. és a 48. órában. Ha a meghosszabbított megfigyelési időszakra van szükség, akkor a további értékeléseket 24 órás időközönként végezik el, legfeljebb a 96. óráig, feltéve, hogy a kontrollcsoportban a mortalitás nem haladja meg a 10 %-ot.

A vizsgálat időszaka alatt feljegyeznek minden, a normálistól eltérő magatartásformát.

1.6.5. **Tűrésteszt**

Egyes esetekben (pl. amikor valamely vizsgált anyag várható toxicitása alacsony) tűréstesztet lehet végezni, 100 μg hatóanyag/egyed dózis felhasználásával annak bemutatására, hogy az LD_{50} nagyobb ezen értéknél. Ugyanezt az eljárást követik, beleértve a vizsgált dózisra vonatkozó három ún. párhuzamos kezelt csoportot, a megfelelő kontrollokat, valamint a toxikus referenciaanyag használatát. Ha mortalitás tapasztalható, teljes körű vizsgálatot végeznek el. Ha szubletális hatások figyelhetők meg (lásd 1.6.4. szakasz), azokat feljegyzik.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

2.1. ADATOK

Az adatokat táblázat formájában foglalják össze, mindegyik kezelt csoportnál, valamint kontroll- és toxikus referenciaanyaggal kezelt csoportnál feltüntetve a kísérlethez felhasznált méhek számát, az egyes megfigyelési időpontokban tapasztalt mortalitást, valamint a rendellenes magatartást tanúsító méhek számát. A mortalitási adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel elemezik (pl. probitanalízis, mozgóátlag, binomiális valószínűség) (3) (4). A hatásgörbéket mindegyik ajánlott megfigyelési időpontban (azaz a 24., 48. és adott esetben a 72. és 96. órában) grafikonon rögzítik, és a görbék meredekségét és a közepes halálos dózisokat (LD_{50}) a 95 %-os konfidenciahatárhoz kiszámítják. A kontrollcsoport mortalitásának korrekcióját az Abbott-képlet alkalmazásával lehet elvégezni (4) (5). Az LD_{50} értékét az egy méhre jutó vizsgált anyag μg-jában fejezik ki.

2.2 VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésben a következő információknak kell szerepelniük:

2.2.1. **A vizsgált anyag:**

— az anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. stabilitása vízben, gőznyomás),

— kémiai azonosító adatok, beleértve a szerkezeti képletet és a kémiai tisztaságot (azaz peszticidek esetén a hatóanyag(ok) megnevezését és koncentrációját).

2.2.2. **A vizsgált fajok:**

— tudományos név, származás, hozzávetőleges életkor (hetekben kifejezve), a befogás módszere és dátuma,

— a kolóniákra vonatkozó információk, ahonnan a begyűjtött állatok származnak, beleértve a méhek egészségi állapotát, bármilyen kifejlett kori betegséget, esetleges előkezeléseket stb.

▼B

2.2.3. **Vizsgálati körülmények:**

— a kísérleti helyiség hőmérséklete és relatív páratartalma,

— elhelyezési körülmények, beleértve a dobozok típusát, méretét és anyagát,

— a vizsgált anyag beadásának módszerei, pl. a hordozó oldószer, alkalmazott vizsgált oldat mennyisége, felhasznált narkotikum,

— a vizsgálat körülményei, pl. felhasznált vizsgált dózisok száma, a kontrollok száma; minden egyes vizsgált dózisra és kontrollra nézve az ún. párhuzamosok és az egy dobozban lévő méhek száma,

— a vizsgálat időpontja.

2.2.4. **Eredmények:**

— előzetes koncentrációhatárokat felmérő vizsgálat eredményei, ha végeztek ilyet,

— nyers adatok: mortalitás minden egyes vizsgált dózisra és minden egyes megfigyelési időpontra nézve,

— a hatásgöbék grafikonja a vizsgálat végén,

— LD_{50} értékek, 95 %-os konfidenciahatárhoz, az egyes javasolt megfigyelési időpontokban, a vizsgált anyagra és a toxikus referenciaanyagra nézve,

— az LD_{50} meghatározásához használt statisztikai eljárások,

— mortalitás a kontrollcsoportokban,

— más megfigyelt vagy mért biológiai hatások és a méhek bármilyen abnormális reakciója,

— bármilyen eltérés az itt leírt vizsgálati módszerektől, valamint bármely más releváns információ.

3. **SZAKIRODALOM**

(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.18. KÉMIAI ANYAGOK TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA EGYENSÚLYI RENDSZERBEN

1. MÓDSZER

E módszer megfelel az OECD TG 106-nak: a talajon történő adszorpció/deszorpció meghatározása egyensúlyi rendszerben (2000).

1.1. BEVEZETÉS

A módszer az adszorpciós vizsgálat kialakításához figyelembe veszi a talaj kiválasztására vonatkozó körvizsgálatot és műhelymunkát (1) (2) (3) (4), valamint a meglévő nemzeti iránymutatásokat (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Az adszorpciós/deszorpciós vizsgálatok segítségével információkat nyerhetünk a vegyszerek mobilitására, illetve ezeknek a bioszféra talaj, víz és levegő kompartmentjei közötti megoszlására nézve (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Az információt fel lehet használni a következők előrejelzésére vagy becslésére: valamely vegyi anyag hozzáférhetősége a lebontás szempontjából (22) (23), élőlények általi felvétel és átalakítás (24); az anyag mozgása a talaj profilban (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28); talajból való kipárolgás (21) (29) (30); a talajból természetes vizekbe irányuló bemosódás (18) (31) (32). Adszorpciós adatokat összehasonlítási és modellezési célra lehet használni (19) (33) (34) (35).

A talajban egy vegyi anyag szilárd és folyadékfázis közti megoszlása összetett folyamat, amely több különböző tényezőtől függ: az anyag kémiai jellegétől (12) (36) (37) (38) (39) (40), a talaj jellemzőitől (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49), valamint olyan éghajlati tényezőktől, mint a csapadék, hőmérséklet, napsugárzás és szél. Így valamely vegyi anyag talajba való adszorbeálódásának folyamatában részt vevő számos jelenséget és mechanizmust nem lehet teljes mértékben meghatározni olyan egyszerűsített laboratóriumi modellel, mint ez a módszer. Azonban, még ha e kísérlet nem is tudja lefedni az összes, a környezetben előforduló esetet, elégséges tájékoztatást ad az adott vegyi anyag adszorpciójának környezeti jelentőségéről.

Lásd még az Általános bevezetést.

1.2. ALKALMAZÁSI KÖR

A módszer célja valamely anyag talajra vonatkozó adszorpciós/-deszorpciós magatartásának a vizsgálata. A célkitűzés olyan szorpciós érték megállapítása, amelyet fel lehet használni a megoszlás előrejelzésére különféle környezeti feltételek között; e célból valamely vegyszer különféle talajokra vonatkozó egyensúlyi adszorpciós koefficiensét a talaj jellemzőinek (pl. szervesszén-tartalom, agyagtartalom, talajszerkezet és pH-érték) függvényeként határozzák meg. Különböző talajtípusokat kell felhasználni annak érdekében, hogy az adott anyag természetben előforduló talajokkal létrejövő kölcsönhatásait a lehető legszélesebb körben lefedjék.

E módszerben az adszorpció azt a folyamatot képviseli, amely keretében a vegyi anyag a talajszemcsék felületéhez kötődik; e módszer nem tesz különbséget a különféle adszorpciós folyamatok (fizikai és kémiai adszorpció), valamint olyan folyamatok között, mint felületkatalizált lebomlás, tömeges adszorpció vagy kémiai reakció. A talaj kolloid méretű szemcséin (átmérő < 0,2 μm) bekövetkező adszorpciót nem veszik figyelembe.

▼B

Az adszorpció szempontjából legfontosabbnak tartott talajparaméterek a következők: szervesszén-tartalom (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); agyagtartalom és talajtextúra (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), az ionizálható vegyületek esetében a pH-érték (3) (4) (42). Az adott anyag adszorpcióját/-deszorpcióját esetleg befolyásoló egyéb talajparaméterek az effektív kationcserélő-kapacitás (ECEC), az amorf vas- és alumínium-oxid-tartalom, különösen vulkanikus és trópusi talajok esetében (4), valamint a talaj fajlagos felülete (49).

A vizsgálat kialakítása olyan, hogy eltérő szervesszén-tartalommal, agyagtartalommal és talajszerkezettel, valamint pH-értékkel rendelkező különböző talajtípusokban értékeli valamely vegyszer adszorpcióját. Három szintből épül fel:

1.**szint:** — a talaj/oldat arány,

— az adszorpciós egyensúly beálltáig eltelt idő és az egyensúlyi helyzetben a vizsgált anyagból adszorbeált mennyiség,

— a vizsgált anyag adszorpciója a tesztedények felületén, valamint a vizsgált anyag stabilitása a vizsgálat ideje alatt.

2.**szint:** „Screening” teszt: az adszorpciót öt különböző talajtípusban vizsgálják. Egyetlen koncentráció alkalmazásával vizsgálják az adszorpció kinetikáját, és meghatározzák a K_d és K_{oc} megoszlási együtthatókat.

3.**szint:** A Freundlich-féle adszorpciós izotermák meghatározása annak megállapítására, hogy a koncentráció hogyan befolyásolja az adszorpció mértékét.

Deszorpció tanulmányozása deszorpciós kinetika/-Freundlich-féle deszorpciós izotermák segítségével (1. függelék).

1.3. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Jel	Fogalommeghatározás	Mértékegység
A_{t_i}	adszorpció mértéke t_i időpontban	%
A_{eq}	adszorpció mértéke adszorpciós egyensúly helyzetben	%
$m_s^{ads}(t_i)$	a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege t_i időpontban	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege a A_{ti} időintervallumban	µg
$m_s^{ads}(eq)$	a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg
m_0	a vizsgált anyag tömege a kémcsőben az adszorpciós vizsgálat kezdetén	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	a vizsgált anyag az analízisre kivett térfogatban (v_a^A) tömege a t_i időpontban	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	az anyag tömege a törzsoldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg
M_{talaj}	a talajfázis mennyisége, talaj szárazanyagtartalomban kifejezve	g

▼B

Jel	Fogalommeghatározás	Mértékegység
C_{st}	az anyag oldott mennyiségének tömegkoncentrációja	µg cm^{-3}
C_0	a talajjal érintkezésben lévő vizsgált oldat kezdeti tömegkoncentrációja	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban abban a t_i időpontban, amikor az elemzést végzik	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	a talajban adszorbeált anyagtartalom adszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban adszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg cm^{-3}
V_0	a talajjal (az adszorpciós vizsgálat során) érintkező vizes fázis kezdeti térfogata	cm^3
v_a^A	a vizsgált anyag mérésére használt aliquota térfogata	cm^3
K_d	adszorpciós megoszlási koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	szerves szénre vonatkoztatott adszorpciós koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_{om}	szerves anyagra vonatkoztatott megoszlási koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlich-féle adszorpciós koefficiens	µg $^{1-1/n}$ (cm^3)
1/n	Freundlich-féle exponens	
D_{t_i}	deszorpció mértéke a t_i időpontban	%
$D_{\Delta t_i}$	deszorpció mértéke a Δt_i időintervallumban	%
K_{des}	látszólagos deszorpciós koefficiens	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlich-féle deszorpciós koefficiens	µg $^{1-1/n}$ (cm^3) $^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	a vizsgált anyag talajból deszorbeált tömege t_i időpontban	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	a vizsgált anyag talajból deszorbeált tömege Δt_i időintervallumban	µg
$m_m^{des}(eq)$	az anyag analitikus módon meghatározott tömege a vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	a vizsgált anyag deszorbeált össztömege deszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	az anyag talajban adszorbeálva maradó tömege At_i időintervallum után	µg
m_{aq}^A	a vizsgált anyagnak az abszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt talajban megmaradt tömege	µg
$C_s^{des}(eq)$	a talajban adszorbeálva maradó vizsgált anyag tartalom deszorpciós egyensúlyi helyzetben	µg g^{-1}

▼B

Jel	Fogalommeghatározás	Mértékegység
$C_{aq}^{des}(eq)$	a vizsgált anyag tömegkoncentrációja vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben	$\mu g\ cm^{-3}$
V_T	a talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata a „folytatásos” módszerrel végrehajtott deszorpciós kinetikai kísérlet során	cm^3
v_R	az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávolított és azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$ oldattal pótolt vizes fázis mennyisége	cm^3
v_a^D	a kémcsőből (i) időpontban a vizsgált anyag analizálása céljából kiemelt aliquot minta térfogata a „folytatásos” módszerrel végzett deszorpciós kinetikai kísérletben	cm^3
V_r^r	az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kiemelt oldat térfogata a párhuzamos módszerrel végzett deszorpciós kinetikai kísérletben	cm^3
V_r^F	a kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kivett oldat térfogata deszorpciós egyensúlyi helyzetben	cm^3
MB	tömegkiegyenlítés	%
m_E	a talajból és a tesztedény faláról két lépésben extrahált vizsgált anyag össztömege	µg
V_{rec}	az adszorpciós egyensúlyi helyzet után visszanyert felülúszó térfogata	cm^3
P_{ow}	oktanol/víz megoszlási koefficiens	
pKa	disszociációs állandó	
S_w	vízoldhatóság	$g\ l^{-1}$

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A radioaktívan jelölt vagy nem jelölt tesztanyag ismert térfogatú és koncentrációjú, 0,01 M $CaCl_2$-ben készült oldatait 0,01 M $CaCl_2$-vel ekvilibrált, ismert száraz tömegű talajmintákhoz adják. A keveréket megfelelő ideig rázzák. A talajszuszpenziókat ezt követően centrifugálással és szükség esetén szűréssel elválasztják, és a vizes fázist elemzik. A talajmintában adszorbeálódott vizsgáltanyag-mennyiséget a kezdetben az oldatban jelen lévő vizsgált anyagmennyiség és a kísérlet végén fennmaradó mennyiség különbözeteként adják meg (közvetett módszer).

Másik lehetőségként a vizsgált anyag adszorbeálódott mennyiségét közvetlenül is meg lehet határozni a talaj elemzésével (közvetlen módszer). Ezen eljárást, amely magában foglalja a megfelelő oldószerrel lépésekben történő talajextrakciót, olyan esetekben ajánlják, ahol az anyag oldatkoncentrációjában beálló különbözetet nem lehet pontosan meghatározni. Ilyen esetek pl. a vizsgált anyag adszorpciója a kísérleti edény falán, a vizsgált anyag instabilitása a kísérlet ideje alatt, gyenge adszorpció, amely az oldatban csak kis koncentrációváltozást eredményez; és az alacsony koncentrációt eredményező erőteljes adszorpció, amelyet nem lehet pontosan meghatározni. Ha radioaktívként jelölt anyagot használnak, a talajextrakció elkerülhető, ha a talajmintát hevítik, és folyadékszcintillációs számlálással határozzák meg a tesztanyag mennyiségét. A folyadékszcintillációs számlálás azonban olyan nem specifikus eljárás, amely nem tud különbséget tenni a tesztanyag és az átalakulási termékei között; ezért csak akkor kell használni, ha a vizsgált vegyi anyag a vizsgálat tartama alatt stabil.

▼B

1.5. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓ

Analitikai tisztaságú reagenseket kell használni. Ismert összetételű és lehetőleg legalább 95 % tisztaságú, jelöletlen vagy ismert összetételű, radioaktívként jelölt, radioaktivitás szempontjából is ismert tisztaságú vizsgált anyagok használata ajánlott. Rövid felezési idejű jelzők esetén bomlási korrekciókat kell alkalmazni.

Az adszorpciós-deszorpciós vizsgálat elvégzése előtt a vizsgált anyagról a következő információnak kell rendelkezésre állnia:

a) vízoldhatóság (A.6);

b) gőznyomás (A.4) és/vagy a Henry-törvény szerinti állandó;

c) abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében (C.7);

d) megoszlási koefficiens (A.8);

e) gyors biológiai lebonthatóság (C.4) vagy az anyag aerob és anaerob transzformációja a talajban;

f) ionizálható anyagok pKa értéke;

g) közvetlen fotolízis vízben (azaz UV-VIS adszorbciós spektrum vízben, kvantumhozam) és fotodegradáció a talajban.

1.6. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A vizsgálat olyan vegyi anyagokra alkalmazandó, amelyekre nézve kielégítő pontosságú analitikai módszer áll rendelkezésre. Az eredmények megbízhatóságát befolyásolni képes fontos tényező, különösen olyan esetben, amikor a közvetett módszert követik, a vizsgált anyag stabilitása a vizsgálat időtartama alatt. Ezért a stabilitást ellenőrizni kell előzetes vizsgálat során; ha az előkísérletben a teszt tervezett időtartama alatt átalakulást figyelnek meg az anyagon, akkor ajánlott a fő vizsgálatot a talaj- és vizes fázisok mindegyikének elemzésével elvégezni.

E vizsgálat végrehajtása során vízben csak kevéssé oldódó vizsgált anyagok (Sw< 10-4 g l^{-1}), valamint erős töltéssel rendelkező anyagok esetében nehézségek merülhetnek fel amiatt, hogy a vizes fázisban a koncentrációt analitikai módszerekkel nem lehet megfelelő pontossággal mérni. Ilyen esetekben további lépéseket kell tenni. E jogszabály vonatkozó szakaszai iránymutatást nyújtanak az ilyen problémák kezeléséhez.

Illékony anyagok vizsgálata során ügyelni kell a veszteségek elkerülésére.

1.7. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. **Eszközök és reagensek**

Szabványos laboratóriumi felszerelés, különösen a következők:

a) Kémcsövek vagy edények a kísérletek végzéséhez. Fontos, hogy e kémcsövek vagy edények:

— pontosan illeszkedjenek a centrifugába, a kezelési és áthelyezési hibák minimalizálása érdekében,

— közömbös (inert) anyagból készüljenek, ami minimálisra csökkenti a felületükön a vizsgálat anyag adszorpcióját.

▼B

b) Rázókészülék: körforgó rázógép vagy ezzel egyenértékű berendezés; a készülék a rázatás során tartsa szuszpenzióban a talajt.

c) Centrifuga: lehetőleg nagy sebességű, pl. centrifugálás erő > 3 000 g, hőszabályozós, illetve legyen képes a vizes oldatokból eltávolítani a 0,2 μm-nél nagyobb átmérőjű szemcséket. A rázatás és centrifugálás során a tesztedényeket le kell fedni a párolgás és a vízveszteség elkerülése érdekében; az ezeken jelentkező adszorpció minimalizálása érdekében deaktivált felszínű, mint pl. teflonbevonatú csavaros tetőt kell alkalmazni.

d) Szabadon választható: szűrőberendezés; 0,2 μm pórusméretű, steril, egyszer használatos filterekkel. Különös gonddal kell eljárni a filterek anyagának kiválasztásakor annak érdekében, hogy elkerüljék a vizsgált anyag bármilyen veszteségét ezeken; a rosszul oldódó vizsgált anyagok esetében nem ajánlatos szerves szűrőanyagot használni.

e) Analitikai berendezések, amelyek alkalmasak a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának mérésére.

f) Laboratóriumi szárítószekrény, amely 103 °C és 110 °C közötti hőmérsékletet tud tartani.

1.7.2. **Talajok jellemzése és kiválasztása**

A talajokat három olyan paraméterrel kell jellemezni, amelyeket nagyrészt felelősnek tartanak az adszorpcióért: szervesszén-tartalom, agyagtartalom és talajszerkezet, valamint a pH-érték. Mint az már korábban szerepelt (lásd Alkalmazási kör), a talaj más fizikai-kémiai tulajdonságai befolyásolhatják egy adott anyag adszorpcióját/-deszorpcióját, ilyen esetekben azokat is figyelembe kell venni.

A talaj jellemzésére használt módszerek nagyon fontosak, és jelentősen befolyásolhatják az eredményeket. Ezért ajánlatos a talaj pH-értékét 0,01 M $CaCl_2$-oldatban mérni (ez az adszorpciós/deszorpciós vizsgálatban használt oldat) a megfelelő ISO-módszer szerint (ISO-10390-1). Ajánlott továbbá az egyéb jelentős talajtulajdonságok szabványmódszer szerinti meghatározása (pl. az ISO „Talajanalízis kézikönyv” szerint); amely lehetővé teszi, hogy a szorpciós adatok nemzetközileg egységes, szabványosított talaj paramétereken alapuljanak. A talaj elemzésére és jellemzésére rendelkezésre álló szabványmódszerekre vonatkozó iránymutatás megtalálható a szakirodalomban (50-52). A talajvizsgálati módszerek kalibrálásához ajánlott referenciatalajokat használni.

Az adszorpciós/deszorpciós kísérletekhez használt talajok kiválasztására vonatkozó iránymutatás az 1. táblázatban szerepel. A hét kiválasztott talaj lefedi a mérsékelt égövben megtalálható talajtípusokat. Az ionizálható vizsgált anyagok esetében a kiválasztott talajoknak széles pH-érték tartományt kell lefedniük ahhoz, hogy értékelni lehessen az anyag adszorpcióját ionizált és nem ionizált formában is. Arra nézve, hogy a vizsgálat különféle szakaszaiban hány különböző talajt kell használni, „A vizsgálat végrehajtása” című szakasz (1.9.) nyújt iránymutatást.

Ha egyéb talajtípusokat részesítenek előnyben, ezeket ugyanezekkel a paraméterekkel kell jellemezni és azok tulajdonságainak hasonló eltérést kell mutatnia, mint az 1. táblázatban ismertetettek, még akkor is, ha nem pontosan felelnek meg a kritériumoknak.

▼B

1. táblázat

Adszorpcióhoz-deszorpcióhoz használt talajminták kiválasztására vonatkozó iránymutatás

Talajtípus	pH-tartomany (0,01 M $CaCl_2$ oldatban)	Szervesszén-tartalom (%)	Agyagtartalom (%)	Talaj textúrája ([1])
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65–80	agyagos talaj
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20–40	agyagos vályogtalaj
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15–25	iszapos vályogtalaj
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15–30	vályogtalaj
5	< 4,0 - 6,0 ([2])	< 0,5 - 1,5 ([2]) ([3])	< 10–15 ([2])	vályogos homoktalaj
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 ([2]) ([3])	40–65	agyagos vályogtalaj/agyagos talaj
7	< 4,5	> 10	< 10	homoktalaj/vályogos homoktalaj

([1]) A FAO és az US-rendszer szerint (85).
([2]) A vonatkozó változók lehetőleg a megadott tartományon belüli értékeket mutassanak. Ha azonban nehézségek merülnek fel a megfelelő talajanyag megtalálásában, elfogadhatóak a jelzett minimum alatti értékek is.
([3]) A 0,3 %-nál kisebb szervesszén-tartalmú talajok megzavarhatják a szervesanyag-tartalom és az adszorpció közötti összefüggést. Így ajánlatos legalább 0,3 % szervesszén-tartalmú talajokat használni.

1.7.3. **Talajminták gyűjtése és tárolása**

1.7.3.1. *Gyűjtés*

Nincs konkrét ajánlott mintavételi eljárás vagy eszköz; a mintavételi technika a vizsgálat céljától függ (53) (54) (55) (56) (57) (58).

A következőket kell figyelembe venni:

a) szükség van a terep „előéletére” vonatkozó részletes információra; ez magában foglalja a terepelhelyezkedést, a növényzetet, a peszticidekkel és/vagy trágyákkal történt kezeléseket, biológiai utánpótlását vagy véletlen szennyeződéseket. A mintavételre vonatkozó ISO-szabvány (ISO 10381-6) ajánlásait kell követni a mintavételi helyszín leírása tekintetében;

b) a mintavételi helyszínt az UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) vagy földrajzi koordináták segítségével kell meghatározni; ez lehetővé teszi ugyanazon talajtípus újbóli gyűjtését a jövőben, vagy segítséget tud nyújtani a különböző országokban használt különféle besorolási rendszerek szerinti talaj meghatározásban. Az A. szintből, legfeljebb 20 cm mélységből kell a talajmintát begyűjteni. Különösen a hetedik talajtípus esetében, ha a talaj részeként egy Oh-szint is jelen van, annak szerepelnie kell a mintában.

A talajmintákat olyan konténerek felhasználásával és olyan hőmérsékleti viszonyok között kell szállítani, amelyek garantálják, hogy az eredeti talajtulajdonságok jelentősen nem változnak meg.

▼B

1.7.3.2. *Tárolás*

Előnyben részesül a terepről frissen vett talajok használata. Csak amennyiben ez nem lehetséges, akkor lehet a talajt szobahőmérsékleten, levegőn szárított állapotban tárolni. A tárolás idejére nézve nincs ajánlott határérték, de a három évnél tovább tárolt talajokat felhasználás előtt újra kell elemezni szervesszén-tartalmuk, pH-értékük és a CEC tekintetében.

1.7.3.3. *Talajminták kezelése és előkészítése a vizsgálathoz*

A talajmintákat szobahőmérsékleten (lehetőleg 20–25 °C között) levegőn szárítják. A fellazítást minimális erőkifejtéssel kell végezni, hogy a talaj eredeti textúrája a lehető legkisebb mértékben változzon. A talajokat < 2 mm részecskeméretre szitálják; a szitálási folyamat tekintetében a talajmintavételre vonatkozó ISO-szabvány (ISO 10381-6) ajánlásait kell követni. Ajánlatos a gondos homogenizálás, mivel ez lehetővé teszi az eredmények megismételhetőségét. A talajok nedvességtartalmát a talajból vett három mintából határozzák meg. A három mintát 105 °C-on, tömegállandóságig (kb. 12 órán át) szárítják. A talaj tömege minden számításnál a száraz tömeg, azaz a talaj nedvességtartalommal korrigált súlya.

1.7.4. **A vizsgált anyag előkészítése a talajra történő alkalmazáshoz**

A vizsgált anyagot desztillált vagy deionizált vizes 0,01 M $CaCl_2$-oldatban feloldják; a $CaCl_2$-oldatot a centrifugálás javítása és a kationcsere minimalizálása érdekében a vizes oldatfázisként alkalmazzák. A törzsoldat koncentrációja lehetőleg legyen három nagyságrenddel nagyobb, mint az alkalmazott elemzési módszer kimutatási határa. Ez a küszöbérték biztosítja a pontos méréseket az e módszer alapjául szolgáló módszer vonatkozásában; ezenkívül a törzsoldat koncentrációja lehetőleg ne érje el a vizsgált anyag vízoldhatósági határát.

A törzsoldatot lehetőleg közvetlenül a talajmintákra történő felvitelt megelőzően kell előkészíteni, és sötét, elzárt helyen 4 °C hőmérsékleten kell tárolni. A tárolási idő a vizsgált anyag stabilitásától és oldatbeli koncentrációjától függ.

Csak a nehezen oldható anyagok ($Sw < 10\text{-}4\ g\ l^{-1}$) esetében lehet szükség oldást segítő anyagra. Ez az oldódást segítő anyag: a) legyen vízzel elegyedő, mint a metanol vagy az acetonitril; b) koncentrációja ne haladja meg a törzsoldat teljes térfogatának 1 %-át, és legyen ennél kevesebb a vizsgált anyag azon oldatában, amely érintkezésbe kerül a talajjal (lehetőleg legyen 0,1 %-nál kevesebb); és c) ne legyen felületaktív anyag, és ne lépjen vegyületképző reakcióba a vizsgált vegyi anyaggal. Az oldást segítő anyag használatát a vizsgálati jelentésben ismertetni kell és meg is kell indokolni.

A nehezen oldható anyagok esetében alkalmazható másik módszer az, hogy szerves oldószerben feloldott tesztanyagot adnak a talajból és a (desztillált vagy ionmentes vízzel készült) 0,01 M $CaCl_2$-oldatból álló tesztrendszerhez („spiking”). A vizes fázisban a szerves oldószer tartalmát a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani, általában a 0,1 % értéket nem meghaladva. A szerves oldattal történő elegyítés következménye, hogy a térfogat ezután már nem reprodukálható. Így további hiba állhat elő, mivel a vizsgált anyag és az oldószer koncentrációja nem azonos az összes vizsgálatban.

▼B

1.8. AZ ADSZORPCIÓS/DESZORPCIÓS KÍSÉRLET ELVÉGZÉSÉNEK ELŐFELTÉTELEI

1.8.1. **Elemzési módszer**

A szorpciós mérések pontosságát befolyásolni képes kulcsfontosságú paraméterek a következőek: az elemzési módszer pontossága az oldat és az adszorbeált fázisok elemzése során, a vizsgált anyag stabilitása és tisztasága, az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérése, az oldatkoncentráció változásának mértéke, a talaj/oldat arány és az egyensúlyi folyamat beállítása során a talajszerkezet változásai (35) (59–62). A pontosság kérdésében szerepet játszó néhány példát a 2. függelék tartalmazza.

Az alkalmazott elemzési módszer megbízhatóságát annál a koncentrációtartománynál kell ellenőrizni, amely a vizsgálat során valószínűleg felmerül. A kísérletet végző belátása szerint kialakíthat megfelelő módszert a megfelelő pontossággal, precizitással, reprodukálhatósággal, kimutatási határértékkel és visszanyerési hatékonysággal. Az ilyen vizsgálatok elvégzésének módjára vonatkozóan iránymutatást ad az alábbi kísérlet.

0,01 M $CaCl_2$ megfelelő mennyiségét, pl. 100 cm^3-t, 4 órán át rázatunk pl. 20 g tömegű, nagy adszorpciós kapacitással rendelkező talajjal, azaz olyannal, amelynek magas a szervesszén- és agyagtartalma; e tömeg és térfogat az elemzési igénytől függően változhat, de az 1:5 talaj/oldat arány a megfelelő kiindulási pont. A keveréket centrifugáljuk, és a vizes fázist szűrni lehet. A vizsgált anyag törzsoldatának megfelelő mennyiségét hozzáadjuk a megszűrt keverékhez, azért, hogy a vizsgálat során valószínűleg bekövetkező koncentrációtartományba eső névleges koncentrációt érjük el. E mennyiség ne haladja meg a vizes fázis végleges térfogatának 10 %-át, hogy a preekvilibrációs oldat jellegét a lehető legkevésbé változtassuk meg. Az oldatot elemezzük.

Egy talajból és $CaCl_2$-oldatból (vizsgált anyag nélkül) álló vakpróbát is be kell állítani az analitikai módszer műhibáinak kiszűrése és a talaj által okozott mátrixhatás ellenőrzése céljából.

A szorpciós mérésekre alkalmazható elemzési módszerek közé tartozik a gáz-folyadék kromatográfia (GLC), a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), a tömegspektrometria (pl. GC-MS, HPLC-MS) és a folyadékszcintillációs számlálás (radioaktívként jelölt anyagok esetén). Az alkalmazott elemzési módszertől függetlenül az minősül alkalmasnak, amelynél a visszanyerés a névérték 90 %-a és 110 %-a között van. A megoszlás után a kimutatás és értékelés lehetővé tétele érdekében az elemzési módszer kimutatási határértékeinek legalább két nagyságrenddel a névleges koncentráció alatt kell lenniük.

Az adszorpciós vizsgálatok elvégzéséhez rendelkezésre álló elemzési módszerek jellemzői és dedikálási határa fontos szerepet játszanak a vizsgálati körülmények meghatározásában és a vizsgálat kivitelezésében. E módszer egy általános vizsgálati eljárást követ és ajánlásokat, iránymutatásokat ad alternatív megoldásokra olyan esetekben, ahol az elemzési módszer és a laboratóriumi felszerelés korlátokat állíthat.

▼B

1.8.2. **Az optimális talaj/oldat arányok kiválasztása**

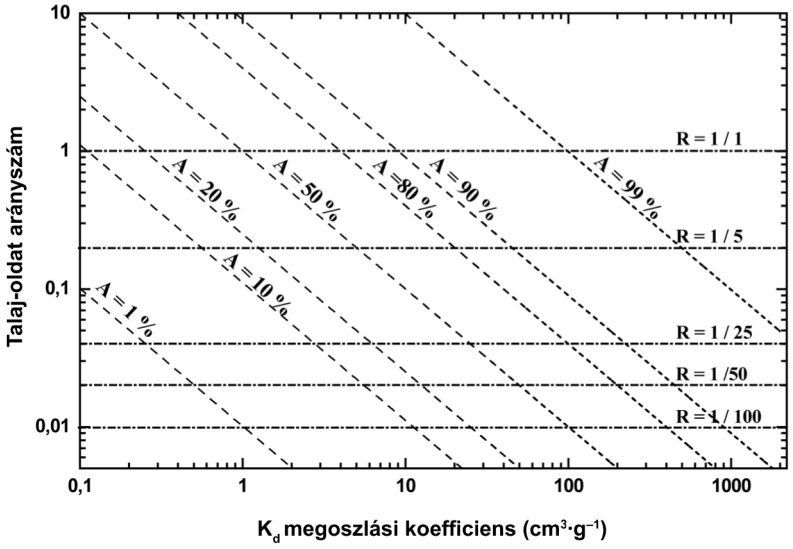
A szorpciós vizsgálatokhoz a megfelelő talaj-oldat arány kiválasztása a K_d megoszlási koefficienstől és az adszorpció kívánt relatív fokától függ. Az anyag koncentrációjának változása az oldatban, az adszorpciós egyenlet formája és az elemzési módszer detektálási határa meghatározza a mérés statisztikus pontosságát a vegyszer oldatbeli koncentrációjának kimutatásában. Ezért általában a gyakorlatban hasznos néhány előre meghatározott arányt beállítani, amelyeknél az adszorbeált százalékos arány 20 % felett van, és lehetőleg > 50 % (62), ugyanakkor figyelmet kell fordítani arra, hogy a vizes fázisban a vizsgált anyag koncentrációja elég magas maradjon ahhoz, hogy pontosan lehessen mérni. Ez különösen a nagy adszorpciós arányok esetében fontos.

A megfelelő talaj/oldat arányok kiválasztásához kézenfekvő megközelítés a K_d érték becslésén alapul, amelyet vagy elővizsgálatok, vagy bevett becslési technikák segítségével (3. függelék) határoznak meg. A megfelelő arány ezután kiválasztható egy olyan grafikon segítségével, amely a meghatározott adszorpciós százalékokra vonatkozó talaj/oldat arányt a K_d függvényében ábrázolja (1. ábra). Ekkor az a feltételezés, hogy az adszorpciós egyenlet lineáris - ([1]) (6). Az alkalmazandó összefüggést úgy kapják meg, ha a K_d-re vonatkozó 4. egyenletet az 1. egyenlet alakjára hozzák:

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

vagy logaritmusos formában fejezik ki, feltéve hogy $R = m_{talaj}/V0$ and $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$



1. ábra: A talaj-oldat arányszámok és a K_d közötti reláció az adszorbeált vizsgált anyag különböző százalékos mértékeinél

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Az 1. ábra a különböző adszorpciós szintekhez szükséges talaj/oldat arányszámokat mutatja a K_d függvényeként. Pl. egy 1:5 talaj/oldat aránnyal és K_d = 20 érték mellett kb. 80 % adszorpció következik be. Ugyanezen K_d mellett 50 %-os adszorpció eléréséhez 1:25 arányt kell alkalmazni. E rugalmas megközelítéssel választhatja ki a kísérletet végző a kísérlet céljainak leginkább megfelelő talaj/oldat arányt.

Nagyobb nehézségek adódnak azokban a tartományokban, ahol a vegyszer nagyon erősen vagy csak nagyon kis mértékben adszorbeálódik. Abban az esetben, ha alacsony szintű adszorpció következik be, 1:1 talaj/oldat arány ajánlott, bár néhány nagy szervesanyagtartalmú talajfajtánál bizonyos körülmények között kisebb arányra lehet szükség a sűrű szuszpenzió eléréséhez. Az oldat koncentrációjának kis változását mérő elemzési módszertannal kapcsolatban gondosan kell eljárni; különben az adszorpciós mérés pontatlan lesz. Másrészről nagyon magas K_d megoszlási koefficiensnél akár 1:100 talaj/oldat arányig is el lehet menni ahhoz, hogy jelentős mennyiségű tesztanyag maradjon az oldatban. Gondot kell azonban fordítani az alapos keverésre, és megfelelő időt kell hagyni a rendszernek az egyensúlyi állapot eléréséhez. Az ilyen szélsőséges esetek kezelésének másik megközelítése, ha a megfelelő elemzési módszertan hiányzik, a K_d érték előrejelzése pl. a P_{ow} értékeken alapuló becslési technikákkal (3. függelék). Ez az eljárás különösen hasznos lehet kevéssé adszorbeálódó/poláros vegyszerek esetén, amelyeknél $P_{ow} < 20$, valamint a lipofil/nagy abszorpcióképességű vegyszerek esetén, amelyeknél $P_{ow} > 104$.

1.9. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.9.1. **Vizsgálati körülmények**

Minden kísérletet szobahőmérsékleten és – ha lehetséges – 20 °C és 25 °C közötti állandó hőmérsékleten végeznek el.

A centrifugálási feltételeknek lehetővé kell tennie a 0,2 μm-nél nagyobb részecskék kiülepedését az oldatból. Ez az érték a legkisebb méretű olyan részecskékre vonatkozik, amelyek még szilárd részecskéknek minősülnek, és ez a határérték a szilárd és kolloid részecskék között. A centrifugálási feltételek meghatározására vonatkozó iránymutatás a 4. függelékben szerepel.

Ha a centrifugálóberendezés nem tudja garantálni a 0,2 μm-nél nagyobb részecskék ülepítését, akkor alkalmazni lehet a centrifugálás és 0,2 μm-es pórusméretű filterrel történő szűrés kombinációját. Ezeket a szűrőket alkalmas inert anyagból kell készíteni, hogy el lehessen kerülni a szűrés folyamán bekövetkező veszteségét. Minden esetben bizonyítani kell, hogy a szűrés során nem következik be a vizsgált anyag vesztesége.

1.9.2. **1. szint – előzetes vizsgálat**

Az előzetes vizsgálat elvégzésének célját már meghatározta az Alkalmazási kör című szakasz. Az ilyen vizsgálat összeállítására vonatkozó iránymutatást az alább javasolt kísérlet adja meg.

1.9.2.1. *Optimális talaj/oldat arányok kiválasztása*

Két talajtípust és három talaj/oldat arányt használnak (hat kísérlet). Az egyik talajtípus magas szervesszén- és alacsony agyagtartalommal rendelkezik, a másik pedig alacsony szervesszén-és magas agyagtartalommal. A következő talaj-oldat arányok használata javasolt:

— 50 g talaj és a vizsgált anyag vizes oldatának 50 cm^3 mennyisége (1:1 arány),

▼B

— 10 g talaj és a vizsgált anyag vizes oldatának 50 cm^3 mennyisége (1:5 arány),

— 2 g talaj és a vizsgált anyag vizes oldatának 50 cm^3 mennyisége (1:25 arány).

A minimális talajmennyiség, amellyel a kísérletet el lehet végezni, a laboratóriumi eszközöktől és az alkalmazott elemzési módszerek teljesítőképességétől függ. Ajánlatos legalább 1 g használata, előnyösebb azonban a 2 g a vizsgálat megbízható eredményeinek biztosítására.

Egy kontrollmintát, amely csak a vizsgált anyag 0,01 M $CaCl_2$-oldatát tartalmazza (talajt nem), pontosan ugyanazoknak a lépéseknek kell alávetnünk, mint a vizsgálati rendszereket, annak érdekében, hogy ellenőrizni lehessen a vizsgált anyag stabilitását $CaCl_2$-oldatban és annak esetleges adszorpcióját a tesztedények falán.

Talajmintánként elvégeznek egy vakpróbát, amely során azonos mennyiségű talajt és 50 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-oldatot (vizsgált anyag nélkül) pontosan ugyanazoknak a lépéseknek vetnek alá, mint a vizsgálati rendszereket. Ez háttérkontrollként szolgál az elemzés során az interferáló anyagok vagy szennyezett talajok kiszűrésére.

Minden kísérletet, beleértve a kontroll és vak kísérleteket, legalább kétszer kell elvégezni. A vizsgálathoz összesen előkészítendő minták számát az alapul szolgáló módszertan segítségével lehet kiszámítani.

Az előzetes vizsgálat és a fő vizsgálat módszerei általában azonosak, a kivételeket megemlítjük, ahol ez jelentőséggel bír.

A levegőn szárított talajmintákat rázással hozzuk egyensúlyi helyzetbe, legalább 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$-oldattal, a kísérlet napja előtti éjszakán (12 órával előbb). Ezt követően a vizsgált anyag törzsoldatának megfelelő mennyiségét hozzáadják, azért hogy a végleges térfogat 50 cm^3 legyen. A törzsoldat így hozzáadott mennyisége: a) nem haladhatja meg az 50 cm^3-es végtérfogat 10 %-át, hogy a lehető legkevésbé változtassa meg az egyensúlyba hozatal előtt az oldat jellegét; és b) lehetőleg az elemzési módszer kimutatási határértékénél legalább két nagyságrenddel nagyobb kiindulási koncentrációt eredményezzen a talajjal érintkező vizsgált anyag kiindulási koncentrációjában (C_0); ez a küszöb lehetővé teszi a pontos méréseket még akkor is, ha erőteljes adszorpció (> 90 %) következik be, valamint az adszorpciós izotermák későbbi meghatározását. Ajánlatos továbbá, hogy az anyag kiindulási koncentrációja (C_0) lehetőleg ne haladja meg az anyag oldhatósági határának felét.

Az alábbiakban bemutatnak egy példát a törzsoldat (C_{st}) koncentrációjának kiszámítására. Feltételeznek 0,01 μg cm^{-3} kimutatási határértéket és 90 % adszorpciót; így a vizsgált anyag talajjal érintkező kiindulási koncentrációja lehetőleg 1 μg cm^{-3} (a kimutatási határértéknél két nagyságrenddel nagyobb). Feltéve, hogy a törzsoldatból a rendszerhez a maximális ajánlott mennyiséget hozzáadják, azaz 5 cm^3-t a 45 cm^3 térfogatú 0,01 M $CaCl_2$ ekvilibrációs oldathoz (a törzsoldat így a vizes fázis 50 cm^3-es végtérfogatának 10 %-a), akkor a tömény oldat koncentrációja 10 μg cm^{-3} kell hogy legyen; ami három nagyságrenddel nagyobb, mint az elemzési módszer kimutatási határértéke.

A talajjal történő érintkezés előtt és után is meg kell mérni a vizes fázis pH-értékét, mivel ez fontos szerepet játszik a teljes adszorpciós folyamatban, különösen ionizálható anyagok esetén.

▼B

A keveréket addig rázzák, amíg eléri az adszorpciós egyensúlyi helyzetet. Az egyensúlyi helyzet elérésének ideje a talajokban igen változatos, a vegyi anyagtól és a talajtól is függ; 24 órás időszak általában elégséges (77). Az előzetes vizsgálatok végzésekor, a 48 órás rázatás során többször mintát vesznek (pl. 4., 8., 24. és 48. órában). Az elemzési időket rugalmasan kell kialakítani, a laboratórium munkarendjére tekintettel.

A vizsgált anyag vizes oldatában történő elemzésére két lehetőség van: a) párhuzamos módszer; és b) a „folytatásos" módszer. Hangsúlyozni kell, hogy bár a párhuzamos módszer alkalmazása időigényesebb, az eredmények matematikai feldolgozása egyszerűbb (5. függelék). A követendő módszer kiválasztását azonban a kísérletet végzőre hagyják, akinek figyelembe kell vennie a rendelkezésre álló laboratóriumi felszereléseket és eszközöket.

a) párhuzamos módszer: azonos talaj/oldat arányú mintákat készítenek elő, annyit, ahány időintervallumnál az adszorpciós kinetikát tanulmányozni kívánják. A centrifugálás, és amennyiben szükséges, szűrés után az első kémcső vizes fázisát a lehető legteljesebben visszaállítják és megmérik, pl. 4 óra után, a második kémcső esetében 8 óra után, a harmadik kémcső esetében 24 óra után stb.

b) „folytatásos" módszer: mindegyik talaj/oldat arányhoz csak két minta készül. Meghatározott időközönként a keveréket centrifugálják a fázisok szétválasztása érdekében. A vizes fázisból kivett kis mennyiségű oldat tesztanyagtartalmát azonnal meghatározzák; ezt követően a kísérlet az eredeti keverékkel folytatódik. Ha a centrifugálás után szűrést is alkalmaznak, a laboratóriumban lennie kell olyan berendezésnek, amely a kis térfogatok szűrésére alkalmas. Ajánlatos az analízisre kivett mennyiségek össztérfogatát úgy meghatározni, hogy az ne haladja meg az oldat teljes térfogatának 1 %-át, hogy a talaj/oldat arány jelentősen ne változzon és a vizsgálat során az adszorpcióra rendelkezésre álló oldott anyag tömege ne csökkenjen.

A százalékos adszorpciót (A_{t_i}) minden (t_i) időpontban kiszámítják a névleges kezdeti koncentráció és a mintavétel t_i időpontjában mért koncentráció alapján, amelyet a vakminta kapott értékével korrigálunk. Elkészítik az A_{t_i} érték időfüggését ábrázoló görbét (5. függelék 1. ábra) az adszorpciós egyensúlyi plató elérésének megbecslése érdekében ([1]). Kiszámítják az egyensúlyi K_d értéket is. E K_d érték alapján az 1. ábráról kiválasztják a megfelelő talaj/oldat arányokat úgy, hogy az adszorpció elérje a 20 % feletti és lehetőleg > 50 % mértéket (61). Minden vonatkozó egyenletet és ábrázolási alapelvet tartalmaz az adatokról és jelentéskészítésről szóló szakasz és az 5. függelék.

1.9.2.2. *Adszorpciós ekvilibrációs idő és az egyensúlyi helyzetben adszorbeált vizsgált anyag mennyiségének meghatározása*

Mint már említésre került, az A_{t_i} vagy C_{aq}^{ads} idő függvényében történő ábrázolása lehetővé teszi az adszorpciós egyensúlyi plató elérésének és az egyensúlyi állapotban adszorbeált vizsgált anyag mennyiségének becslését. Az 5. függelék 1. és 2. ábrája példákat mutat az ilyen grafikai ábrázolásra. Az ekvilibrációs időnek azon időszakot nevezik, amelyre a rendszernek a plató eléréséhez szüksége van.

([1]) A vizes fázisban lévő vizsgált anyag koncentrációját $\left(C_{aq}^{ads}\right)$ az idő függvényében ábrázoló grafikonok is használhatók az egyensúlyi plató elérésének megbecslésére (lásd 5. függelék 2. ábra).

▼B

Ha egy adott talaj esetében nem plató, hanem folyamatos növekedés észlelhető, ez olyan tényezők miatt lehet, mint a biodegradáció vagy lassú diffúzió. A biodegradációt úgy lehet kimutatni, hogy a kísérletet a talaj sterilizált mintájával megismételjük. Ha még ebben az esetben sem jön létre a plató, a kísérletet végzőnek más jelenségeket kell keresnie, amelyek a konkrét vizsgálatban szerepet játszhatnak; ezt a kísérleti feltételek (hőmérséklet, rázási idő, talaj/oldat arányok) megfelelő módosításával lehet elvégezni. A kísérletet végzőre hárul annak eldöntése, hogy a vizsgálati eljárást folytatja-e annak dacára, hogy esetleg nem sikerül egyensúlyi állapotot elérni.

1.9.2.3. *Adszorpció a tesztedény falán és a vizsgált anyag stabilitása*

A kontrollminták elemzésével bizonyos információkat lehet nyerni a vizsgált anyagnak a tesztedény falán történő adszorpciójáról, valamint annak stabilitásáról. Ha az elemzési módszer standard eltérését meghaladó koncentrációcsökkenést figyelnek meg, felmerülhet az abiotikus bomlás és/vagy adszorpció a tesztedény falán. E két jelenséget úgy lehet megkülönböztetni, hogy alaposan lemossák a tartály falát megfelelő oldószer ismert térfogatával, és a nyert oldat tesztanyagtartalmát meghatározzák. Ha a tesztedény falán nem figyelnek meg adszorpciót, a koncentrációcsökkenés a vizsgált anyag abiotikus instabilitását mutatja. Ha adszorpciót észlelnek, a tesztet más anyagból készült edényben kell kivitelezni. Az e kísérletből adódó, a tesztedények falán történő adszorpcióra vonatkozó adatokat azonban nem lehet közvetlenül kivetíteni a talaj/oldat kísérletre. A talaj jelenléte is befolyásolja ezen adszorpciót.

A vizsgált anyag stabilitására vonatkozó további információt az anyag tömegegyensúlyának az idő függvényében történő meghatározásával lehet nyerni. Ez azt jelenti, hogy a vizes fázist, a talajt és a tesztedény falait a vizsgált anyagra nézve elemzik. A hozzáadott vizsgált tesztanyagtömege és a vizsgált vegyi anyag vizes fázisú tömegének, a talaj kivonatoknak és a tesztedény falain adszorbeált anyag tömegének összege közötti különbözet a lebomlott, elpárolgott, illetve a nem extrahált tömeggel egyenlő. A tömegegyensúly meghatározásának elvégzéséhez az szükséges, hogy a kísérlet időtartama alatt megvalósuljon az adszorbciós egyensúlyi helyzet.

A tömegegyensúlyt mindkét talaj esetében talajonként egyetlen olyan talaj/oldat arány esetében határozzák meg, amikor a tesztanyag mennyiségének csökkenése 20 % feletti, illetve lehetőleg 50 % feletti az egyensúlyi állapotban. Amikor a talaj/oldat arány meghatározására irányuló vizsgálatban az utolsó vizesfázis-minta analízisét 48 óra után befejezik, a fázisokat centrifugálással, és ha szükséges, szűréssel szétválasztják. A vizes fázist a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják, és a vizsgált anyag extrahálása érdekében megfelelő extraháló oldószert (legalább 95 % extrakciós együttható) adnak a talajhoz. Legalább két egymást követő extrahálás ajánlott. Meghatározzák a talajban és a tesztedények falán extraktumokban lévő vizsgáltanyagmennyiséget és kiszámítják a tömegegyensúlyt (10. egyenlet, Adatok és jelentéskészítés). Ha ez 90 %-nál kevesebb, a vizsgált anyag a vizsgálat időtartamára nézve instabilnak minősül. A vizsgálatot azonban a vizsgált anyag instabilitásának figyelembevételével folytatni lehet; ebben az esetben ajánlatos a fő vizsgálat során mindkét fázis elemzése.

▼B

1.9.2.4. *2. szint – Adszorpciós kinetika a vizsgált anyag egyetlen koncentrációjánál*

Öt, az 1. táblázatból kiválasztott talajt használnak. Az előzetes vizsgálatban használt egy vagy több talaj alkalmazása előnyös. Ebben az esetben a 2. szintet nem kell megismételni az előzetes vizsgálatban használt talajokra nézve.

Az ekvilibrációs időt, a talaj/oldat arányt, a bemérendő talaj tömegét, a vizes fázis talajjal érintkező térfogatát és a vizsgált anyag koncentrációját az oldatban az előzetes vizsgálat eredményei alapján választják ki. Az elemzést lehetőleg kb. 2, 4, 6, 8 (esetleg 10) és 24 órás kezelést követően kell elvégezni; a rázási időt legfeljebb 48 órára meg lehet hosszabbítani, amennyiben a megfelelő talaj/oldat arány meghatározására irányuló vizsgálatok alapján hosszabb ekvilibrációs időre van szükség. Az elemzés időpontjait azonban rugalmasan lehet kezelni.

Mindegyik kísérletet (egy talaj és egy oldat) legalább kétszer kell elvégezni, hogy elemezni lehessen az eredmények varienciáját. Minden kísérletnél egy vakpróbát is végeznek. Ez a talajból és 0,01 M $CaCl_2$-oldatból áll, amely vizsgált anyagot nem tartalmaz, és tömegét és térfogatát tekintve megegyezik a kísérletben alkalmazottakkal. A nem várt tényezők kiszűrésére ugyanazon vizsgálati eljárásnak vetik alá az ellenőrző mintát is, amely csak a vizsgált anyagot tartalmazza 0,01 M $CaCl_2$-oldatban (talaj nélkül).

Mindegyik A_{t_i} időpontban vagy $A_{\Delta t_i}$ időintervallumban (a követelményeknek megfelelően) kiszámítják a százalékos adszorpciót és az idő függvényében ábrázolják. Kiszámítják továbbá az egyensúlyi deszorpciós együtthatót (K_d), valamint a szerves szénre vonatkoztatott adszorpciós együtthatót (K_{oc}) (apoláros szerves vegyületekre).

Az adszorpciós kinetikai vizsgálat eredményei:

A lineáris K_d-érték általában pontosan írja le egy anyag szorpciós tulajdonságait (35), (78) és kifejezi a talajban található vegyszerek jellemző mobilitását. Például általában a $K_d < 1$ cm^3 g^{-1} jellemzőjű vegyszerek kvalitatívan mobilnak minősülnek. Hasonló, a K_{oc}-értékeken alapuló mobilitási besorolási rendszert dolgoztak ki MacCall és munkatársai (16). Ezenkívül a K_{oc} és DT-50 ([1]) közötti viszony alapján ki oldódási besorolási rendszerek is léteznek (32) (79).

Az eltérések analízise szerint továbbá (61) a 0,3 cm^3 g-l alatti K_d értékeket nem lehet pontosan becsülni a vizes fázisban a koncentráció csökkenése alapján, még a (pontosság szempontjából) legkedvezőbb talaj/oldat arány, azaz az 1:1 arány alkalmazásánál sem. Ebben az esetben ajánlatos mindkét fázis – talaj és oldat – elemzése.

([1]) DT_{50}: a vizsgált anyag 50 %-ának lebomlási ideje.

▼B

A fenti megállapításokra tekintettel ajánlatos valamely anyag talajban tanúsított adszorpciós viselkedésére és mobilitási potenciáljára irányuló vizsgálatot lefolytatni, amely során az adszorpciós izotermákat Freundlich elmélete szerint határozzák meg. Ehhez pedig – ha a tesztmódszerben megjelölt vizsgálati eljárást alkalmazzuk –, a K_d értéke pontosan meghatározható. A pontos meghatározás akkor lehetséges, ha a K_d-t a talaj/oldat arányával megszorozva az eredmény > 0,3, és ha a koncentráció vizes fázisbeli csökkenésére alapulnak a mérések (közvetett módszer), vagy K_d > 0,1, ha mindkét fázist elemzik (közvetlen módszer) (61).

1.9.2.5. *3. szint – Adszorpciós izotermák és deszorpciós kinetika/deszorpciós izotermák*

1.9.2.5.1. Adszorpciós izotermák

Öt vizsgált anyagkoncentrációt alkalmaznak, amelyek lehetőleg két nagyságrendet fednek le; e koncentrációk kiválasztásában figyelembe kell venni a vízoldhatóságot és az előálló vizes egyensúlyi koncentrációkat. A vizsgálat során azonos talaj/oldat arányt kell fenntartani az egyes talajokra nézve. Az adszorpciós vizsgálatot a fent ismertettek szerint végzik el, azzal az egy különbséggel, hogy a vizes fázist csak egyszer, (a 2. szint vizsgálatai alapján) az egyensúly kialakulásához szükséges idő elteltével határozzák meg. Megmérik az oldat egyensúlyi koncentrációját, és az adszorbeált mennyiséget vagy a vizsgált anyagnak az oldatbeli kimerüléséből vagy a közvetlen módszerből számítják ki. A talaj által grammonként adszorbeált tömeget a vizsgált anyag egyensúlyi koncentrációjának függvényeként ábrázolják (lásd Adatok és jelentéskészítés).

Az adszorpciós izotermák meghatározására irányuló vizsgálatok eredményei:

Az eddig javasolt matematikai adszorpciós modellek közül a Freundlich-féle izoterma az egyik leggyakrabban használt, adszorpciós folyamatok leírására szolgáló modell. Az adszorpciós modellek értelmezésére és fontosságára vonatkozóan részletesebb információ a szakirodalomban található (41) (45) (80) (81) (82).

Megjegyzés: Meg kell említeni, hogy a különböző anyagok KF (Freundlich-féle adszorpciós koefficienst) értékeinek összehasonlítása csak akkor lehetséges, ha ezeket a KF-értékeket azonos mértékegységben fejezik ki (83).

1.9.2.5.2. Deszorpciós kinetika

E kísérlet célja annak vizsgálata, hogy valamely vegyszer reverzibilisen vagy irreverzibilisen adszorbeálódik-e valamely talajban. Ez az információ fontos, mivel a deszorpciós folyamat is fontos szerepet játszik a vegyszerek környezeti talajban tanúsított magatartásában. Ezen túlmenően a deszorpciós adatok hasznos bemenő adatokat jelentenek az átmosódás és a kioldódás szimulált számítógépes modellezéséhez. Ha deszorpciós vizsgálatot kívánnak végezni, ajánlatos az alábbiakban ismertetett vizsgálatot minden egyes rendszerre elvégezni, amelyre nézve a megelőző adszorpciós kinetikai kísérlet során pontosan meg lehetett határozni a K_d-értéket.

Hasonlóan az adszorpciós kinetikai vizsgálathoz, a deszorpciós kinetikai kísérletnél két lehetőség szerint lehet eljárni: a) a párhuzamos módszer; és b) a „folytatásos” módszer. A követendő módszertan kiválasztása a kísérletet végzőn múlik, akinek figyelembe kell vennie a rendelkezésre álló laboratóriumi felszereléseket és eszközöket.

▼B

a) párhuzamos módszer: mindegyik talajra nézve, amelyet a deszorpciós vizsgálat elvégzésére kiválasztanak, azonos talaj/oldat arányú mintákat készítenek, annyit, ahány időintervallumra vizsgálni kívánják a deszorpciós kinetikát. Lehetőség szerint ugyanazokat az időintervallumokat kell használni, mint az adszorpciós kinetikai kísérletnél; a teljes időtartamot azonban meg lehet hosszabbítani annak érdekében, hogy a rendszer elérje a deszorpciós egyensúlyt. Minden kísérletben (egy talaj, egy oldat) egy vakmintát is vizsgálnak. Ez a talajból és 0,01 M $CaCl_2$ oldatból áll, vizsgált anyagot nem tartalmaz, tömegét és térfogatát tekintve megegyezik a kísérletben alkalmazottakkal. Kontrollmintaként a vizsgált anyag 0,01 M $CaCl_2$ oldatban (talaj nélkül) oldott formáját azonos vizsgálati eljárásnak vetik alá. Az összes talaj os keveréket addig rázzák, amíg eléri az adszorpciós egyensúlyi helyzetet (a korábban a 2. szintnél meghatározott módon). Ezt követően a fázisokat centrifugálással szétválasztják, és a vizes fázisokat a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják. Az eltávolított oldat térfogatát azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal helyettesítik vizsgált anyag nélkül, és az új keverékeket újra rázatják. Az első kémcső vizes fázisát a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják, és elemzik, pl. 2 óra után, a második kémcsőét 4 óra után, a harmadik kémcsőét 6 óra után stb., amíg a deszorpciós egyensúlyt elérik.

b) „folytatásos” módszer: az adszorpciós kinetikai kísérletet követően a keveréket centrifugálják, és a vizes fázist a lehető legnagyobb mértékben eltávolítják. Az eltávolított oldat térfogatát azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal, vizsgált anyag nélkül pótolják. Az új keveréket addig rázzák, amíg eléri a deszorpciós egyensúlyi helyzetet. Ezen időszak alatt, meghatározott időközönként a keveréket centrifugálják, hogy a fázisokat szétválasszák. A vizes fázis egy kis aliquot részét azonnal elemzik a vizsgált anyagra nézve; majd a kísérlet az eredeti keverékkel folytatódik. Az egyes kivett aliquotok térfogata az oldat össztérfogatának 1 %-ánál kevesebb. A keverékhez azonos mennyiségű friss 0,01 M $CaCl_2$-oldatot adnak a talaj oldat arány fenntartásához, és a rázás a következő időintervallumig folytatódik.

A százalékos deszorpciót mindegyik (D_{t_i}) időpontban és/vagy ($D_{\Delta t_i}$) időintervallumban (a vizsgálat szükségleteinek megfelelően) kiszámítják, és az idő függvényében ábrázolják. Az egyensúlyi K_{des} deszorpciós koefficienst is kiszámítják. Az összes vonatkozó egyenlet szerepel az Adatok és jelentéskészítés szakaszban, valamint az 5. függelékben.

Deszorpciós kinetikai kísérletek eredményei:

A deszorpció D_{t_i} és a százalékos adszorpció A_{t_i} idő függvényében létrehozható közös ábrái lehetővé teszik az adszorpciós folyamat reverzibilitásának becslését. Ha a deszorpciós egyensúlyt még az adszorpciós egyensúly kialakulásához szükséges idő kétszeresén belül elérik, és az összdeszorpció az adszorbeált mennyiség 75 %-ánál több, az adszorpció reverzibilisnek minősül.

1.9.2.5.3. Deszorpciós izotermák

A Freundlich-féle deszorpciós izotermákat az adszorpciós izoterma kísérlethez használt talajokra határozzák meg. A deszorpciós vizsgálatot a Deszorpciós kinetika című szakaszban ismertetettek szerint folytatják le, azzal az egyetlen különbséggel, hogy a vizes fázist csak egyszer, a deszorpciós egyensúlyi helyzetben elemzik. Kiszámítják a deszorbeálódott vizsgált anyag mennyiségét. A deszorpciós egyensúlyi helyzetben a talajban adszorbeáltan maradó vizsgáltanyag-tartalmat a vizsgált anyag oldatban lévő egyensúlyi koncentrációjának függvényében ábrázolják (lásd az Adatok és jelentés készítés című szakaszt és az 5. függeléket).

▼B

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

Az elemzésből kapott adatokat táblázat formájában mutatják be (lásd 6. függelék). Megadják az egyedi mérések eredményeit és a számított átlagokat. Az adszorpciós izotermák grafikus megjelenítését is csatolják. A számításokat az alábbiakban leírtak szerint végzik.

Feltételezik, hogy 1 cm^3 vizes oldat tömege 1 g. A talaj/oldat arányt tömeg/tömeg vagy tömeg/térfogatömeg/térfogat egységekben azonos mértékegységgel lehet kifejezni.

2.1. ADSZORPCIÓ

Az A_{t_i} adszorpciót a vizsgálati feltételek mellett a talajban adszorbeált anyagnak a vizsgálat kezdetekor jelen lévő mennyiségéhez viszonyított százalékos arányban határozzák meg. Ha a vizsgált anyag stabil, és jelentősen nem adszorbeálódik a tesztedény falán, az A_{t_i} értéket mindegyik ti időpontban a következő egyenlet szerint számítják ki:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

ahol:

A_{t_i} = adszorpció mértéke a t_i időpontban (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = a vizsgált anyag talajban adszorbeált tömege t_i időpontban (μg);

m_0 = a vizsgált anyag tömege a kémcsőben a vizsgálat kezdetén (μg).

Az A_{t_i} százalékos adszorpció arányának a párhuzamos és a „folytatásos” módszer szerinti kiszámítására vonatkozó részletes információt az 5. függelék adja meg.

A K_d megoszlási koefficiens a talaj fázisban lévő anyagtartalom és a vizes oldatban található anyag tömegkoncentrációjának aránya azon vizsgálati feltételek mellett, amikor beáll az adszorpciós egyensúlyi helyzet.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (4)$$

ahol:

$C_s^{ads}(eq)$ = a talajban adszorbeált anyagtartalom adszorpciós egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$)

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban adszorpciós egyensúlyi helyzetben ($\mu g.cm^{-3}$). Ezt a koncentrációt analitikusan, a vakpróbákból származó értékek figyelembevételével határozzák meg;

$m_s^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag talajban adszorbeálódott tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

M_{talaj} = a talajfázis mennyisége, talaj szárazanyag-tartalomban kifejezve (g)

V_0 = a talajjal érintkező vizes fázis kiindulási térfogata (cm^3)

The relation between Aeq and Kd is given by

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

ahol:

A_{eq} = az adszorpció mértéke adszorpciós egyensúlyi helyzetben, %.

A szervesszén-tartalomra vonatkoztatott K_{oc} adszorpciós koefficiens a K_d megoszlási koefficienst a talajminta szervesszén-tartalmához viszonyítja:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

ahol:

%OC = a szerves szén aránya a talajmintában (g g^{-1}).

A K_{oc} koefficiens olyan érték, amely önmagában jellemzi a nagyobbrészt apoláros szerves vegyületeknek a talajok vagy üledékek szervesszén-tartalma és a víz közötti megoszlását. E vegyszerek adszorpcióját a szorbeáló szilárd anyag szervesanyag-tartalmával korrelálják (7); így a K_{oc} értékek a humuszfrakciók specifikus jellemzőitől függnek, amelyek jelentősen eltérnek szorpciós kapacitás tekintetében, az eredet, képződés stb. eltérései miatt.

2.1.1. **Adszorpciós izotermák**

A Freundlich-féle adszorpciós izoterma egyenlet az adszorbeált vizsgált anyag mennyiségét az egyensúlyi helyzetben lévő oldatban található vizsgáltanyag-koncentrációjához viszonyítja (8. egyenlet).

Az adatokat az „Adszorpció” című pont alatt ismertetett módon kezelik, és mindegyik kémcsőben kiszámítják az adszorpciós vizsgálat után a talajon adszorbeálódott vizsgált anyag tartalmat ($C_s^{ads}(eq)$), amelyet máshol x/m-ként jelölnek). Feltételezik, hogy az egyensúlyi helyzet beállt, és a $C_s^{ads}(eq)$) az egyensúlyi értéket mutatja:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{talaj}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right].V_0}{m_{talaj}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

A Freundlich-féle adszorpciós egyenlet a következő (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

vagy lineáris formában:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

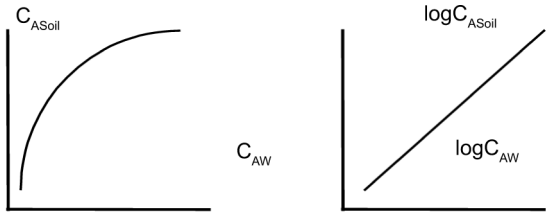
ahol:

K_F^{ads} = Freundlich-féle adszorpciós koefficiens: mértékegysége $cm^3\ g^{-1}$. ha 1/n = 1; minden más esetben az 1/n meredekséget a K_F^{ads} ($\mu g^{\,1-1/n}\ (cm^3)^{1/n}.g^{-1}$ dimenziójában fejezik ki

n = regressziós konstans; az 1/n általában 0,7–1,0 között van, ami azt jelzi, hogy a szorpciós adatok gyakran nem teljesen lineárisak.

A (8) és (9) egyenletet ábrázolják és a K_F^{ads} és 1/n értékeket regressziós analízissel elemzik a 9. egyenlet alkalmazásával. A logaritmusos egyenlet r_2 korrelációs koefficiensét is kiszámítják. Az ilyen ábrázolás egy példáját mutatja be a 2. ábra.

▼B



2. ábra Freundlich-féle adszorpciós görbe, normál és linearizált

2.1.2. **Tömegegyensúly**

A tömegegyensúlyt (MB) az adszorpciós vizsgálatot követően analitikusan visszanyerhető anyag és az anyagnak a vizsgálat kezdetekor meglévő névleges mennyisége arányaként határozzák meg.

Az adatok kezelése attól függ, hogy az oldószer mennyiben elegyedik a vízzel. A vízzel elegyedő oldószerek esetén a „Deszorpció" cím alatt ismertetett módon lehet az adatokat kezelni az oldószer kivonása révén visszanyert anyagmennyiség meghatározásához. Ha az oldószer kevésbé elegyedik a vízzel, meg kell határozni a visszanyert tesztanyagmennyiséget.

Az adszorpciós tömegegyensúlyt (MB) a következőképpen számítják ki; feltételezik, hogy a (mE) kifejezés megfelel a talajból és a tesztedény faláról szerves oldószerrel extrahált tömegek összegének:

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}\,(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}\ (\%) \qquad (10)$$

ahol:

MB = tömegegyensúly (%)

m_E = a talajból és a tesztedény falairól két lépésben extrahált vizsgált anyag össztömege (μg)

C_0 = a talajjal érintkezésben lévő vizsgált oldat kiindulási tömegkoncentrációja (μg cm^{-3})

V_{rec} = az adszorpciós ekvilibriumban visszanyert felülúszó térfogata (cm^3.

2.2. DESZORPCIÓ

A (D) deszorpciót a vizsgálat feltételei mellett deszorbeált vizsgált anyagnak a korábban adszorbeált anyagmennyiségéhez viszonyítva határozzák meg:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

ahol:

D_{t_i} = deszorpció mértéke t_i időpontban (%)

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = a vizsgált anyag talajból deszorbeált tömege t_i időpontban (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag talajon adszorbeált tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg).

A párhuzamos és „folytatásos” módszerek esetén a D_{t_i} deszorpció arányának kiszámítására vonatkozó részletes információ az 5. függelékben található.

A vizsgálati feltételek mellett a K_{des} látszólagos deszorpciós koefficiens a talajfázisban maradó anyagtartalom és a vizes oldatban deszorbeálódott anyag tömegkoncentrációjának aránya a deszorpciós egyensúly elérésekor:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

ahol:

K_{des} = deszorpciós koefficiens ($cm^3\ g^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = a vizsgált anyag talajból deszorbeálódott össztömege deszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

V_T = a talajjal érintkező vizes fázis össztérfogata a deszorpciós kinetikai kísérlet során (cm^3).

Az $m_{aq}^{des}(eq)$ kiszámítására vonatkozó útmutatás az 5. függelékben a „Deszorpció” cím alatt található.

Megjegyzés:

Ha az előbbi adszorpciós vizsgálatot a párhuzamos módszerrel végezték, a 12. egyenletben a V_T térfogat egyenlő a V_0 térfogattal.

2.2.1. **Deszorpciós izotermák**

A Freundlich-féle deszorpciós izoterma egyenlet a talajban adszorbeáltan maradó vizsgáltanyag-tartalmat a deszorpciós egyensúlyi helyzetben az oldatban maradó vizsgált anyag koncentrációhoz viszonyítja (16. egyenlet).

Az egyes kémcsövekre nézve a deszorpciós egyensúlyi helyzetben talajban adszorbeáltan maradó anyagtartalmat a következőképpen számítják ki:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{talaj}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

definíciója:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A (\mu g) \quad (14)$$

ahol:

$C_s^{des}(eq)$ = a talajon adszorbeálva maradó vizsgált anyagtartalom deszorpciós egyensúlyi helyzetbe[11] ($\mu g\ g^{-1}$)

$m_m^{des}(eq)$ = a vizsgált anyag analitikus módon meghatározott tömege a vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

▼B

m_{aq}^{A} = a vizsgált anyagnak az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt fennmaradt tömege (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = az anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = a kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kivett oldat térfogata deszorpciós egyensúlyi helyzetben (cm^3)

V_R = az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávolított telülúszó és azonos tértogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótolt térfogat (cm^3)

A Freundlich-féle deszorpciós egyenlet a következő:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

vagy lineáris formában:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

ahol:

K_F^{des} = Freundlich-féle deszorpciós koefficiens

n = regressziós konstans

$C_{aq}^{des}(eq)$ = az anyag tömegkoncentrációja a vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi helyzetben ($\mu g.cm^{-1}$).

A 16. és 17. egyenletet ábrázolni lehet, és a K_F^{des} és 1/n értékét a 17. egyenlet alapján regressziós analízissel számítják ki.

Megjegyzés:

Ha a Freundlich-féle adszorpciós vagy deszorpciós exponens 1/n egyenlő 1-gyel, a Freundlich-féle adszorpciós vagy deszorpciós kötési állandó (K_F^{ads} és K_F^{des}) egyenlő az adszorpciós, illetve deszorpciós egyensúlyi állandóval (K_d és K_{des}), és a C_s ábrázolása a C_{aq} függvényében lineáris lesz. Ha az exponensek nem egyenlők 1-gyel, a C_s ábrázolása a C_{aq} függvényében nem lineáris és az adszorpciós és deszorpciós állandók az izotermák mentén változnak.

2.2.2. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésben a következő információknak kell szerepelniük:

— a felhasznált talajminták részletes jellemzése, beleértve:

— a származási hely földrajzi azonosítása (szélességi, hosszúsági fok),

— mintavétel dátuma,

▼B

— használat jellege (pl. termőföld, erdő stb.),

— mintavételi mélység,

— homok-/vályog-/agyagtartalom,

— pH-értékek (0,01 M $CaCl_2$-ben),

— szervesszén-tartalom,

— szervesanyag-tartalom,

— nitrogéntartalom,

— C/N arány,

— kationcsere-kapacitás (mmol/kg),

— a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ,

— adott esetben a vizsgált anyag adszorpciójának/deszorpciójának értelmezésére vonatkozó összes releváns információ,

— az egyes paraméterek meghatározásához használt módszerek felsorolása,

— a vizsgált anyagra vonatkozó információ (szükség szerint),

— a vizsgálati hőmérsékletek,

— a centrifugálás körülményei,

— a vizsgált anyag elemzésénél alkalmazott analitikus eljárás,

— a vizsgált anyag törzsoldatának elkészítéséhez használt bármilyen, oldódást segítő anyag használatának indoklása,

— a számításokban végrehajtott korrekciók magyarázata, amennyiben releváns,

— az adatlapon feltüntetendő adatok (6. függelék) és a grafikonok,

— a vizsgálati eredmények értelmezéséhez segítséget nyújtó minden információ és megfigyelés.

3. **SZAKIRODALOM**

(1) Kukowski h. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045. Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987) Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045. 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 January 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: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (Koc) 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), FNRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. 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(alkylamino)-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 Böden”. 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. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability”. 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. 340-350.

(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 experimental 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". J. Environ. Qual., 10(3), pp. 382-386.

(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, B19 (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 J. 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., Banwart W. I., 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) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. Chemosphere, 32(12), pp. 2493- 2504.

(75) Kördel W., Kotthoff G., Müller 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) Kördel 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 Attainment 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.

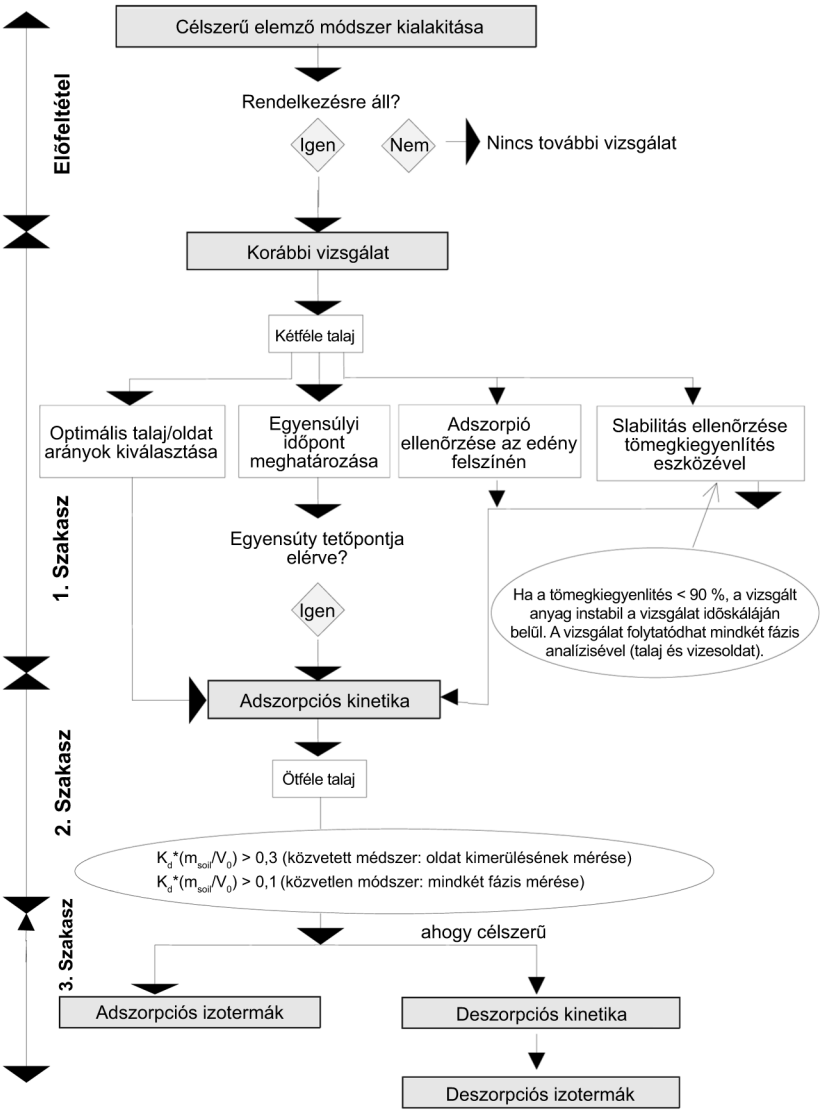
(84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption”, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

1. függelék

A vizsgálat terve



▼B

2. függelék

AZ ELEMZÉSI MÓDSZER PONTOSSÁGÁNAK ÉS A KONCENTRÁCIÓ VÁLTOZÁSÁNAK HATÁSA AZ ADSZORPCIÓS EREDMÉNYEK PONTOSSÁGÁRA

Az alábbi táblázatból (84) egyértelműen kiderül, hogy amikor nagyon csekély a különbség az oldatban lévő vizsgált anyag kiindulási tömege (m_0 = 110 µg) között, akkor az egyensúlyi koncentráció eredményének mérésekor bekövetkező 5 % mérési hiba a talaj által adszorbeált anyag tömegének ($m_{aq}^{ads}(eq)$) kiszámításakor 50 %-os hibát, a K_d kiszámításakor 52,4 %-os hibát eredményez.

Talaj mennyisége m_{talajl} = 10 g

Oldat térfogata 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 vagy $C_0 = 1,100$ µg/cm^3	100	1,000	valós érték	10	1,00	valós érték	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 vagy $C_0 = 1,100$ µg/cm^3	50,0	0,500	valós érték	60,0	6,00	valós érték	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 vagy $C_0 = 1,100$ µg/cm^3	1,100	0,011	valós érték	108,9	10,89	valós érték	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 %

$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq)$, $C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{talaj}}$. $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{talaj}}$

$m_s^{ads}(eq)$ = a vizgált anyag tömege a szilárd fázisban, egyensúly esetén µg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizgált anyag tömege egyensúlyi vizes fázisban, µg

$C_s^{ads}(eq)$ = a szilárd fázis tesztanyagtartalma egyensúlyban, µg, g^{-1}

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizsgált anyag tömegkoncentrációja egyensúlyi vizes fázisban, µg cm^{-3}

R = a $m_{aq}^{ads}(eq)$ meghatározásakor elkövetett analitikai hiba

R‡ = az analitikai hiba (R) miatt bekövetkező számítási hiba

▼B

3. függelék

ELJÁRÁSOK A K_d ÉRTÉKÉNEK BECSLÉSÉRE

1. Ezek a módszerek lehetővé teszik a K_d értékének a becslését, vizsgálva a következő tényezők valamelyikével mutatott korrelációt: pl. P_{ow} értékek (12) (39) (63–68), vízoldhatósági adatok (12) (19) (21) (39) (68–73), vagy polaritási adatok, amelyek reverz fázisú HPLC-s vizsgálatokkal nyerhetők (74–76). Az 1. és 2. táblázatban látható egyenletek alapján kiszámítják a K_{oc} és a K_{om} értékeit, ezután pedig indirekt módon a K_d-t az alábbi egyenletek alapján:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. E korrelációk alapgondolata két kiinduló feltételezésen alapul: (1) egy adott anyag adszorpcióját főként a talaj szervesanyag-tartalma befolyásolja; és (2) a lezajló kölcsönhatások túlnyomórészt nem poláros jellegűek. Ennek eredményeként, ezek az összefüggések: (1) nem vagy csak bizonyos mértékig alkalmazhatók a poláros anyagokra; és (2) nem alkalmazhatók olyan esetekben, amikor nagyon csekély a talaj szervesanyag-tartalma (12). Ezenfelül bár kielégítő bizonyossággal megállapítható a korreláció a P_{ow} értéke és az adszorpció mértéke között (1), nem mondható el ugyanez a vízoldhatóság és az adszorpció mértéke közötti összefüggésről (19) (21), ahol az eddigi vizsgálatok erősen ellentmondásos eredményekre vezettek.

3. Az adszorpciós koefficiens és az oktanol/víz megoszlási koefficiens közötti korrelációra, valamint a vízoldhatóságra vonatkozó néhány példa szerepel az 1., illetve 2. táblázatban.

1. táblázat:

Példák az adszorpciós megoszlási koefficiens és az oktanol/víz megoszlási koefficiens közötti korrelációra: további példákért lásd (12) (68)

Anyagok	Korreláció	Szerzők
Szubsztituált ureák	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Animás klórozott vegyületek	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou *a al*. (1983) (65)
Különféle peszticidek	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gersel és Mingelgrin (1984) (66)
Aromás szénhidrogének	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles és Mantoura (1987) (67)

2. táblázat:

Példák az adszorpciós megoszlási koefficiens és a vízoldhatóság közötti korrelációra; további példákért lásd (68) (69)

Anyagok	Korreláció	Szerzők
Különféle peszticidek	$\log K_{om} = 3,8 – 0,561 \log S_w$	Gerstl és Mingelgrin (1984) (66)
Alifás, aromás klórozott vegyületek	$\log K_{om} = (4,040 +/- 0,038) - (0,557 +/- 0,012) \log S_w$	Chiou *et al*. (1979) (70)
Alfa-naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Ciklikus, alifás aromás vegyületek	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,0095,3$ (mp-25)	Karickhoff (1981) (72)
Különféle vegyületek	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

4. függelék

SZÁMÍTÁSOK A CENTRIFUGÁLÁS KÖRÜLMÉNYEINEK MEGHATÁROZÁSÁHOZ

1. A centrifugálás idejét az alábbi képlettel lehet kiszámítani, gömb formájú részecskéket feltételezve:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 r p^2 (\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Az egyszerűsítés érdekében a paraméterek itt nem SI mértékegységben vannak megadva (g, cm).

ahol:

ω = forgási sebesség (= 2 p pm/60) rad s^{-1}

rpm = fordulatszám/perc

η = oldat viszkozitása, g s^{-1} cm^{-1}

r_p = részecske sugara, cm

ρ_s = talaj sűrűsége, g cm^3

ρ_{aq} = oldat sűrűsége, g cm^3

R_t = a centrifuga rotorjának középpontja és a centrifugacsőben lévő oldat teteje közötti távolság, cm

R_b = a centrifuga rotorjának középpontja és a centrifugacső alja közötti távolság, cm

$R_b - R_t$ = a centrifugacsőben lévő talaj/oldat keverék hossza, cm

A bevett gyakorlat szerint a számított időértékek kétszerese biztosítja a tökéletes szétválasztást.

2. Az (1) egyenlet tovább egyszerűsíthető, ha az oldat viszkozitását (η) és sűrűségét (ρ_{aq}) azonosnak tekintjük a 25 °C hőmérsékletű víz viszkozitásával és sűrűségével; tehát $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g $s^{-1}cm^{-1}$ és $\rho_{aq} = 1{,}0$ g.cm^{-3}.

Ebből adódóan a centrifugálási idő hosszát a (2) egyenlet adja meg:

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. A (2) egyenlet alapján nyilvánvaló, hogy a centrifugálás körülményeinek, azaz az idő (t) és a sebesség (rpm) meghatározása során alapvetően két paraméter fontos, annak érdekében, hogy el lehessen különíteni meghatározott méretű récsecskéket (a mi esetünkben a 0,1 mm sugarúakat); (1) a talaj sűrűsége és (2) a centrifugacsőben lévő elegy hossza (R_t-R_b), azaz azon távolság, amelyet az oldat felszíni tetőpontja és a cső alja között egy talajrészecske megtesz; nyilvánvaló, hogy egy rögzített térfogat esetében a csőben lévő elegy hossza a cső sugara négyzetének függvénye.

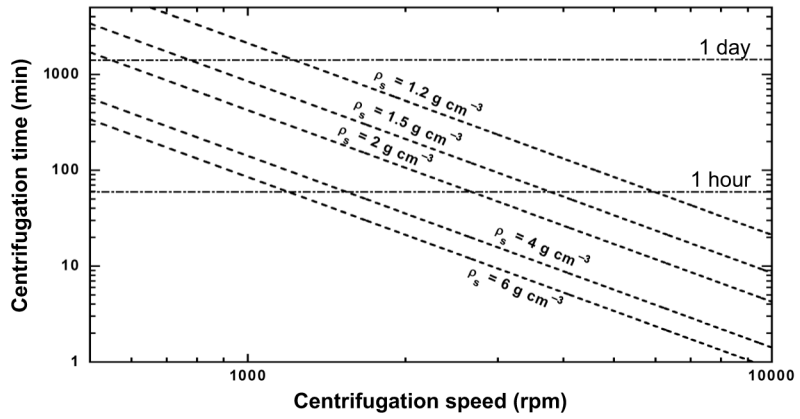
4. Az 1. ábra bemutatja a centrifugálás időtartamát (t) különböző talaj sűrűségek esetében, a centrifugálás sebességének függvényében, az 1b. ábra pedig ugyanezt a keverék hosszának a centrifugacsőben függvényeként ábrázolja. Az 1a. ábrából egyértelműen látható a talaj sűrűsége által gyakorolt hatás; például egy átlagosnak mondható 3000 ford/perc fordulatszám mellett a centrifugálási idő megközelítőleg 240 perc, 1,2 g cm^{-3} talajsűrűség esetén, míg mindössze 50 perc a 2,0 cm^{-3} sűrűségű talaj esetén. Hasonlóképpen, az 1b. ábra alapján, egy átlagosnak mondható 3000 ford/perc fordulatszám mellett a centrifugálási idő mintegy 50 perc egy 10 cm hosszú elegy esetén, míg mindössze 7 perc egy 1 cm hosszú elegy esetén. Fontos azonban megtalálni a centrifugálási paraméterek közötti optimális egyensúlyt, ahol a lehető legkisebb mintahosszra van szükség, és ami lehetővé teszi a kísérletező számára a fázisok centrifugálást követő elkülönítését.

▼B

5. Továbbá a talaj/oldat fázisok elválasztása kísérleti feltételeinek meghatározásakor fontos figyelembe venni egy harmadik „pszeudofázis”-t, a kolloidok lehetséges jelenlétét. Ezek a 0,2 mm-nél kisebb méretű anyagrészecskék jelentős hatást gyakorolhatnak az anyag egész adszorpciós mechanizmusára a talaj szuszpenzióban. Ha a centrifugálást a fent leírtak szerint hajtják végre, akkor a kolloidok a vizes fázisban maradnak, és azzal együtt kerülnek elemzésre. Az általuk gyakorolt hatásra vonatkozó információk ezért elvesznek.

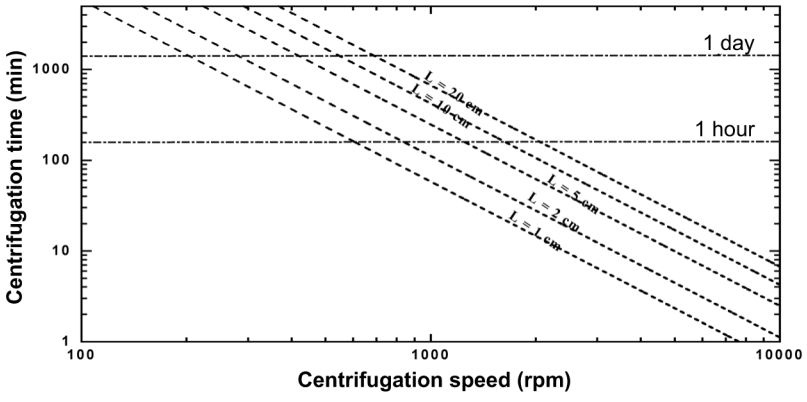
   Ha a kísérletet végző laboratórium rendelkezik ultracentrifugával vagy ultraszűrő berendezésekkel, akkor elmélyültebben lehet tanulmányozni az anyag talajban való adszorpcióját, illetve deszorpcióját, beleértve az anyagnak a kolloidrészecskék felületén bekövetkező adszorpcióját. Ebben az esetben 60 000 rpm fordulatszámú ultracentrifugálást vagy 100 000 Dalton porozitású ultraszűrőt kell használni a három fázis, azaz a talaj, a kolloidok és az oldat szétválasztására. A vizsgálat menetét ezért ennek megfelelően úgy kell módosítani, hogy mindhárom fázist alá lehessen vetni az anyagokra vonatkozó elemzésnek.

1a. ábra:



A centrifugálási idő (t) változása a centrifugálás sebességének (rpm) függvényében, különböző talajsűrűségek (p_s) mellett. R_t = 10 cm, $R_b - R_t$ = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g.s^{-1} cm^{-1} és ρ_{aq} = 1,0 g.1 cm^{-3} 25 °C-on

1b. ábra:



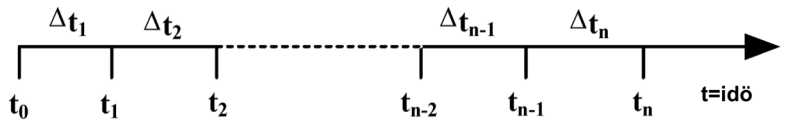
A centrifugálási idő (t) változása a centrifugálás sebességének (rpm) függvényében, a centrifugacsőbe helyezett keverék különböző hosszúsága esetén, $(R_b - R_t) = L$; R_t = 10 cm, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g.s^{-1} cm^{-1}, ρ_{aq} = 1,0 g.cm^{-3} 25 °C-on és ρ_s = 2,0 g.cm^{-3} mellett.

▼B

5. függelék

AZ ADSZORPCIÓ (A, %) ÉS A DESZORPCIÓ (D, %) KISZÁMÍTÁSA

Az eljárás időskálája a következő:



Valamennyi számítás esetében feltételezzük, hogy a vizsgált anyag stabil, és nem adszorbeálódik jelentős mértékben az edény falán.

ADSZORPCIÓ (A %)

a) *Párhuzamos módszer*

Minden egyes kémcsőre (i) és minden egyes időpontra (t_i) nézve az alábbi képlet alapján kell a százalékos adszorpciót kiszámítani:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Az egyenlet elemei az alábbi módon számíthatók ki:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \quad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \quad (3)$$

ahol:

A_{t_i} = százalékos adszorpció (%) t_i időpontban

$m_s^{ads}(t_i)$ = a vizsgált anyag talajon mért tömege a t_i időpontban, amikor a vizsgálatot végrehajtják (mg)

m_0 = a vizsgált anyag tömege a kémcsőben, a vizsgálat kezdetén (mg)

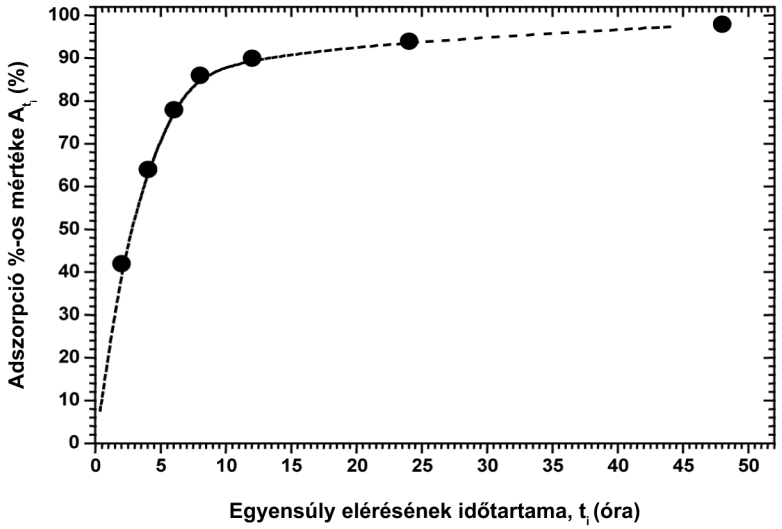
C_0 = a talajjal érintkező vizsgák oldat kiindulási tömegkoncentrációja (mg cm^{-3})

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = az anyag tömegkoncentrációja vizes fázisban abban a t_i időpontban, amikor az elemzést végzik (mg cm^{-3}); e koncentráció meghatározása analitikai úton történik, figyelembe véve a vak próbákkal kapott értékeket

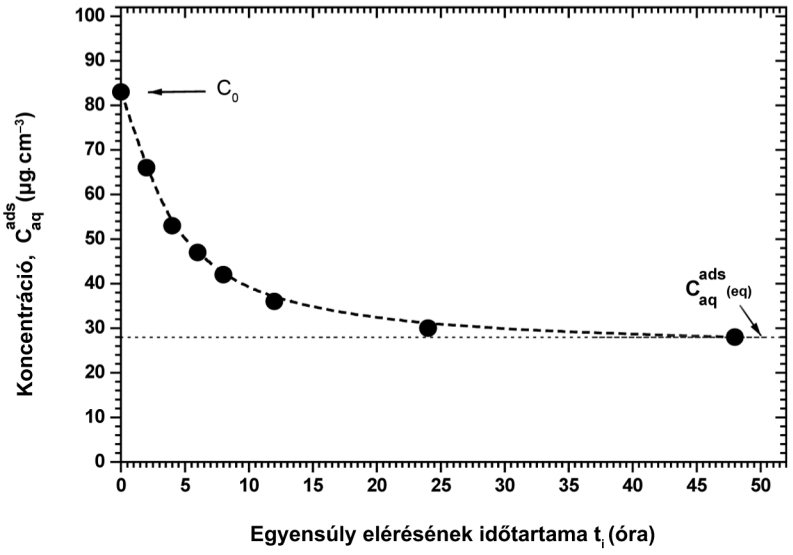
V_0 = a talajjal érintkező vizsgálati oldat kimdulási térfogata (cm^3)

A százalékos adszorpció értékeit A_{t_i} ill. $C_{aq}^{ads}(t_i)$ az idő függvényében grafikusan kell ábrázolni, valamint meg kell határozni azt az időt, amelyre a szorpciós ekvilibrium eléréséhez szükség volt. Az ilyen grafikus ábrázolás példáját az 1., illetve 2. ábra mutatja be.



1. ábra

Adszorpciós egyensúly grafikus ábrázolása



2. ábra

A vizsgált anyag tömegkoncentrációja vizes fázisban (C_{aq}) az idő függvényében

▼B

b) *„Folytatásos” módszer*

Az alábbi egyenletek figyelembe veszik, hogy az adszorpciós eljárás végrehajtása során a vizes fázis kis aliquotáiban a vizsgált anyagot meghatározott időtartamonként mérik.

— Minden egyes időtartam során a vizsgált anyag talajon adszorbeálódott mennyiségét az alábbi módon lehet kiszámítani:

— az első $\Delta_{ti} = t_i - t_0$ időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— a második időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— a harmadik $\Delta t_3 = t_3 - t_2$ időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— az n-edik $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$ időintervallumra nézve:

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Az egyes időintervallumokra vonatkozó százalékos adszorpció $A_{\Delta t_i}$ az alábbi egyenlet segítségével számítható ki:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

((A_{t_i})) időpontra vonatkozó százalékos adszorpciót az alábbi egyenlet adja:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Az adszorpció A_{t_i} ill. $A_{\Delta t_i}$ értékeit (a vizsgálat igényei szerint) az idő függvényében grafikusan kell ábrázolni, valamint meg kell határozni azt az időt, amelyre a szorpciós egyensúly eléréséhez szükség volt.

— A t_{eq} ekvilibrációs idő elteltével:

— a vizsgált anyag talajon adszorbeálódott tömege:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— a vizsgált anyag oldatban lévő tömege

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— és a százalékos adszorpció egyensúlyi állapotban:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

A fent használt paraméterek jelentése az alábbi:

$m_s^{ads}(\Delta t_1),\ m_s^{ads}(\Delta t_2),\ ...,\ m_s^{ads}(\Delta t_n)$	=	a talajon adszorbeált tesztanyag tömege a Dt_1, Dt_2… illetve Dt_n időintervallumban (mg)
$m_m^{ads}(t_1),\ m_m^{ads}(t_2),\ ...,\ m_n^{ads}(t_n)$	=	a (v_a^A) aliquotokban, a t_1, t_2,..., t_n időpontban mért tesztanyag tömege (μg)
$m_s^{ads}(eq)$	=	az anyag talajon adszorbeálódott tömege adszorpciós egyensúlyi helyzetben (mg)
$m_{aq}^{ads}(eq)$	=	az anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (mg)
$v_a{}^A$	=	a vizsgált anyag mérésére használt aliquot térfogata (cm^3)
$A_{\Delta t_i}$	=	a százalékos adszorpció mértéke adott Dt_i időintervallumban (%)
A_{eq}	=	a százalékos adszorpció adszorpciós egyensúlyi helyzetben (%).

DESZORPCIÓ D (%)

Azt a t_0 időpontot tekintik a deszorpciós kinetikai kísérlet kezdetének, amikor a vizsgált anyagot tartalmazó oldat maximálisan (az adszorpciós egyensúly elérését követően) kinyert térfogatát ugyanolyan térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótolják.

a) *Párhuzamos módszer*

A t_i időpontban megmérik az i ($\left(V_r^i\right)$) próbacsőből vett vizes fázisban lévő vizsgált anyag tömegét, és a deszorbeálódott tömeget az alábbi egyenlet segítségével számítják ki:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

A deszorpciós ekvilibriumban $t_i = t_{eq}$ és ezért $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

A (Δ_{ti}) időszak során deszorbeálódott vizsgált anyag tömege az alábbi egyenlettel számítható ki:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

A százalékos deszorpció kiszámítható:

a t_i időpontra nézve az alábbi egyenlettel:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

és a (Δ_{ti}) időintervallumra nézve az alábbi egyenlettel:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

ahol a fent használt paraméterek jelentése az alábbi:

D_{t_i} = százalékos deszorpció a t_i időpontban (%)

$D_{\Delta t_i}$ = a Δt_i intervallumnak megfelelő százalékos deszorpció (%)

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = a vizsgált anyag deszorbeálodott tömege a t_i időpontban (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = a vizsgált anyag deszorbeálodott tömege a D_{ti} időintervallumban (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = a vizsgált anyag t_i időpontban analitikus módon mért tömege a V_r^i térfogatú oldatban, amelyet az elemzés céljára vettek ki (μg)

m_{aq}^{A} = a vizsgák anyagnak az adszorpciós ekvilibrium elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt a talajban maradt tömege (μg)

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = az anyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi helyzetben (μg)

V_R = az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávolított, és azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$ oldattal pótolt felülúszó-térfogat, (cm^3)

V_r^i = Az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kiemelt oldat térfogata a deszorpciós kinetikai kísérletben (cm^3)

A D_{t_i}, illetve a $D_{\Delta t_i}$ deszorpciós értékeket (a vizsgálat igényei szerint) az idő függvényében grafikusan kell ábrázolni, valamint meg kell határozni azt az időt, amelyre a deszorpciós egyensúly eléréséhez szükség volt.

b) *„Folytatásos” módszer*

Az alábbi egyenletek figyelembe veszik azt, hogy a deszorpciós vizsgálatot megelőző adszorpciós vizsgálatot a vizes fázis kis aliquotáiban ($(v^A{}_a)$) lévő vizsgált anyag mennyiségének mérésével hajtották végre (lásd az „1.9. A vizsgálat végrehajtása” pontban ismertetett soros módszert). Feltételezzük, hogy: a) a felülúszó azon mennyiségét, amelyet a kémcsőből az adszorpciós kinetikai kísérletet követően eltávolítanak, azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal (V_g) pótolják; és b) a vizes fázisnak az adszorpciós kinetikai kísérlet során a talajjal érintkező össztérfogata (V_T) a deszorpciós vizsgálat során konstans marad és kiszámítható az alábbi egyenlettel:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

Egy t_i időpontban:

— A vizsgált anyag mennyiségét egy kivett kis térfogatban ($\left(v_a^D\right)$) meghatározzuk, és a deszorbeálódott tömeg az alábbi egyenlet segítségével kiszámítható:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— A deszorpciós ekvilibriumban $t_i = t_{eq}$ és ezért $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— A százalékos deszorpció D_{t_i} a következő egyenlet segítségével számítható ki:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

Egy adott (Δt_i) időintervallumban:

Minden egyes időintervallumra nézve a deszorbeálódott anyag mennyisége az alábbiak szerint számítható ki:

— az első $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ időintervallumra nézve:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— a második $\Delta t_2 = t_2 - t_1$ időintervallumra nézve:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (22)$$

and

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right]$$

— az n-dik $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$ intervallumra nézve:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{A} \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right] \text{ and} \quad (23)$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$$

Végül, az egyes időintervallumokra vonatkozó százalékos deszorpció $D_{\Delta t_i}$ az alábbi egyenlettel számítható ki:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

a t_i időpontra vonatkozó D_{t_i} százalékos deszorpció az alábbi egyenlettel számítható ki:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

ahol a fent használt paraméterek jelentése az alábbi:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = a talajon adszorbeálva maradó vizsgált anyag tömege a Δt_1, Δt_2…, illetve Δt_n időintervallum után (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = a Δt_1, Δt_2..., illetve Δt_n időintervallum során deszorbeálódott vizsgák anyag tömege (μg)

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = a $\left(\left(v_a^D\right)\right)$ aliquotokban, a t_1, t_2, … illetve t_n időpontban mért tesztanyag tömege (μg)

V_T = a talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata a„folytatásos” mód- szerrel végrehajtott deszorpciós kinetikai kíséri a során (cm^3)

m_{aq}^A = a vizsgált anyagnak az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt visszamaradó tömege (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

V_R = az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően a kémcsőből eltávo- lított felülúszó és azonos térfogatú 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótok térfogat (cm^3)

v_a^D = az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérésére kiemelt aliquot térfogata a „folytatásos” módszerrel végzett deszorpciós kinetikai kísérletben (cm^3)

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

6. függelék

TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓ/DESZORPCIÓ VIZSGÁLATA: ADATKÖZLŐ LAPOK

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Bemért talajmennyiség	g	
Talaj száraz tömege	g	
$CaCl_2$-oldat térfogata	cm^3	
Az oldat névleges végkoncentrációja	$\mu g\ cm^{-3}$	
Az oldat analitikai módszerrel meghatározott végkoncentrációja	$\mu g\ cm^{-3}$	

Az alkalmazott analitikai módszer alapelve:

Az analitikai modell kalibrálása:

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Az alkalmazott analitikai módszertan: Közvetett ☐ Párhuzamos ☐ Közvetlen ☐ Serial ☐

Adszorpciós vizsgálat: vizsgált minták

	Jele	Mértékegysége	Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő	
Kémcsövek száma										
Bemért talajmennyiség	—	S								
Talaj száraz tömege	m_{talaj}	g								
A bemért talajban jelen levő víz (kiszámított) térfogata	V_{ws}	cm^3								
A talaj ekvilibrálásához felhasznált 0,01 M $CaCl_2$-oldal térfogata		cm^3								
Törzsoldat térfogata		cm^3								
A talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata	v_0	cm^3								
A vizsgált oldat kiindulási koncentrációja	C_0	$\mu g.cm^{-3}$								
A vizsgált anyag tömege a vizsgálat kezdetén	m_0	μg								

▼B

	Jele	Mértékegysége	Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő		Ekvilibrációs idő	
Rázatás és centrifugálás után										
KÖZVETETT MÓDSZER										
Párhuzamos módszer										
A vizsgált anyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja a vizes fázisban	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu g.cm^{-3}$								
Folytatásos módszer										
A vizsgált anyag VAa aliquotban mért tömege	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
KÖZVETLEN MÓDSZER										
A vizsgált anyag talajon adszorbeálódott tömege	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Adszorpció kiszámítása										
Adszorpció	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Átlagok										
Adszorpciós koefficiens	K_d	$cm^3.g^{-1}$								
Átlagok										
A szerves széntartalomra számított adszorpciós koefficiens	K_{oc}	$cm^3.g^{-1}$								
Átlagok										

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Adszorpciós vizsgálat: vakpróbák és kontroll

	Jele	Mérték-egysége	Vakpróba		Vakpróba		Kontroll	
Kémcsövek száma								
Bemért talajmennyiség		S					0	0
Víz mennyisége a bemért talajban (számított)		cm^3					—	—
A hozzáadott 0,01 M $CaCl_2$-oldat térfogata		cm^3						
A vizsgált anyag hozzáadott törzsoldatának térfogata		cm^3	0	0				
A vizes fázis össztérfogata (számított)		cm^3					—	—

▼B

	Jele	Mérték-egysége	Vakpróba		Vakpróba		Kontroll	
A vizsgált anyag kiindulási koncentrációja vizes fázisban		$\mu g.cm^{-3}$						
Rázatás és centrifugálás után								
Koncentráció a vizes fázisban		$\mu g.cm^{-3}$						

Megjegyzés: szükség szerint a táblázat további oszlopokkal bővíthető.

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Tömegegyensúly

	Jele	Mérték-egyscége				
Kémcsövek száma						
Bemért talajmennyiség	—	g				
Talaj száraz tömege	m_{talaj}	g				
Viz mennyisége a bemért talajban (számított)	V_{ws}	ml				
A talaj ekvilibrálásához felhasznált 0,01 M $CaCl_2$-oldat térfogata		ml				
Törzsoldat térfogata		cm^3				
A talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata	V_0	cm^3				
A vizsgált oldat kiindulási koncentrációja	C_0	$\mu g.cm^{-3}$				
Ekvilibrációs idő	—	h				

Rázatás és centrifugálás után

A tesztanyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja adszorpciós egyensúlyban	$C_{aq}^{ads}(eq)$	$\mu g.cm^{-3}$				
Ekvilibrációs idő	t_{eq}	h				

Első hígítás oldószerrel

Vizes fázis eltávolított térfogata	V_{rec}	cm^3				
Oldószer hozzáadott térfogata	Δv	cm^3				

Első extrakció oldószerrel

Oldószerben analizált jel	S_{E1}	var.				
A vizsgált anyag koncentrációja az oldószerben	C_{E1}	$\mu g.cm^{-3}$				

▼B

	Jele	Mérték-egyscége				
A talajból és az edény falairól extrahált anyag tömege	m_{El}	$\mu g.cm^{-3}$				
Második hígítás oldószerrel						
Az oldószer eltávolított mennyisége	ΔV_s	cm^3				
Az oldószer hozzáadott mennyisége	$\Delta v'$	cm^3				
Második extrakció oldószerrel						
Oldószerben analizált jel	S_{E2}	van				
A vizsgált anyag koncentrációja az oldószerben	C_{E2}	$\mu g.cm^{-3}$				
A talajból és az edény falairól extrahált anyag tömege	M_{E2}	µg				
A vizsgált anyag két lépésben extrahált össztömege	m_E	µg				
Tömegegyensúly	MB	%				

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Adszorpciós izotermák

	Jele	Mértékegy-sége								
Kémcsövek száma										
Bemért talajmennyiség	—	g								
Talaj száraz tömege	E	g								
Víz térfogata a bemért talajban (számított)	V_{WS}	cm^3								
A talaj ekvilibrálásához felhasznált 0,01 $MCaCl_2$-oldat terfbgata		cm^3								
A hozzáadott törzsoldat térfogata		cm^3								
A talajjal érintkezésben lévő vizes fázis össztérfogata (számított)	V_0	cm^3								
Oldat koncentrációja	C_0	µg •cm^{-3}								
Ekvilibrációs idő	—	ó								

▼B

	Jele	Mértékegysége								
Rázatás és centrifugálás után										
A vizsgált anyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja a vizes fázisban	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Hőmérséklet		°C								
1 g talaj által adszorbeált teszlattyag tömege	$C_s^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regressziós analízis:

A K^{ads}_F értéke:

Az l/n értéke:

Regressziói koefficiens. r_2:

A vizsgált anyag megnevezése:

A vizsgált talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 óra): ..... %

Hőmérséklet: ..... °C

Az alkalmazott analitikai módszertan: Közvetett ☐ Párhuzamos ☐ „Folytatásos” ☐

Közvetlen ☐

Deszorpciós vizsgálat

		Jele	Mértékegysége	Időintervallum	Időintervallum	Időintervallum	Időintervallum
Az adszorpciós lépésből kapott próbacső száma							
A talajon adszorbeált vizsgált anyag tömege, adszorpciós egyensúlyi helyzetben		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
A 0,01 M 0,01 M $CaCl_2$-oldattal pótolt vizes fázis eltávolított mennyiségének térfogata		V_0 V_R	cm^3				
A talajjal érintkezésben levő vizes fázis össztérfogata	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
A vizsgált anyagnak az adszorpciós egyensúlyi helyzet elérését követően, a tökéletlen térfogat helyettesítés miatt fennmaradt tömege		m_{aq}^A	µg				
Deszorpciós kinetika							
A t_i időpontban a talajból deszorbeálódott vizsgált anyag tömege (számított érték)		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Az (i) kémcsőből a vizsgált anyag mérése	PM	V^i_r	cm!				
	SM	V^D_a	cm^3				
A t_i időpontban a talajból deszorbeálódott vizsgált anyag tömege (számított érték)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
A Δti időintervallumban a talajból deszorbeálódott vizsgált anyag tömege (számított érték)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Jele	Mértékegysége	Időinter-vallum	Időinter-vallum	Időinter-vallum	Időinter-vallum
Deszorpciós százalék						
Deszorpció a t_i időpontban	D_{ti}	%				
Deszorpció a Δt_i idóintervallumban	$D_{\Delta t_i}$	%				
Látszólagos deszorpciós koefficiens	K_{des}					

PM: = párhuzamos módszer

SM: = folytatásos módszer

▼B

C.19. **ADSZORPCIÓS EGYÜTTHATÓ BECSLÉSE TALAJON ÉS SZENNYVÍZISZAPON NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)**

1. **MÓDSZER**

E módszer megfelel az OECD TG121-nek (2001).

1.1. BEVEZETÉS

Anyagok talajokon és szennyvíziszapokon mutatott szorpciós (megkötődési) viselkedését a C.18 vizsgálati módszer használatával kísérletileg meghatározott paraméterek révén lehet leírni. Az egyik fontos paraméter az adszorpciós koefficiens, amely az adott anyagnak talajban/iszapban fennálló koncentrációja és ugyanazon anyag vizes fázisban, adszorpciós egyensúlyi helyzetben rögzíthető koncentrációja közötti arányként fejezhető ki. A talaj K_{oc} szervesszén-tartalmára vonatkoztatott adszorpciós koefficiens megmutatja, hogy a vegyi anyag mennyire képes kötődni a talaj vagy a szennyvíziszap szervesanyag-tartalmához, és lehetővé teszi az összehasonlítást különböző vegyi anyagok között. E paraméter értékét a vízoldhatóság és az n-oktanol/víz megoszlási koefficiens közötti korreláció révén lehet megbecsülni (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

Az e vizsgálatban leírt kísérleti módszer nagyhatékonyságú folyadékkromatográfot (HPLC) használ a talajokon és szennyvíziszapokon mutatott K_{oc} adszorpciós koefficiens becsléséhez (8). A becsült eredmények megbízhatóbbak a QSAR módszerrel (9) kaphatóknál. Becslési módszer lévén nem képes teljeskörűen kiváltani a C.18 vizsgálati módszer esetében használt tömeges egyensúlyi kísérleteket. A K_{oc} becsült értékének ismerete azonban hasznos lehet a C.18 módszernek megfelelően végzendő adszorpciós/deszorpciós vizsgálatokhoz szükséges, megfelelő vizsgálati paraméterek kiválasztásakor, a K_d (megoszlási koefficiens) vagy a K_f (Freundlich-féle adszorpciós koefficiens) értékének a 3. egyenlet szerinti kiszámításánál (lásd 1.2. szakasz).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

K_d: a megoszlási koefficiens (szilárd anyag/víz) egy olyan vizsgált anyag „C” egyensúlyi koncentrációértékeinek az arányaként fejezhető ki, amely anyagot egy szorbensből (talaj vagy szennyvíziszap) és egy vizes fázisból álló, kétfázisú rendszerben oldanak fel; ez egy dimenzió nélküli érték, mivel a koncentráció értékét mindkét fázisban tömeg/tömeg fejezik ki. Ha a koncentráció vizes fázisbeli értékét tömeg/térfogat alapon adják meg, akkor a mértékegység ml/g^{-1}. A K_d értéke a szorbens anyag tulajdonságaitól függően változhat, és függhet a koncentrációtól.

$$K_d = \frac{C_{talaj}}{C_{aq}} vagy \frac{C_{iszap}}{C_{aq}} \quad (1)$$

ahol:

C_{talaj} = talajban lévő vizsgált anyag koncentrációja egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$)

C_{iszap} = az iszapban lévő vizsgált anyag koncentrációja egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$)

C_{aq} = a vizes fázisban lévű vizsgált anyag koncentrációja egyensúlyi helyzetben ($\mu g.g^{-1}$, $\mu g.ml^{-1}$).

▼B

K_f: a Freundlich-féle adszorpciós koefficiens a vizsgált anyag talajban vagy szennyvíziszapban mért (x/m) koncentrációjaként határozható meg, akkor, amikor az C_{aq} egyensúlyi koncentráció a vizes fázisban l-gyel egyenlő; a mértékegység $mg.g^{-1}$ szorbens. Ez az érték a szorbens anyag tulajdonságaival együtt változhat.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (2)$$

ahol:

x/m = egyensúlyi helyzetben lévő szorbens anyag m (gramm) mennyiségében elnyelt vizsgált anyag x mennyisége (mg)

l/n = a Freundlich-féle adszorpciós izoterma meredeksége

C_{aq} = a vizsgált anyag koncentrációja vizes fázisban egyensúlyi helyzetben ($\mu g.ml^{-1}$)

$$AtC_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}= a szorbens anyag szervesszén-tartalmában (f_{oc}) kifejezett K_d megoszlási koefficiens vagy K_f Freundlich-féle adszorpciós koefficiens; különösen a nem ionos vegyi anyagok esetében ez egy közelítő pontosságú jelzőszáma az anyag és a szorbens közti adszorpció mértékének, és összehasonlításokat tesz lehetővé különböző vegyi anyagok között. A K_d és K_f mértékegységétől függően a K_{oc} dimenzió nélküli érték lehet, vagy mg × g^{-1} vagy mg × mf^{1} szerves anyag mértékegységgel fejezhető ki.

$$Koc = \frac{Kd}{foc}\left(\text{dimenzió nélküli vagy ml}\cdot g^{-1}\right) \text{vagy} \frac{Kf}{foc}\left(\mu g \cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

A K_{oc} és K_d közötti összefüggés nem mindig lineáris, és ezért a K_{oc} értékei talajonként változhatnak, azonban változékonyságuk a K_d vagy a K_f értékeihez képest kis mértékű.

A K_{oc} adszorpciós koefficiens a (k) kapacitási faktorból vezethető le, felhasználva a kiválasztott referenciavegyületekből levezetett log k' / log K_{oc} kalibrációs görbét.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

ahol:

t_R = a vizsgált- és referenciaanyagok HPLC-s retenciós ideje {perc}

t_0 = a HPLC holtideje (perc) (lásd 1.8.2. szakasz)

P_{OW}: Az oktanol/víz megoszlási koefficiens az n-oktanolban és vízben lévő oldott anyag koncentrációértékeinek az arányaként fejezhető ki: ez dimenzió nélküli érték.

$$P_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. REFERENCIAANYAGOK

A módszer használata előtt meg kell ismerni az anyag szerkezeti képletét, tisztaságát és disszociációs állandóját (ha ez értelmezhető). A vízben és szerves oldószerekben való oldhatóságra, az oktanol/víz megoszlási koefficiensre és a hidrolízis során mutatott tulajdonságokra vonatkozó információk ismerete is hasznos.

▼B

Ahhoz, hogy meg lehessen állapítani egy vizsgált anyag mért HPLC-retenciósidő-adatai és K_{oc} adszorpciós koefficiense közötti korrelációt, előbb meg kell szerkeszteni a log k' / log K_{oc} kalibrációs görbét. Ehhez legalább hat referenciapontot kell használni, egyet-egyet a vizsgált anyag várt értéke alatt, illetve fölött kiválasztva. A módszer pontossága lényegesen javul, ha olyan referenciaanyagokat használnak, amelyek szerkezetüket tekintve hasonlóak a vizsgált anyaghoz. Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, akkor a felhasználónak kell kiválasztania a megfelelő kalibrációs anyagokat. Ebben az esetben általánosabb, strukturálisan heterogén anyagokat kell kiválasztani. A javasolt referenciaanyagok és ezek K_{oc}-értékeinek jegyzéke a függelékben található, az 1. táblázatban a szennyvíziszapra, illetve a 3. táblázatban a talajra vonatkozóan. Más kalibrációs anyagok kiválasztását meg kell indokolni.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

A HPLC módszerhez a kereskedelemben kapható és lipofil és poláros oldalláncokat tartalmazó ciánopropil szilárd fázissal töltött analitikai kolonnákat használnak. Közepesen poláris, szilika alapú állófázis használatos:

–O -Si	$–CH_2 – CH_2 – CH_2$	–CN
szilika	nem poláris közeg	poláris oldallánc

A vizsgálati módszer alapelve hasonló az A.8. módszerhez (megoszlási koefficiens, HPLC módszer). Miközben a vizsgált anyag a mozgófázissal együtt végighalad a kolonnán, a vizsgált anyag reakcióba lép az állófázissal. A mozgó- és állófázis közötti megoszlás eredményeként a vizsgált anyag késleltetetten jelenik meg. A poláris és nem poláris kötőhelyekkel egyaránt rendelkező állófázis kettős összetétele lehetővé teszi a reakció létrejöttét egy adott molekula poláris és nem poláris csoportjaival, hasonló módon ahhoz, ahogyan ez a talaj és a szennyvíziszap mátrixokban lévő szerves anyagoknál is lezajlik. Mindez lehetővé teszi a kolonnánál tapasztalt retenciós idő és a szerves anyag adszorpciós koefficiens közötti összefüggés megállapítását.

A pH-érték komoly hatást gyakorol a szorpciós viselkedésre, különösen a poláris anyagok esetében. A mezőgazdasági hasznosítású talajokban vagy a szennyvíztisztítók tartályaiban a pH-érték általában 5,5 és 7,5 között ingadozik. Az ionképző anyagokra nézve kétféle vizsgálatot kell elvégezni, megfelelő pufferoldatokban mind az ionizált, mind a nem ionizált változattal, de csak olyan esetekben, amikor a vizsgált vegyület legalább 10 százaléka disszociálódik az 5,5–7,5 pH-érték tartományon belül.

Mivel az értékelés céljaira csak a HPLC kolonnában való retenció és az adszorpciós koefficiens közötti összefüggést használják, nincs szükség kvantitatív analitikai módszerre, és csak a retenciós időt kell meghatározni. Ha rendelkezésre áll a referenciaanyagok egy megfelelő készlete és szabványos kísérleti feltételeket biztosítani lehet, akkor a módszer gyors és hatékony módot kínál a K_{oc} adszorpciós koefficiens becsléséhez.

1.5. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A HPCL módszer olyan (jelölt vagy jelöletlen) kémiai anyagok esetében alkalmazható, amelyekre nézve egy megfelelő észlelési rendszer (pl. spektrofotométer, radioaktivitás érzékelő) áll rendelkezésre, és amelyek kellően stabilak a kísérlet végrehajtása alatt. Különösen hasznos lehet e módszer olyan vegyi anyagok esetében, amelyeket nehéz tanulmányozni másfajta kísérleti rendszerekkel (azaz illékony anyagok; olyan anyagok, amelyek nem oldódnak vízben olyan koncentrációban, amit analitikus módszerekkel már mérni lehetne; anyagok, amelyek nagyfokú affinitást mutatnak az inkubációs rendszerek belső felületeivel). A módszer használható olyan elegyek esetében, amelyek nem adnak szétváló elúciós sávokat. Ilyen esetben a vizsgált anyagkeverék vegyületei log K_{oc} értékeinek a felső és alsó határértékeit meg kell adni.

▼B

A szennyeződések olykor megnehezíthetik a HPLC eredmények értelmezését, azonban jelentőségük csekély marad mindaddig, amíg a vizsgált anyagot analitikai módszerekkel egyértelműen be lehet azonosítani és el lehet különíteni a szennyező anyagoktól.

A módszert a függelék 1. táblázatában felsorolt anyagokra validálták, és már alkalmazták egy sor további, az alábbi vegyületcsoportokba sorolt vegyi anyagokra nézve:

— aromás aminok (pl. trifluralin, 4-klór-nilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, N-metilanilin, 1-naftilamin),

— aromás karboxilsavészterek (pl. benzoesavas metilészter, 3,5-dinitrobenzoesavas etilészter),

— aromás szénhidrogének (pl. toluol, xilol, etilbenzol, nitrobenzol),

— aryloxyphenoxypropionsav észterek (pl. diclofop-metil, fenoxaprop-etil, fenoxaprop-P-etil),

— benzimidazol és imidazol fungicidek (pl. karbendazim, fuberidazol, triazoxid),

— karboxilsavamidok (pl. 2-klórbenzamid, N, N-dimetilbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— klórozott szénhidrogének (pl. endoszulfán, DDT, hexaklorobenzol, quintozol, 1,2,3-triklórbenzol),

— szerves foszfortartalmú rovarirtók (pl. azinfosz-metil, disulfoton, fenamifosz, izofenfosz, pirozofosz, sulprofosz, triazofosz),

— fenolok (pl. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklórfenol, 2,4,6-triklórfenol, 1-naftol),

— fenilurea-származékok (pl. izoproturon, monolinuron, pencycuron),

— pigment festékanyagok (pl. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— poliaromás szénhidrogének (pl. acenaftén, naftalin),

— 1,3,5-triazin gyomirtók (pl. prometrin, propazin, simazin, terbutrin),

— triazolszármazékok (pl. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

A módszer nem alkalmazható olyan anyagokra, amelyek akár az eluenssel, akár az állófázissal reakcióba lépnek. Ugyancsak nem alkalmazható olyan anyagokra, amelyek különleges módon lépnek reakcióba a szervetlen komponensekkel (pl. komplexképzés az anyagásványokkal). A módszer nem feltétlenül működik felületaktív anyagok, szervetlen vegyületek és közepesen erős vagy erős szerves savak és bázisok esetén. Az 1,5-től 5-ig terjedő log K_{oc} értékek határozhatók meg. Ionizálható anyagokat pufferolt mozgófázis használatával kell mérni, de óvatosan kell eljárni, hogy elkerüljék a puffer komponensek vagy a vizsgált anyag kicsapódását.

▼B

1.6. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

1.6.1. **Pontosság**

Egy adott vizsgált anyag adszorpciós koefficiensét általában az egyensúlyi módszerrel (lásd a függelék 1. táblázata) meghatározott érték ± 0,5 log egységen belüli pontossággal lehet becsülni. Nagyobb pontosságot akkor lehet elérni, ha a referenciaanyagok strukturálisan rokonságban állnak a vizsgált anyaggal.

1.6.2. **Megismételhetőség**

Az értékek meghatározását legalább kétszer el kell végezni. Az egyedi mérésekből származtatott log K_{oc} értékeknek a 0,25 log egység tartományon belül kell maradniuk.

1.6.3. **Reprodukálhatóság**

A módszer alkalmazásával eddig nyert tapasztalatok alátámasztják a módszer validitását. A HPLC módszer vizsgálata, amelyhez 48 olyan anyagot (főként peszticideket) használtak fel, amelyekre nézve megbízható adatok álltak rendelkezésre a talajon mért K_{oc} értékekről, R = 0,95 korrelációs koefficienset eredményezett (10) (11).

11 laboratórium bevonásával elvégzett összehasonlító vizsgálatra került sor a módszer tökéletesítése és validitása érdekében (12). Az eredményeket a függelék 2. táblázata tartalmazza.

1.7. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. **Az adszorpciós koefficiens előzetes becslése**

A P_{ow} (= K_{ow}) oktanol/víz megoszlási koefficiens és – bizonyos mértékig – a vízoldhatóság az adszorpció mértékének jelzőszámaiként használhatók fel, különösen a nem ionos anyagok esetében, s ennélfogva az értéktartományok előzetes behatárolására alkalmazhatók. A vegyi anyagok több csoportjára vonatkozóan is publikáltak már különféle hasznos korrelációkat (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Készülék**

Egy pulzálásmentes pumpával és egy alkalmas érzékelő készülékkel felszerelt folyadékkromatográfra van szükség. Javasolt egy injektáló hurokvezetékkel felszerelt szelep használata. Kémiailag kötött kereskedelmi cyanopropil szilika alapú töltet használata javasolt (pl. Hipersil és Zorbax CN). Az injektáló rendszer és az analitikai kolonna közé egy, azonos anyagtöltetű előtétoszlopot lehet elhelyezni. A különféle szállítóktól származó kolonnák szétválasztási képessége jelentősen eltérhet egymástól. Iránymutatásként, a következő k' kapacitási faktorokkal rendelkezzen: log k' > 0,0 a log K_{oc} = 3,0, valamint log k' > 0,4 a log K_{oc} = 2,0 érték esetében, ha mozgófázisként metanol és víz 55:45 arányú keverékét használják.

1.7.3. **Mozgófázis**

A már vizsgált többféle mozgófázis közül a következő kettő használata ajánlott:

— metanol/víz (55:45 v/v),

— metanol/0,01 M citrátpuffer, pH-érték 6,0 (55:45 v/v).

▼B

Az elúciós oldat elkészítéséhez HPLC-minőségű metanol és desztillált víz vagy citrátpuffer használatos. A keveréket használat előtt gázmentesíteni kell. Izokratikus elúciót célszerű alkalmazni. Ha a metanol/víz elegy nem felel meg a célnak, ki lehet próbálni más szerves oldószerek és víz keverékeit, pl. etanol/víz vagy acetonitril/-víz keverékeket. Az ionizálható vegyületek esetében pufferoldat használata javasolt a pH-érték stabilizálása érdekében. Ügyelni kell az egyes szerves fázis/puffer keverékek esetében esetleg előforduló csapadék/sókicsapódás és a kolonnatöltet minőségromlásának elkerülésére.

Nem szabad adalékanyagokat (pl. ion-pár reagenseket) használni, mert ezek hatással lehetnek az állófázis szorpciós képességeire. Az állófázis ilyen változásai pedig irreverzibilisek lehetnek. Emiatt az adalékanyagok használatával járó kísérleteket kötelezően külön kolonnában kell végrehajtani.

1.7.4. **Oldott anyagok**

A vizsgált és referenciaanyagokat a mozgó fázisban kell feloldani.

1.8 A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.8.1. **Vizsgálati körülmények**

A mérések során fel kell jegyezni a hőmérsékletet. Hangsúlyozottan javasolt a szabályozott hőmérsékletű oszlop használata, hogy biztosítható legyen a kísérleti körülmények állandó értéken tartása a kalibrációs és becslési műveletek, valamint a vizsgált anyag mérései során.

1.8.2. **A to holtidő meghatározása**

A to holtidő meghatározására két különböző módszer használható (lásd még 1.2. szakasz).

1.8.2.1. *A to holtidő meghatározása egy homológ sor segítségével*

Erről az eljárásról bebizonyosodott, hogy megbízható és szabványos to értékeket eredményez. A részleteket lásd az A.8 vizsgálati módszernél: n-oktanol/víz megoszlási koefficiens, HPLC módszer.

1.8.2.2. *A to holtidő meghatározása olyan inert anyagok által, amelyeknél a kolonnán való áthaladás során nem lép fel retenció*

Ez az eljárás a formamid, urea vagy nátrium-nitrát alapú oldatok befecskendezésén alapul. A méréseket legalább kétszer el kell végezni.

1.8.3 **A tR retenciós idő meghatározása**

A referenciaanyagokat az 1.3. szakaszban leírtaknak megfelelően kell kiválasztani. Retenciós idejük meghatározása érdekében ezeket keverékstandardként lehet beinjektálni, feltéve, hogy bizonyítható, hogy az egyes referenciaanyagok retenciós idejét nem befolyásolja más referenciaanyagok jelenléte. A kalibrálást rendszeres időközönként, naponta legalább kétszer meg kell ismételni, hogy számításba lehessen venni a kolonna teljesítményében esetleg bekövetkező váratlan változásokat. Az a legjobb gyakorlat, ha a kalibrációs célú injektálásokat a vizsgált anyag beinjektálása előtt és után végzik el, azt megerősítendő, hogy a retenciós időtartamok változatlanok. A kolonnák túlterhelésének megelőzése érdekében a vizsgált anyagokat a lehető legkisebb adagokban kell egymástól elkülönítetten beinjektálni, és retenciós idejüket ezután kell meghatározni.

▼B

A mérések megbízhatósága fokozásának érdekében az értékek meghatározását legalább kétszer meg kell ismételni. Az egyedi mérési adatokból származtatott log K_{oc} értékeknek egy 0,25 log egység tartományba kell esniük.

1.8.4. **Értékelés**

A k' kapacitási faktorokat a kiválasztott referenciaanyagok to holtidejéből és tR retenciós idejéből, a 4. egyenlet használatával kell kiszámolni (lásd 1.2. szakasz). A referenciaanyagok log k adatait ekkor a függelék 1. és 3. táblázatában megadott egyensúlyi kísérletekből levezetett log K_{oc} értékekhez viszonyítva kell grafikusan ábrázolni. A grafikon segítségével ekkor a vizsgált anyag log k' értékét lehet felhasználni a log K_{oc} értékének meghatározásához. Ha a ténylegesen kapott eredmények azt mutatják, hogy a vizsgált anyag log K_{oc} értékei kívül esnek a kalibrációs tartományon, akkor a vizsgálatot más, a célnak jobban megfelelő referenciaanyagok használatával meg kell ismételni.

2. **ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS**

A vizsgálati jelentésben a következő információknak kell szerepelniük:

— a vizsgált anyagok és referenciaanyagok megnevezése, tisztaságuk, valamint – adott esetben – pKa értékeik megjelölése,

— a műszer leírása és a vizsgálati körülmények, pl. az analitikai (és az előtét-) kolonnák típusa és méretei, az észlelés eszközei, a mozgófázis (a komponensek aránya és pH-érték közötti kapcsolat), a mérések hőmérséklet-tartománya,

— holtidő és a holtidő meghatározására használt módszer,

— a kolonnába beadagolt vizsgált anyagok és referenciaanyagok mennyisége,

— a kalibráció céljára felhasznált referenciavegyületek retenciós ideje,

— a regresszió egyenes jellemzői (log k' és log K_{oc} között) és a regressziós egyenes grafikonja,

— a vizsgált vegyület átlagos retenciós adatai és becsült log K_{oc} értéke,

— kromatogramok.

3. **SZAKIRODALOM**

(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 (Koc) 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., 17, 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. 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.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel, 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. Kördel, 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. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (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

függelék

1. Táblázat

A talajokra és szennyvíziszapokra vonatkozó K_{oc} értékek és a HPLC kiválasztási módszerrel számított értékek összehasonlítása ([1]), ([2])

Anyag megnevezése	CAS-szám	Log K_{oc} szennyvízi-szapoknál	HPLC	Δ	Log K_{oc} talajoknál	HPLC	Δ
Atrazine	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
Fenantrén	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzoesavas fenilészter	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-Diklóranilin	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), 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), 107 – 119.

2. Táblázat

A HPLC módszer tökéletesítése és validálása érdekében 11 részt vevő laboratórium által végzett összehasonlító vizsgálatok eredményei ([1])

		Log K_{oc}	K_{oc}	Log K_{oc}
		(OECD 106)	(HPLC módszer)	
Atrazine	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	2062 ±64 8	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.o.

▼B

3. Táblázat

Ajánlott referenciaanyagok a talaj adszorpciós adatokra alapozott HPLC kiválasztási módszer alkalmazásához

Referenciaanyag megnevezése	CAS-szám	Log K_{oc} átlag-értékek az egyensúlyi vizs-gálatból	A K_{oc} ad at ok száma	Log S. D.	Forrás
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetilbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metilbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Metilbenzoát	9 3-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
lzoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nitrobenzamid	64 5-09-0	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)
Karbendazim	1060 5-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxid	724 59-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofosz	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalin	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endoszulfán-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiokarb	20 32-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	6340 5-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-triklórbenzol	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
g-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Petition	5 5- 3 8-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pitrazofosz	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
a-endoszulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diklofop-metil	51538-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantrén	8 5-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (keverék)	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizlenten organischer Chemikalien mit der HLPC. UBA R Report No. 106 01044 (1994).
(b) B. V. Oepen. W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere. 22. pp. 285-304.
(c) Az iparág által szolgáltatott adatok.

▼B

C.20. *DAPHNIA MAGNÁN* VÉGZETT REPRODUKCIÓS VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

E reprodukciós toxicitási vizsgálati módszer megfelel az OECD TG 21 l-nek (1998).

1.1. BEVEZETÉS

E vizsgálat elsődleges célja annak felmérése, hogy a vegyi anyagok milyen hatást gyakorolnak a *Daphnia magna* reprodukciós teljesítményére.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK ÉS MÉRTÉKEGYSÉGEK

Szülők: a vizsgálat kezdetén jelen lévő nőstény Daphnia-egyedek, amelyek szaporodási teljesítménye e vizsgálat tárgyát képezi.

Szaporulat: azon fiatal Daphnia-egyedek, amelyek a vizsgálat során születnek a szülőktől.

Legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC): azon legalacsonyabb vizsgálati koncentráció, amelynél a kontrollcsoporttal összevetve megfigyelhető a vizsgált anyag statisztikailag jelentős hatása a reprodukcióra és a szülők mortalitására ($p < 0,05$) a megfigyelt behatási periódusban. Azonban a LOEC-szint feletti valamennyi vizsgálati koncentrációnak olyan ártalmas hatást kell kifejtenie, amely legalább egyenlő a LOEC-szinten megfigyelttel vagy súlyosabb annál. Amennyiben e két feltétel nem teljesíthető, akkor kimerítő magyarázatot kell adni arra, hogy hogyan történt a LOEC (és ennélfogva a NOEC) kiválasztása.

Hatástalan koncentráció: a közvetlenül a LOEC alatti vizsgálati koncentráció, amely – a kontrollcsoporttal való összevetésben – nem fejt ki statisztikailag jelentős hatást ($p < 0,05$), a meghatározott expozíciós időszak alatt.

$\mathbf{EC_x}$: ez a vízben oldott vizsgált anyag azon koncentrációja, amely a *Daphnia magna* reprodukciójában x % csökkenést okoz meghatározott expozíciós időszak alatt.

Belső növekedési ráta: a populáció növekedésének mértéke, amely a reprodukciós teljesítményből és a korspecifikus pusztulásból tevődik össze (20) (21) (22). Az egyensúlyi populációk esetében ez pontosan nulla. A növekedő populációknál pozitív, a csökkenő populációknál negatív. Ez utóbbi nyilvánvalóan nem fenntartható, és végül kihaláshoz vezet.

Érzékelési határ a legalacsonyabb koncentráció, amelyet érzékelni lehet, de számszerűsíteni már nem.

Meghatározási határ: a számszerűsíthetően mérhető legalacsonyabb koncentráció.

Mortalitás: egy állat akkor tekinthető kimúltnak, ha mozdulatlan, azaz ha nem képes úszni, vagy ha a tesztedény enyhe rázogatása után 15 másodpercen belül nem figyelhető meg mozgás a függelékben vagy az utóbélben. (Más meghatározás használata esetén ezt a hozzá tartozó irodalmi hivatkozással együtt kell megadni.)

▼B

1.3. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Fiatal, a vizsgálat kezdetekor 24 órásnál nem idősebb nőstény Daphniákat (a szülőket) a vízhez különféle koncentrációszintekben adagolt vizsgálati anyag hatásának kell kitenni. A vizsgálat időtartama 21 nap. A vizsgálati időszak végén fel kell mérni a vizsgálat végén még életben lévő szülők élő szaporulatának teljes számát. Ez azt jelenti, hogy a vizsgálat során kimúlt szülő állatok szaporulatát ki kell zárni a számításból. A szülők reprodukciós teljesítményét más módokon is ki lehet fejezni (pl. az első utód megjelenésének napjától számítva a naponta egy állatra jutó élő utódok száma), ezt azonban a vizsgálati időszak végén még élő szülőkre jutó élő utódok teljes száma mellett, kiegészítésként lehet jelenteni. A vizsgált anyag hatásának kitett állatok szaporulatát össze kell hasonlítani a kontrollcsoport szaporulatával, a legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC), s ezzel összefüggésben a hatástalan legmagasabb koncentráció (NOEC) szintjének meghatározása érdekében. Ezen túlmenően lehetőség szerint egy regressziós modell segítségével kell az adatokat elemezni azon koncentrációszint becslése érdekében, amely egy x százaléknyi csökkenést okoz a szaporulatban (például EC_{50}, EC_{20}, illetve az EC_{10}).

A jelentésbe bele kell foglalni a szülők túlélési arányát és az első ivadékok megjelenésének idejét is. Vizsgálni lehet továbbá a vizsgált anyag más paraméterekre gyakorolt hatásait is, mint pl. a növekedés (pl. testhossz) és a valószínű belső növekedési ráta.

1.4. A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

Rendelkezésre kell hogy álljanak a *Daphnia magna* fajjal végzett akut toxicitási vizsgálatok eredményei (lásd a C.2. módszer 1. része). Az eredmények a reprodukciós vizsgálatok során hasznosak lehetnek a vizsgálati koncentrációk megfelelő tartományának megállapításában. Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldékonyságát és gőznyomását, és egy olyan megbízható analitikai módszerrel kell rendelkezni a vizsgálati oldatokban lévő anyag számszerű meghatározásához, amelynek visszanyerési hatékonysága és mérési határa ismert.

A vizsgált anyagra vonatkozó azon információkhoz, amelyek hasznosak lehetnek a vizsgálati körülmények megállapításához, tartozik még a szerkezeti képlet, az anyag tisztasága, fénystabilitása, stabilitása vizsgálati körülmények között, pKa és megoszlási koefficiens (n-oktanol/víz) értékek, valamint a biológiai lebonthatóságra vonatkozó vizsgálat eredményei is (lásd a C.4. módszert).

1.5. ÉRVÉNYESSÉGI KRITÉRIUMOK

A vizsgálat érvényességéhez az alábbi teljesítménykritériumoknak kell teljesülniük a kontrollcsoport(ok)ban:

— a vizsgálat végén a szülők (nőstény Daphnia) mortalitási aránya nem haladja meg a 20 %-ot,

— a vizsgálat végén még élő szülők élő szaporulatának átlagos száma >= 60.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Felszerelés**

A vizsgálati edények és minden más, a vizsgálati oldatokkal közvetlenül érintkező más felszerelések üvegből vagy más, kémiailag közömbös anyagból készülnek. A vizsgálati edények általában üveglombikok.

Ezenfelül szükség lehet az alábbi berendezések némelyikére vagy mindegyikére:

— oxigénmérő (mikroelektróddal vagy más olyan berendezés segítségével, amelynek a rendeltetése csekély mennyiségű mintában az oldott oxigén mérése),

▼B

— megfelelő hőmérséklet-szabályozó készülék,

— pH-mérő,

— a vízkeménységet meghatározó készülékek,

— a víz összes szervesszén-koncentrációjának (TOC) vagy a kémiai oxigénigény (COI) meghatározására alkalmas készülék,

— megfelelő berendezés a fény szabályozására és intenzitásának mérésére.

1.6.2. **Vizsgált organizmus**

A vizsgálat során használt állatfaj a *Daphnia magna Straus*. Más Daphnia-fajokat is fel lehet használni, feltéve, hogy azok kielégítik a megfelelő érvényességi kritériumokat (az egyes Daphnia-fajokra jellemző szaporodási kritériumok a kontrollban teljesülnek). Más Daphnia-fajok használata esetén ezeket egyértelműen azonosítani kell és alkalmazásukat meg kell indokolni.

A klónt lehetőleg genotípusos meghatározással kell beazonosítani. Kutatások (1) kimutatták, hogy az „A" Klón (amely a franciaországi IRCHA-ból származik) (3) reprodukciós teljesítménye következetesen kielégíti az e módszerben leírt feltételek mellett tenyésztett, a vizsgálatot túlélő egyes szülőkre átlagosan jutó >= 60 utód érvényességi kritériumot. Emellett azonban más klónok is elfogadhatók, feltéve, hogy a Daphnia tenyészetről kimutatható, hogy kielégíti a vizsgálat érvényességi kritériumait.

A vizsgálat kezdetekor az állatok nem lehetnek idősebbek 24 óránál, és nem származhatnak az első szaporulatból. Az állatoknak egészséges törzstenyészetből kell származniuk (azaz nem mutathatják a stressz jeleit, mint pl. magas mortalitás, hímek vagy ephippia jelenléte, késedelem az első szaporulat létrehozásában, színtelen állatok stb.). A törzstenyészet állatait hasonló tenyésztési körülmények között kell tartani (megvilágítás, hőmérséklet, közeg, táplálék és állatok mennyisége térfogategységre számolva), mint a vizsgálat céljaira alkalmazandókat. Ha a vizsgálat során használandó tenyészfolyadék jellemzői eltérnek azon közeg jellemzőitől, amelyben a Daphniákat szokásos módon tenyésztik, akkor megfelelő egy szokásosan mintegy háromhetes akklimatizációs időszak biztosítása a vizsgálat előtt (azaz egy generációnyi idő), a szülők stresszmentesítése érdekében.

1.6.3. **Tenyészfolyadék**

Javasolt egy teljeskörűen meghatározott tenyészfolyadék használata a vizsgálat során. Így elkerülhető az adalékanyagok (pl. alga, talajkivonatok stb.) használata, amelyeket nehéz jellemezni, és mindez elősegíti a laboratóriumok közötti szabványosítás lehetőségét. E célra az Elendt M4 (4) és M7 tenyészfolyadék (lásd az 1. függeléket) bizonyult alkalmasnak. Azonban másfajta tenyészfolyadékok (pl. (5) és (6)) is elfogadhatók, feltéve, hogy a Daphnia tenyészet teljesítménye bizonyíthatóan kielégíti a vizsgálat validitási kritériumait.

Nem definiált adalékokat tartalmazó tenyészfolyadékok használata esetén az ilyen adalékokat egyértelműen meg kell határozni, és megfelelő információkat kell megadni a vizsgálati jelentésben összetételükről és különösen a széntartalmukról, mert az hozzájárulhat az alkalmazott etetéshez. Javasolt a szerves adalékot tartalmazó törzsoldat összes szerves széntartalmának (TOC) és/vagy a kémiai oxigénigényének (COI) meghatározása, és annak becslése, hogy ez mennyivel járul hozzá az elkészített tesztoldat TOC/COI tartalmához. Javasolt a tenyészoldat (algák hozzáadása előtti) TOC szintjét 2 mg/l alatt tartani (7).

▼B

Fémtartalmú anyagok vizsgálatakor fontos annak felismerése, hogy a tesztfolyadék tulajdonságai (pl. keménységi fok, kelátképző képesség) hatással lehetnek a vizsgálati anyag toxicitására. Emiatt kívánatos a teljeskörűen meghatározott tenyészfolyadék használata. Jelenleg azonban a *Daphnia magna* hosszú távú tenyésztésére alkalmasnak ítélt, teljeskörűen meghatározott tenyészoldat az Elendt M4 és M7. Mindkét tenyészoldat tartalmaz EDTA kelátképző komponenst. Az eddigi vizsgálatok (2) kimutatták, hogy – szemben az EDTA-t egyáltalán nem tartalmazó közegekkel – a kadmium „látszólagos toxicitása" általában alacsonyabb, amennyiben a reprodukciós vizsgálatot az M4 és M7 közegben végzik el. Ezért az M4 és M7 használata nem javasolt a fémtartalmú anyagok vizsgálatához, és célszerű kerülni az ismert kelátképző szereket tartalmazó másfajta közegek használatát is. A fémtartalmú anyagok vizsgálatához tanácsos alternatív közeg használata, mint pl. az EDTA-t nem tartalmazó, ASTM szerint előállított kemény édes művíz (7), hozzáadott tengeri algakivonattal (8). Az ASTM szerint előállított kemény édes művíz és az algakivonat ilyen kombinációja is alkalmas a *Daphnia magna* hosszú távú tenyésztéséhez és vizsgálatához (2), bár így is kifejt egy enyhe kelátképző hatást a beadagolt tengerialga-kivonatban megtalálható szerves komponens következtében.

A vizsgálat kezdetekor és annak során az oldottoxigén-koncentráció 3 mg/l fölött van. A pH-értéknek a 6–9 tartományba kell esnie, és az nem változhat egyik vizsgálat során sem 1,5 egységnél nagyobb mértékben. Javasolt a 140 mg/l $CaCO_3$-nál nagyobb keménység használata. Az e szintet elérő és ezt meghaladó feltételek mellett elvégzett vizsgálatok bizonyították a szaporodási képesség összhangját a validitási kritériumokkal (9) (10).

1.6.4. **Vizsgálati oldatok**

A kiválasztott koncentrációnak megfelelő vizsgálati oldatokat rendszerint a törzsoldat hígításával készítik el. A törzsoldatokat lehetőleg az anyagnak a tesztoldatban való feloldásával kell elkészíteni.

Egyes esetekben szerves oldószerekre vagy diszpergálószerekre van szükség a megfelelő koncentrációjú törzsoldat létrehozásához, de lehetőség szerint kerülni kell az ilyen anyagok használatát. Az alkalmas oldószerek példái: aceton, etanol, metanol, dimetilformamid és a trietilénglikol. Alkalmas diszpergálószer lehet például: Cremophor RH40, metilcellulóz 0,01 % és a HCO-40. A vizsgálati oldatokokban lévő vizsgált anyag semmiképpen sem haladhatja meg a vizsgálati közegben való oldékonyság határértékét.

Az oldószerek használatára a vízbe pontosan adagolható törzsoldat előállítása érdekében kerül sor. A végső vizsgálati közegben javasolt koncentrációjuknál (azaz <= 0,1 ml/l) a fent felsorolt oldószerek nem gyakorolnak toxikus hatást, és nem fokozzák a vizsgált anyag vízoldhatóságát.

A diszpergálószerek segíthetnek a pontos adagolásban és diszperzióban. A végső vizsgálati közegben javasolt koncentrációjuknál (azaz <= 0,1 ml/l) a fent felsorolt diszpergálószerek nem gyakorolnak toxikus hatást, és nem fokozzák a vizsgált anyag vízoldékonyságát.

▼B

1.7. A VIZSGÁLAT ELRENDEZÉSE

A kezelések vizsgálati edények közötti elosztását és a vizsgálati edények összes későbbi kezelését véletlenszerű sorrendben kell végezni. Az ebből eredő hibákat a koncentrációhatásnak tulajdonít-hatjuk. Különösen igaz ez, ha a kísérleti egységeket kezelési vagy koncentráció szerinti sorrendben vizsgálják, s ekkor egyes, az idővel összefüggő hatások (mint pl. a kezelő személy fáradtsága vagy más jellegű hibák) jelentősebb hatásokat eredményezhetnek magasabb koncentrációknál. Továbbá, ha a vizsgálati eredményeket valószínű-síthetően befolyásolja a vizsgálat egy kezdeti vagy környezeti vonatkozású feltétele – pl. a laboratóriumon belüli elhelyezés –, akkor fontolóra kell venni a vizsgálat leállítását.

1.8. VIZSGÁLAT

1.8.1. **A vizsgálat körülményei**

1.8.1.1. *Időtartam*

A vizsgálat időtartama 21 nap.

1.8.1.2. *Tesztállatok elrendezése*

Minden, egyenként 50–100 ml vizsgálati közeget tartalmazó vizsgálati edénybe egy szülő kerül.

Néha szükségessé válhat nagyobb térfogatok használata a vizsgált anyag koncentrációjának meghatározására használt analitikai eljárás követelményeinek a teljesítése érdekében, bár a koncentráció párhuzamos edényben is mérhető. Amennyiben 100 ml-nél nagyobb térfogatot használnak, akkor szükségessé válhat a Daphniáknak adott táplálékadag növelése, a megfelelő táplálékmennyiség és a validitási kritériumok betartásának biztosítása érdekében. Átfolyásos vizsgálatok esetében – műszaki okokból – számba lehet venni alternatív vizsgálati koncepciók kialakítását is (pl. négy, egyenként tíz állatból álló csoport behelyezése egy nagyobb tesztelő térfogatba), azonban a vizsgálati koncepció minden változtatásáról be kell számolni.

1.8.1.3 *Az állatok száma*

A félstatikus vizsgálatok esetében minden egyes koncentrációszintnél legalább tíz, egyedileg elhelyezett állatra, továbbá a kontrollcsoportokban is legalább tíz állatra van szükség.

Az átfolyásos vizsgálatokhoz célszerű minden egyes koncentrációszinthez tartozóan negyven állatot négy, egyenként tíz állatból álló csoportba osztani (1). Kisebb számú vizsgálati egyed is felhasználható, ez esetben koncentrációszintenként minimum húsz állat bevonása javasolt, amelyeket egyenlő létszámban kell felosztani legalább két edénybe (pl. négy párhuzamos, egyenként öt darab Daphniával). Meg kell jegyezni, hogy amennyiben az állatokat csoportokban tartják, akkor lehetetlen a szaporulatot úgy kifejezni, mint a vizsgálat végén még életben lévő szülő élő utódainak összlétszáma, ha közben egyes szülők elpusztulnak. Ezen esetekben a szaporulatot a „vizsgálat kezdetekor jelenlévő szülőkre jutó élő szaporulat összlétszáma” formájában lehet kifejezni.

1.8.1.4. *Táplálék*

A félstatikus vizsgálatoknál lehetőleg naponta kell a táplálékot beadni, de legalább hetente háromszor (azaz a tesztoldatok cseréjével megegyezően). Az ettől való eltéréseket (pl. az átfolyásos vizsgálatoknál) jelezni kell.

▼B

A vizsgálat során a szülőknek beadott étrendet lehetőleg a következő élő algasejtekből (egy vagy több felhasználásával) kell összeállítani: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (napjainkban *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) és *Scenedesmus subspicatus*. A beadott étrendet az egyes szülőknek biztosítandó szerves szén (C) mennyiségére kell alapozni. Kutatások (12) bizonyították, hogy a *Daphnia magna* esetében a 0,1 és 0,2 mg C/Daphnia/nap közötti adagok elegendőek a validitási kritériumokat kielégítő megfelelő szaporulatszám eléréséhez. Az adagolást a vizsgálat időtartama alatt vagy egyenletesen lehet végezni, vagy, amennyiben megfelelőbbnek látszik, akkor kezdetben egy alacsonyabb szint alkalmazható, majd az fokozatosan növelhető, figyelembe véve a szülők növekedésének ütemét. Ebben az esetben is az adagolásnak mindenkor meg kell maradnia a 0,1–0,2 mg C/Daphnia/nap tartományon belül.

Amennyiben helyettesítő méréseket alkalmaznak (pl. algasejtszám vagy fényelnyelés) az élelemadagban szükséges széntartalom adagolása érdekében (célszerűségi okokból, hiszen a széntartalom mérése időigényes elfoglaltság), úgy minden egyes laboratóriumnak ki kell dolgoznia a saját nomogramját, amely az algatenyészet széntartalmával kapcsolatos helyettesítő paraméterekre vonatkozik (lásd a 2. függelékben a nomogramok elkészítéséhez adott tanácsokat). A nomogramokat évente legalább egyszer ellenőrizni kell, vagy még gyakrabban, amennyiben időközben megváltoznak az algatenyészeti feltételek. A széntartalom helyettesítő mérésére a fény elnyelés vizsgálata jobb módszernek bizonyult, mint a sejtek száma (13).

A Daphniáknak egy koncentrált algaszuszpenziót kell adni, hogy elkerüljük a hígulást a tesztedényekben. Az algakoncentrátumot centrifugálással lehet nyerni, amit desztillált vízben, ionmentes vízben vagy Daphnia tenyészfolyadékban történő reszuszpenzió követ.

1.8.1.5. *Megvilágítás*

16 órán keresztül, 15–20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ szintet meg nem haladó fényerejű megvilágítás.

1.8.1.6. *Hőmérséklet*

A vizsgálati közeg hőmérséklete 18–22 °C között van. Emellett a hőmérséklet – lehetőség szerint – egyik vizsgálat esetében sem változik e tartományon belül 2 °C-nál nagyobb mértékben (pl. 18–20, 19–21 vagy 20–22 °C). Helyes módszer lehet egy további vizsgálati edényt a hőmérséklet alakulásának nyomon követésére beállítani.

1.8.1.7. *Levegőztetés*

A vizsgálati edényeket tilos a vizsgálat során levegőztetni.

1.8.2. **Vizsgálati koncentráció**

Szokásos esetben legalább ötfajta olyan vizsgálati koncentrációt kell geometrikus sorban elrendezni, amelyek egymástól lehetőleg egy 3.2-es szorzófaktornál jobban nem különböznek, és minden vizsgálati koncentrációhoz megfelelő számú párhuzamost kell használni (lásd 1.8.1.3. szakasz). Ötnél kevesebb vizsgálati koncentráció használatát indokolni kell. Az anyagokat nem szabad a vizsgálati közegben való oldékonysági limitjük felett vizsgálni.

▼B

A koncentrációtartomány határainak meghatározása során az alábbiakat kell szem előtt tartani:

(i) Amennyiben a cél a LOEC/NOEC érték megállapítása, akkor a legalacsonyabb vizsgálati koncentrációnak kellően alacsonynak kell lennie ahhoz, hogy a termékenység mértéke ezen koncentrációnál ne legyen lényegesen alacsonyabb, mint a kontrollcsoportban. Ellenkező esetben a vizsgálatot egy csökkentett legalacsonyabb koncentrációszinten meg kell ismételni.

(ii) Amennyiben a cél a LOEC/NOEC érték megállapítása, akkor a legmagasabb vizsgálati koncentrációnak kellően magasnak kell lennie ahhoz, hogy a termékenység mértéke ezen koncentrációnál lényegesen alacsonyabb legyen, mint a kontrollcsoportban. Ellenkező esetben a vizsgálatot egy megnövelt legmagasabb koncentrációszinten meg kell ismételni.

(iii) Amennyiben a reprodukcióra gyakorolt hatásokra vonatkozó EC_x-t kívánjuk meghatározni, akkor tanácsos kellően nagy koncentrációértékeket használni az EC_x megfelelő konfidenciaszinten történő meghatározása érdekében. Amennyiben a reprodukcióra gyakorolt hatásokra vonatkozó EC_{50}-t kell felbecsülni, akkor tanácsos, hogy a legmagasabb vizsgálati koncentráció ezen EC_{50}-nél magasabb legyen. Bár ellenkező esetben is lehetséges az EC_{50} megállapítása, a konfidenciatartomány nagyon széles lesz, és emiatt fennáll annak a veszélye, hogy nem lehet kielégítően értékelni az alkalmazott modell megfelelőségét.

(iv) A vizsgálati koncentráció tartományából lehetőleg ki kell hagyni minden olyan koncentrációt, amely statisztikailag jelentős hatást gyakorol a felnőtt egyedek túlélésére, mivel ez megváltoztatná a vizsgálat jellegét, és az egyszerűen a reprodukciós teljesítmény megállapítására irányuló vizsgálatból egy komplexebb statisztikai elemzést megkövetelő, kombinált reprodukciós és mortalitási vizsgálat alakulna ki.

A vizsgált anyag toxicitására vonatkozó előzetes ismeretek (pl. egy akuttoxicitás-vizsgálatból és/vagy koncentráció meghatározására vonatkozó előzetes vizsgálatokból származók) segíthetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásában.

Amennyiben oldószert vagy diszpergálószert használnak a vizsgálati oldatok elkészítésének elősegítéséhez (lásd 1.6.4. szakasz), akkor a vizsgálati edényekben mért végső koncentráció nem lehet magasabb 0,1 ml/l-nél, és értékének azonosnak kell lennie valamennyi vizsgálati edényben.

1.8.3. **Kontrollcsoportok**

A vizsgált anyaggal kezelt vizsgálati sorozatokkal párhuzamosan a vizsgálati közeg egy kontrollcsoport-sorozatát és – adott esetben – egy, oldószert vagy diszpergálószert tartalmazó kontrollcsoport-sorozatot kell beállítani. Ebben az esetben az oldószer vagy diszpergálószer koncentrációja azonos a vizsgált anyagot tartalmazó edényekben használt koncentrációval. Megfelelő számú párhuzamost kell használni (lásd 1.8.1.3. szakasz).

Egy jól végrehajtott vizsgálat során általában a kontrollcsoportban lévő egy szülőre jutó élő szaporulat variációs koefficiense az átlagos szám körül <= 25 %, ha a szülőket elkülönítve tartják a tesztelés során.

1.8.4. **A vizsgálati közeg megújítása**

A közeg megújításának gyakorisága a vizsgált anyag stabilitásától függ, azonban hetente legalább három csere szükséges. Amennyiben az előzetes stabilitási vizsgálatok (lásd 1.4. pont) azt mutatták, hogy a vizsgált anyag koncentrációja nem stabil (azaz kívül esik a nominál koncentráció 80–120 %-os tartományán, vagy a kiinduláskor mért koncentráció 80 %-a alá csökken) a két megújítás közötti maximális időtartam (azaz három nap) alatt, úgy számba kell venni a vizsgálati közeg gyakoribb megújításának lehetőségét vagy egy átfolyásos vizsgálat alkalmazását.

▼B

Amennyiben a közeget félstatikus vizsgálatok során megújítják, akkor a vizsgálati edényekből egy második sorozatot is be kell állítani, és a szülőket pl. egy megfelelő átmérőjű üvegpipetta segítségével kell áthelyezni. A Daphniákkal együtt áthelyezett vizsgálati közeg mennyiségét a minimumra kell csökkenteni.

1.8.5. **Megfigyelések**

A vizsgálat során tett megfigyelések eredményeit eredménylapokon kell rögzíteni (lásd a példákat a 3. és 4. függelékben). Amennyiben más mérések elvégzése is követelmény (lásd 1.3. és 1.8.8. pont), akkor további megfigyelések elvégzése is szükséges lehet.

1.8.6. **Utódok**

Az egyes szülőktől származó utódokat lehetőleg naponta ki kell emelni és meg kell számlálni az első utódnemzedék megjelenésének napjától kezdve, annak megakadályozására, hogy a kicsik elfogyasszák a felnőtteknek szánt táplálékot. E módszer alkalmazásában csak az élő utódokat kell megszámlálni, de feljegyezhető az abortált peték és az elhullott ivadékok számát is.

1.8.7. **Mortalitás**

Lehetőleg naponta fel kell jegyezni a szülő állatok mortalitását, legalább az utódok megszámlálásával megegyező gyakorisággal.

1.8.8. **Egyéb paraméterek**

Bár e módszert alapvetően a reprodukcióra gyakorolt hatások felmérése érdekében dolgozták ki, általa azonban más hatások is kellő részletességgel számszerűsíthetők, statisztikai elemzéseket lehetővé téve. A növekedési ütem mérése igen kívánatos cél, mert ezzel információk nyerhetők az esetleges szubletális hatásokról, amely hasznosabb lehet a kizárólag a reprodukciós hatásokra irányuló méréseknél; a szülők hosszának (azaz a léctüske nélkül mért testhossznak) a mérése javasolt a vizsgálatok végén. A többi, mérhető vagy számítható paraméter közé tartozik az első utódnemzetség (majd a következő csoportok) megjelenéséig eltelt idő, az egy szülőre jutó utódok száma és mérete, az abortált utódok száma, hímek vagy ephippia jelenléte és a populáció belső növekedési üteme.

1.8.9. **Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága**

Az oxigénkoncentrációt, a hőmérsékletet, a keménységet és a pH-értéket hetente legalább egyszer mérni kell, a közeg megújítása előtt és után, a kontrollcsoportokban és a legmagasabb vizsgáltanyag-koncentrációt tartalmazó edényekben.

A vizsgálat során szabályos időközönként meg kell határozni a vizsgáltanyag-koncentrációit.

A félstatikus vizsgálatok során, amennyiben a vizsgált anyag koncentrációja a nominális koncentráció ± 20 százalékos sávján belülre várható (azaz a 80–120 %-os sávon belül; lásd 1.4. és 1.8.4. pont), minimális intézkedésként javasolt a legmagasabb és a legalacsonyabb vizsgálati koncentrációk elemzése, az anyag frissen elkészített és a kicserélés idején meglévő állapotában, a vizsgálat első hete során, egy alkalommal (azaz az elemzéseket az azonos oldatból vett mintán kell elvégezni; először, amikor az oldat frissen elkészült, majd a megújítás alkalmával). E meghatározásokat ezt követően legalább hetente egyszer meg kell ismételni.

▼B

Az olyan vizsgálatok során, ahol a vizsgált anyag koncentrációja nem várható a nominális koncentráció ± 20 százalékos sávján belülre, elemezni kell az összes vizsgálati koncentrációt a frissen elkészült oldatoknál és a megújítás alkalmával. Azonban az olyan vizsgálatok esetében, ahol a vizsgált anyag kezdetkor mért koncentrációja nem marad meg a nominális koncentráció ± 20 százalékos sávján belül, viszont elégséges bizonyíték hozható fel annak bemutatására, hogy a kezdeti koncentrációk megismételhetők és stabilak (azaz a kezdeti koncentrációértékek 80–120 %-os tartományán belül vannak), a kémiai jellegű méréseket a vizsgálat 2. és 3. hetében a legmagasabb és a legalacsonyabb vizsgálati koncentrációk meghatározására lehet lecsökkenteni. Mindegyik esetben a vizsgált anyag koncentrációjának a megújítást megelőző meghatározását csak minden egyes vizsgálati koncentráció egyetlen másodpéldányán kell elvégezni.

Az átfolyásos vizsgálatok esetében megfelelő a félstatikus vizsgálatoknál leírtakhoz hasonló mintavételi eljárás alkalmazása (azonban a „régi” oldatok mérése nem alkalmazható ezen esetben). Az első hét során azonban tanácsos lehet a mintavételi esetek számát megnövelni (pl. három méréssorozatra), a vizsgálati koncentrációk stabilitásának biztosítása érdekében. Az ilyen típusú vizsgálatok esetében a hígítóvíz és a vizsgált anyag átfolyási sebességét naponta kell ellenőrizni.

Amennyiben bizonyítható, hogy a vizsgálandó anyag koncentrációja a vizsgálat teljes időtartama alatt mindvégig sikeresen a nominális vagy a kezdetkor mért koncentráció ± 20 százalékán belül marad, akkor az eredményeket a nominális vagy a kezdeti értékekre lehet alapozni. Ha a nominális vagy a kezdeti koncentrációhoz képest az eltérés nagyobb ± 20 százaléknál, akkor az eredményeket az idő függvényében kifejezett súlyozott átlaghoz képest lehet kifejezni (lásd az 5. függelékben).

2. ADATOK ÉS JELENTÉSKÉSZÍTÉS

2.1. AZ EREDMÉNYEK KIÉRTÉKELÉSE

E vizsgálat célja annak megállapítása, hogy a vizsgált anyag milyen hatást gyakorol a vizsgálati időszak végén még életben lévő szülők élő utódainak összlétszámára. Az egy szülőre jutó utódok összlétszámát minden egyes vizsgálai edényre (illetve párhuzamosra) nézve ki kell számítani. Ha valamely párhuzamosban a szülő elpusztul a vizsgálat során, vagy kiderül róla, hogy hím, akkor az ilyen párhuzamost ki kell hagyni az elemzésből. Az elemzést ekkor ugyanazon koncentráció csökkentett számú párhuzamosára kell alapozni.

A vegyszerek reprodukciós képességre gyakorolt hatásaira vonatkozó LOEC – és ennélfogva a NOEC – értékének meghatározásához ki kell számítani minden koncentráció összes párhuzamosában az átlagos reprodukciós teljesítményt és a standard deviációt; e számítást varianciaelemzéssel (ANOVA) lehet elvégezni. Ekkor az egyes koncentrációk átlagát egy megfelelő többtényezős módszer segítségével össze kell vetni a kontrollcsoport középértékeivel. Ehhez a Dunnett- vagy a Williams-féle vizsgálatok megfelelőek lehetnek (14) (15) (16) (17). Ellenőrizni kell, hogy a varienciahomogenitására vonatkozó ANOVA-hipotézis megfelelő-e. Javasolt, hogy ezt a formális tesztelés (18) helyett inkább grafikus ábrázolási módszer segítségével végezzék el; a Bartlett-féle vizsgálat szintén megfelelő. Ha a homogenitási feltétel nem teljesül, akkor az ANOVA-t megelőzően az eredmények transzformálását kell elvégezni a varienciahomogenitás biztosítására, vagy súlyozott ANOVA-t kell használni. Ki kell számítani és jegyzőkönyvezni kell az ANOVA használatával kimutatható hatás (azaz a legkevésbé szignifikáns különbség) nagyságát.

▼B

Azon koncentráció becsléséhez, amely a reprodukciós teljesítmény 50 %-os csökkenését okozza (EC_{50}) egy alkalmas, pl. egy logisztikus görbét kell használni, amelyet a statisztikai eljárással kapott adatokra kell illeszteni, pl. a legkisebb négyzetek elve alapján. A görbe paramétereit úgy kell meghatározni, hogy az EC_{50} és annak standard hibája közvetlenül felmérhető legyen. Ez jelentősen megkönnyíti a EC_{50} konfidenciatartomány kiszámítását. Hacsak nem szólnak különösen erős érvek az eltérő konfidenciatartományok alkalmazása mellett, akkor kétoldalú 95 %-os konfidenciatartományokat kell megszabni. Az illeszkedési eljárásnak lehetőleg olyannak kell lennie, hogy egyben biztosítsa az illeszkedés hiánya szignifikáns becslésének eszközét. Ezt el lehet végezni grafikus módon, vagy úgy, hogy a négyzetek maradékösszegét felosztjuk „illeszkedés hiánya" és „tisztán hiba komponensek" elemekre, és elvégezzük az illeszkedés hiányára vonatkozó szignifikanciavizsgálatot. Mivel a magas szintű szaporodást eredményező kezelések valószínűleg nagyobb mértékű varianciát idéznek elő az utódok számában, mint az alacsony szaporodást eredményező kezelések, számba kell venni a megfigyelt értékek megfelelő súlyozását, hogy érzékeltetni lehessen a különböző, kezelésben részesülő csoportok eltérő varianciáit (további háttér-információkat lásd a (18) szakirodalomban).

A végső körvizsgálatból (2) kapott adatok elemzése alapján egy logisztikus görbe hozzáigazítására került sor az alábbi modell használatával, bár más, alkalmas módszerek is használhatók:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

ahol:

Y = a vizsgálat végén az egy életben maradt szülőre jutó utódok összlétszáma (külön számítva minden egyes edényre)

X = az anyag koncentrációja

c = az utódok várható száma, amennyiben x = 0

X_0 = az EC_{50} értéke a populációban

b = a meredekséget jellemző paraméter

E modell valószínűleg igen sok helyzetben megfelel, azonban előfordulnak olyan vizsgálatok, amelyekre nem alkalmazható. A fentiekben javasolt módon ellenőrizni szükséges a modell validitását az adott helyzetre. Egyes esetekben, amikor az alacsony koncentrációk fokozott hatásokat váltanak ki, egy hormesis-modell alkalmasnak bizonyulhat (19).

Más, a koncentrációhoz kötődő hatások, mint az EC_{10} vagy EC_{20} becslését is el lehet végezni, bár előnyös lehet az EC_{50} becsléséhez felhasznált modellhez képest a paraméterek egy másfajta meghatározása.

2.2. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentés a következőket tartalmazza:

2.2.1 **A vizsgált anyag**

— fizikai állapota és releváns fizikai-kémiai tulajdonságai,

▼B

— a kémiai azonosítási adatok, beleértve a tisztaságot.

2.2.2. **Vizsgált fajok**

— a klón (meg kell jelölni, ha a genetikailag tipizált), a szállító vagy eredet (amennyiben ismert) és az alkalmazott tenyésztési körülmények. Jelenteni és indokolni kell, ha a *Daphnia magnától* eltérő fajt használnak.

2.2.3. **Vizsgálati körülmények**

— az alkalmazandó vizsgálati eljárás (pl. fél statikus vagy átfolyásos, térfogat, az egy literre jutó Daphnák számában kifejezett terhelés),

— fény-sötét periodicitás és fényintenzitás,

— a vizsgálat kialakítása (pl. párhuzamosok száma, párhuzamosonkénti szülőszám),

— a felhasznált tenyészfolyadék részletes leírása,

— hozzáadott szerves anyagok (amennyiben ilyenre sor kerül), beleértve azok összetételét, eredetét, elkészítési módját, a törzsoldat készítmények TOC/COI tartalmát, a vizsgálati közegben mutatkozó TOC/COI becslését,

— részletes információk az etetésről, beleértve a mennyiséget (mg C/Daphnia/nap) és az ütemezést (pl. táplálékok típusai), beleértve az algáknál a speciális elnevezést/fajt, továbbá – amennyiben ismert – a törzset és a tenyésztési körülményeket,

— a törzsoldat elkészítésének módszere és megújításának gyakorisága (az esetleg használt oldószer vagy diszpergálószer megnevezését és koncentrációját meg kell adni).

2.2.4. **Eredmények:**

— a vizsgált anyag stabilitására vonatkozó előzetes vizsgálatok eredményei,

— a nominális vizsgálati koncentrációk és az összes olyan elemzés eredménye, amelyek célja a vizsgált anyag vizsgálati edényekben mért koncentrációjának a meghatározása (lásd a mintaadatlapokat a 4. függelékben); az analízis visszanyerési hatékonyságát és a meghatározás korlátait is jegyzőkönyvezni kell,

— a vizsgálati edényekben lévő víz minősége (azaz pH-érték, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, TOC és/vagy COI értékek és keménység, adott esetben) (lásd az eredménylapokat a 3. függelékben),

— az élő utódok teljes nyilvántartása minden egyes szülőnél (lásd az eredménylapokat a 3. függelékben),

— az elhullott szülők száma és az elhullás bekövetkezésének a napja (lásd az eredménylapokat a 3. függelékben),

— a kontrollcsoportbeli szaporodási képesség variációs koefficiense (a vizsgálati időszak végén az egy élő szülőre jutó élő utódok összlétszámára alapozva),

— a vizsgálati időszak végén az egy szülőre jutó élő utódok teljes számát ábrázoló grafikon (minden párhuzamosban), a vizsgált anyag koncentrációjának függvényében,

— a reprodukcióra vonatkozó, legalacsonyabb megfigyelhető hatást okozó koncentráció (LOEC), beleértve a felhasznált statisztikai módszerek leírását, és annak jelzését, hogy milyen mértékű hatást lehetett kimutatni, továbbá a szaporodásra már nem hatásos koncentráció (NOEC); szükség esetén bele kell foglalni a jelentésbe a szülők mortalitására vonatkozó LOEC/-NOEC értékeket is,

▼B

— szükség esetén a reprodukcióra vonatkozó EC_x és a konfidenciatartomány, valamint a számításhoz használt, illesztett modell grafikonja, a dózisreakció görbe meredeksége és a standard hibája,

— más megfigyelt biológiai hatások vagy egyéb mérések: jelenteni kell minden megfigyelt vagy mért más jellegű biológiai hatást (pl. szülők növekedése), a megfelelő indoklással együtt,

— az előírt vizsgálati módszertől való bármely eltérés magyarázata.

3. **SZAKIRODALOM**

(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, Ohi o.

(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, Macroinvertebrates 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. Lokke, 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. 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, 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 Biology, New York, pp. 532.

(22) Meyer J. 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

1. függelék

TELJESKÖRŰEN MEGHATÁROZOTT ELENDT M7 ÉS M4 KÖZEG ELŐÁLLÍTÁSA

Akklimatizálás az elendt M7 ás M4 közeghez

Egyes laboratóriumok nehézségekbe ütköztek, amikor Daphniát próbáltak átvinni M4 (1) és M7 közegbe. Fokozatos akklimatizálással (azaz a saját közegből előbb 30, majd 60, végül 100 százalékos Elendt közegbe való áthelyezéssel) azonban sikerült bizonyos eredményeket elérni. Az akklimatizáció akár egy hónapig is eltarthat.

ELŐÁLLÍTÁS

Nyomelemek

Először megfelelő tisztaságú (azaz deionizált, desztillált vagy reverz ozmózissal előállított) víz felhasználásával egyedi nyomelemeket tartalmazó, különféle törzsoldatokat (I) kell készíteni. E különféle törzsoldatokból (I) egy második, egyetlen törzsoldat (II) készül, amely már tartalmazza az összes nyomelemet (kombinált oldat), azaz:

Törzsoldatok I (egyes anyagokból)	A vízhez adott mennyiség mg/l	Koncentráció (az M4 tenyészol-datra vonatkoztatva) -szoros	A (II) kombinált törzsoldat elkészítéséhez az (I) törzsoldatból az alábbi mennyiséget kell vízhez hozzáadni ml/l	
			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
$SrCl_2 * 6H_2O$	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2 * 2H_2O$	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2 * 6H_2O$	200	20 000	1,0	1,0
KI	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
$Na_2EDTA * 2H_2O$	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4 * 7 H_2O$	1 991	2 000	—	—

Mind a Na_2EDTA, mind a $FeSO_4$ oldatot külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni. Ez a következőt eredményezi:

21 Fe-EDTA solution		1 000-fold	20,0	5,0

▼B

M4 és M7 közeg

Az M4 és M7 tenyészoldatot a (II) törzsoldatból, makroelemekből és vitaminokból kell elkészíteni a következőképpen:

	A vízhez adott mennyiség mg/l	Koncentráció (az M4 tenyészoldatra vonatkoztatva) -szoros	A tenyészoldat elkészítéséhez hozzáadott törzsoldat mennyisége (ml/l)	
			M4	M7
A II. törzsoldat, nyomelemekkel kombinálva		20	50	50
Makroelem-törzsoldatok (egyetlen anyag)				
$CaCl_2$ * 2 H_20	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_20	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_20	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
Kombinált vitamintörzsoldat	—	10 000	0,1	0,1
A kombinált vitamintörzsoldalt készítéséhez 3 vitamint kell 1 liter vízhez adni, a következőképpen:				
Thiamin hidroklorid	750	10 000	—	—
Cianokobalamin (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotin	7,5	10 000	—	—

A kombinált vitamintörzsoldatot kis aliquot mennyiségekben, fagyasztott állapotban kell tartani. A tenyészoldathoz a vitaminokat röviddel a felhasználás előtt kell hozzáadni.

Megjegyzések: A végleges tenyészoldat elkészítésekor a sók kicsapódásának elkerülése érdekében a kis adag törzsoldatokat kb. 500–800 ml deionizált vízhez kell adni, majd a mennyiséget fel kell tölteni 1 literre.

Az M4 tenyészoldatról szóló első publikáció az Elendt, B. P. (1990)-ben található. Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154., pp. 25-33.

▼B

2. függelék

ÖSSZES SZERVES SZÉN (TOC) MEGHATÁROZÁSA ÉS NOMOGRAM KÉSZÍTÉSE ALGAALAPÚ TÁPLÁLÉK TOC-TARTALMÁNAK ÁBRÁZOLÁSÁRA

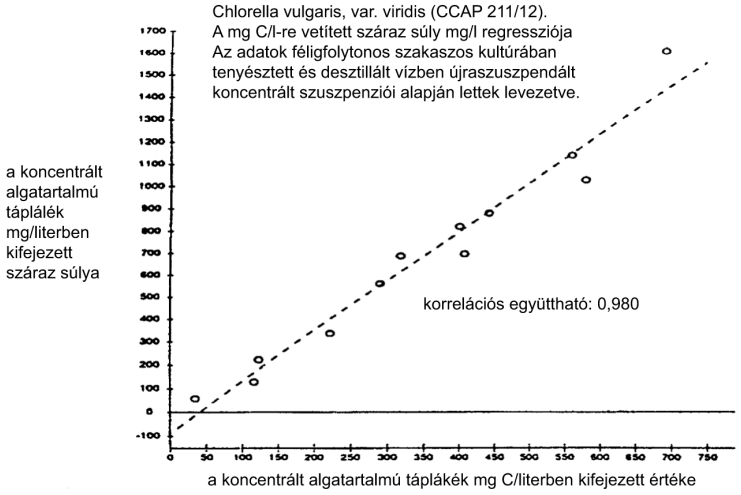
Ismert, hogy az algaalapú táplálék széntartalmát általában nem közvetlenül kell mérni, hanem olyan helyettesítő paraméterekkel rendelkező korrelációk (azaz nomogramok) alapján, mint pl. az algaszám vagy a fényabszorbancia.

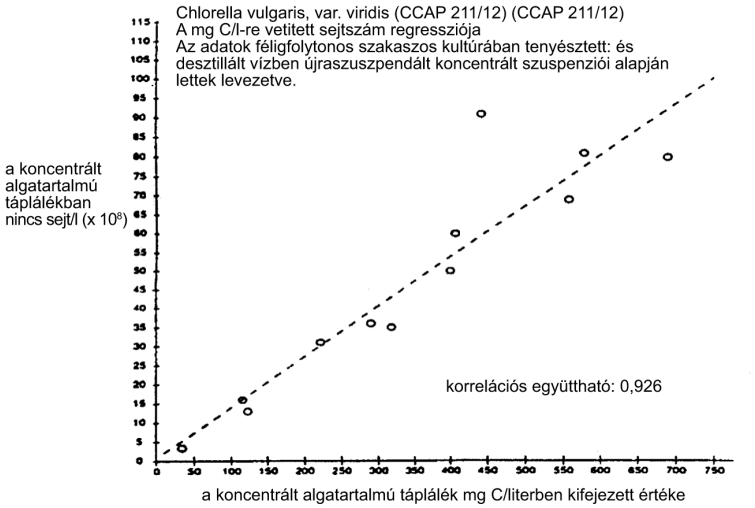
A TOC értékét az UV-sugárzásra alapozott vagy a perszulfátos módszerek helyett inkább magas hőmérsékletű oxidáció által célszerű mérni. (Lásd: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

A nomogram elkészítéséhez az algákat a tenyészfolyadéktól centrifugálással el kell különíteni, amit desztillált vízben való reszuszpenzió követ. A helyettesítő paramétert és a TOC-koncentrációt, minden mintában három példányban kell mérni. Kizárólag desztillált vizet tartalmazó vakmintákat kell elemezni, és a TOC-koncentrációt az algát tartalmazó minta TOC-koncentrációjából kell levonni.

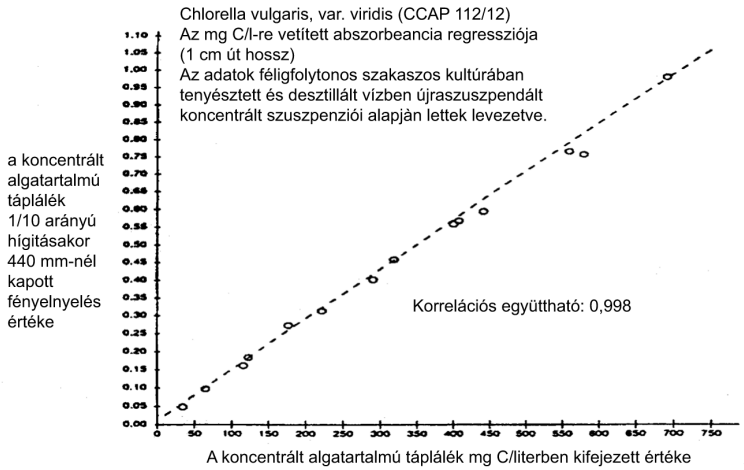
A nomogram lineárisan fut a szénkoncentrációk megkövetelt tartományában.

Megjegyzés: E példákat nem szabad konverzióra használni; alapvető fontosságú, hogy a laboratóriumok elkészítsék a saját nomogramjukat.





▼B


Chlorella vulgaris, var. viridis (CCAP 112/12)
Az mg C/l-re vetített abszorbeancia regressziója
(1 cm út hossz)
Az adatok féligfolytonos szakaszos kultúrában tenyésztett és desztillált vízben újraszuszpendált koncentrált szuszpenziói alapján lettek levezetve.
a koncentrált algatartalmú táplálék 1/10 arányú hígításakor 440 mm-nél kapott fényelnyelés értéke
Korrelációs együttható: 0,998
A koncentrált algatartalmú táplálék mg C/literben kifejezett értéke

▼B

3. függelék

MINTAADATLAP A KÖZEGMEGÚJÍTÁS, FIZIKAI/KÉMIAI FIGYELEMMEL KÍSÉRÉS SORÁN KELETKEZETT ADATOK, ETETÉS, DAPHNIA-REPRODUKCIÓ ÉS FELNŐTT ÁLLATOK MORTALITÁSÁNAK JEGYZŐKÖNYVEZÉSÉHEZ

Kísérlet sorszama	Kezdőnap:	Klón:	Tenyészoldat:	Táplálék típusa:	Vizsgált anyag:	Névl. konc.:

Nap	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Közegmegújítás (x-szel jelöljük)																								
PH (1)																							új	
																							régi	
0_2 mg/l (1)																							új	
																							regi	
Hőmérséklet (°C) (1)																							új	
																							regi	
Beadott táplálék (x-szel jelöljük)																								
Élettelen utód (2)																								Összes
1. edény																								
2																								
3																								
4																								
5																								

2008R0440 — HU — 22.03.2014 — 004.001 — 1124

▼B

Kísérlet sorszama		Kezdőnap:				Klón:			Tenyészoldat:				Táplálék típusa:				Vizsgált anyag:						Névl. konc.:	
Nap	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																								
																							Összes	
Kumulált felnőttkori mortalitás ([3])																								

([1]) Jelölje meg, hogy melyik edényt használták a kísérlethez.
([2]) Jelölje a megfelelő mezőben a pusztult utódot „U”.
([3]) Jelölje a megfelelő mezőben a felnőtt állatok mortalitását „SZ”.

▼B

4. függelék

MINTAADATLAP KÉMIAI ELEMZÉSEK EREDMÉNYEINEK JEGYZŐKÖNYVEZÉSÉHEZ

a) **Mért koncentrációk**

Névleges konc.	1. heti minta		2. heti minta		3. heti minta	
	friss	régi	friss	régi	friss	régi

b) **Mért koncentrációk a névleges koncentrációk százalékában**

Névleges konc.	1. heti minta		2. heti minta		3. heti minta	
	friss	régi	friss	régi	friss	régi

▼B

5. függelék

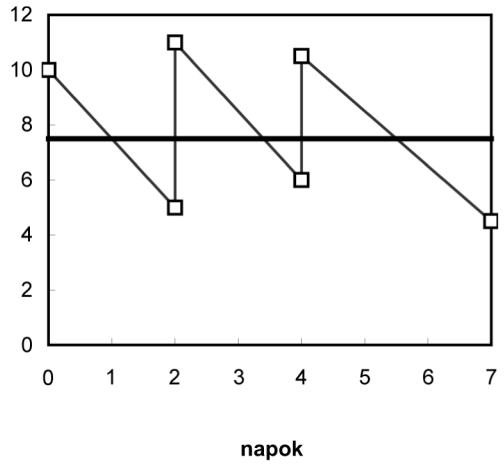
IDŐARÁNYOSAN SÚLYOZOTT ÁTLAG SZÁMÍTÁSA

Időarányosan súlyozott átlag

Mivel a vizsgált anyag koncentrációja a közeg megújításai közötti időintervallumban csökkenhet, szükséges mérlegelni, hogy melyik az a koncentráció, amelyet reprezentatívnak kell kiválasztani azon koncentrációsáv meghatározása szempontjából, amelynek a Daphnia szülők ki vannak téve. A kiválasztást biológiai és statisztikai megfontolásokra kell alapozni. Például amennyiben úgy tűnik, hogy a reprodukciót főként az alkalmazásra kerülő legmagasabb koncentráció befolyásolja, akkor azt kell alkalmazni. Amennyiben azonban fontosabbnak látszik a toxikus anyag halmozott vagy hosszabb idő alatt jelentkező hatása, akkor egy átlagos koncentráció választása a célszerűbb. Ebben az esetben az időarányosan súlyozott átlagkoncentráció a megfelelő, mivel ez figyelembe veszi a pillanatnyi koncentrációnak az idő függvényében történő változásait.

1. ábra

Példa az időarányosan súlyozott középértékre



Az 1. ábra egy (egyszerűsített) hétnapos, a közeg megújítását a 0., 2. és 4. napra ütemező vizsgálatot mutat be.

— A vékony, cikcakkos vonal ábrázolja a koncentrációt az idő függvényében. Feltételezhető, hogy a koncentrációcsökkenés egy exponenciális csökkenési folyamatot követ.

— A hat, kis négyzettel jelzett pont jelöli az egyes közegmegújítási időszakok elején és végén mért koncentrációkat.

— A vastag vonal jelzi az időarányosan súlyozott átlagot.

Az időarányosan súlyozott átlagot úgy kell kiszámítani, hogy az időarányosan súlyozott átlag nagysága megegyezzen a koncentrációgörbe alatti területtel. A fenti példa számítási menetét az 1. táblázat mutatja be.

▼B

1. táblázat

Az időarányosan súlyozott átlag számítása

Közegmegújítás száma	Napok	Konc. 0	Konc. 1	Ln(Konc.0)	Ln(Konc.1)	Terület
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
Napok száma, összesen: 7					Összterület	50,091
					IA átlag	7,156

A „napok” kifejezés a megújítási folyamat napjainak a számát jelenti.

A „Konc. 0” kifejezés az egyes megújítási időszakok kezdetekor mért koncentráció.

A „Konc. 1” kifejezés az egyes megújítási időszakok végén mért koncentráció.

A „Ln(Konc. 0)” kifejezés a „Konc. 0” természetes alapú logaritmusa.

A „Ln(Konc. 1)” kifejezés a „Konc. 1” természetes alapú logaritmusa.

A „terület” az egyes megújítási időszakokra megszerkesztett exponenciális görbe alatti területet jelöli. A következő képlettel kell kiszámítani:

$$Area = \frac{Konc0 - Konc1}{Ln(Konc0) - Ln(Konc1)} \times Napok$$

Az időarányosan súlyozott átlag („IA átlag”) a „Teljes terület” és az „Összes nap” hányadosa.

A Daphnia reprodukciós vizsgálat céljaira természetesen a táblázatot úgy kell kiterjeszteni, hogy az 21 napot fedjen le.

Egyértelmű, hogy ha csak a közeg egyes megújítási időszakainak az elején és végén végeznek megfigyeléseket, akkor nincs mód annak a megerősítésére, hogy a csökkenés valóban exponenciális. Egy másfajta görbe a „Terület”-re nézve másfajta számítási eredményre vezetne. Az exponenciális csökkenési folyamat azonban valószínűsíthető, és egyéb információk hiányában valószínűleg a legjobb görbét adja.

Óvatosságra int azonban, ha a megújítási időszak végén a kémiai analízis nem mutat ki semmilyen anyagot. Ha nem lehet megbecsülni, hogy milyen gyorsan tűnt el a vizsgált anyag az oldatból, akkor lehetetlen reálisan megítélni a görbe alatti terület nagyságát, s emiatt lehetetlen megállapítani egy ésszerű, időarányosan súlyozott átlagot.

▼B

C.21. TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: NITROGÉNÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 216 (2000) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amelynek célja annak vizsgálata, hogy az egyes vegyületek egyszeri expozíció esetén milyen hosszú távú hatásokat gyakorolnak a talajlakó mikroorganizmusok nitrogénátalakítási aktivitására. A vizsgálat elsősorban az Európai és Földközi-tenger Melléki Növényvédelmi Szervezet ajánlásain alapul (1). Azonban más iránymutatásokat, ezen belül a German Biologische Bundesanstalt (2), az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (3), a SETAC (4), valamint a Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (5) iránymutatásait is figyelembe vettünk. Az 1995-ben az olaszországi Belgiratéban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (6) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A talajminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról szóló ajánlások egy ISO-útmutatón (7) és a belgiratei munkaértekezlet ajánlásain alapulnak. A vizsgálandó anyagok toxikus jellemzőinek meghatározása és értékelése során szükség lehet a talaj mikrobiális aktivitására gyakorolt hatások meghatározására, például olyan esetben, ha adatokra van szükség a növényvédő szereknek a talaj mikroflórájára gyakorolt esetleges mellékhatásaival kapcsolatban, vagy ha a talajlakó mikroorganizmusoknak növényvédő szerektől eltérő vegyületekkel szembeni expozíciója várható. A nitrogénátalakítási vizsgálat végrehajtásának célja az ilyen vegyületeknek a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásainak meghatározása. Amennyiben mezőgazdasági vegyi anyagok (pl. növényvédő szerek, műtrágyák, erdészeti vegyi anyagok) vizsgálatáról van szó, mind a nitrogénátalakítási, mind a szénátalakítási vizsgálatot el kell végezni. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, elég a nitrogénátalakítási vizsgálatot elvégezni. Ha azonban a nitrogénátalakítási vizsgálat az ilyen vegyületek esetében olyan EC_{50}-értékeket eredményez, amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható nitrifikációgátló szerek (pl. nitrapirin) esetében tapasztalt tartományba esik, további információk gyűjtése érdekében a szénátalakítási vizsgálatot is el lehet végezni.

A talajok élő és élettelen komponensekből épülnek fel, amelyek komplex és heterogén elegyek formájában léteznek. A mikroorganizmusok számos fajjal fontos szerepet játszanak a termőtalajok szervesanyag-tartalmának lebontásában és átalakításában, hozzájárulva a talajok termékenységének különféle aspektusaihoz. Az ilyen biokémiai folyamatokat megzavaró hosszú távú hatások potenciálisan megzavarhatják a tápanyag-körforgalmat, ami megváltoztathatja a talaj termékenységét. Szén- és nitrogénátalakítás minden termőtalajban folyik. Bár az e folyamatokért felelős mikrobaközösségek talajonként eltérőek, az átalakítási útvonalak lényegében azonosak.

Az ismertetett vizsgálati módszer célja valamely anyagnak az aerob feltalajokban zajló nitrogén-átalakítási folyamatra gyakorolt hosszú távú káros hatásainak kimutatása. A vizsgálati módszer lehetővé teszi az anyagnak a talaj mikrofl órája által végzett szénátalakítására gyakorolt hatásainak becslését. A nitrátképződés a szén-nitrogén kötések felbomlása után megy végbe. Ha tehát a kezelt és az ellenőrző talajmintákban azonos a nitrátképződés sebessége, nagyon valószínű, hogy a főbb szénlebontási útvonalak épek és működőképesek. A vizsgálathoz választott szubsztrátban (porított lucernaliszt) kedvező (általában 12:1 és 16:1 közötti) a szén-nitrogén arány. Emiatt a vizsgálat során csökken a széneh ezés, és ha a vegyi anyag károsítja a mikrobaközösségeket, azok 100 napon belül helyreállítódhatnak.

▼B

Azokat a teszteket, amelyekből ezt a vizsgálati módszert kifejlesztették, elsősorban olyan anyagokhoz dolgozták ki, amelyek esetében előre jelezhető a talajba kerülő mennyiség. Ez a helyzet például a növényvédő szerek esetében, amelyeknél ismert a szántóföldi alkalmazás mértéke. A mezőgazdasági vegyi anyagok esetében elegendő két, a várt vagy becsült alkalmazási mérték szempontjából releváns dózist alkalmazni. A mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálhatók aktív összetevőként (a.ö.) vagy formulázott termékként is. A vizsgálat azonban nem korlátozódik kizárólag a mezőgazdasági vegyi anyagokra. Mind a vizsgálandó anyagnak a talajban alkalmazott mennyiségét, mind az adatok kiértékelésének módját módosítva, a vizsgálat mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületekre is alkalmazható, amelyek esetében nem ismert a talajba várhatóan bejutó mennyiség. A mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületek esetében tehát egy sor koncentrációnál meg kell határozni a nitrogén-átalakításra gyakorolt hatásokat. Az ilyen vizsgálatokkal kapott adatok dózis-válasz görbék elkészítésére és EC_x-értékek számítására használhatók fel, ahol x jelentése % hatás.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

„Nitrogénátalakítás”: a nitrogéntartalmú szerves anyagok mikroorganizmusok által végzett, ammonifikáción és nitrifikáción keresztüli végső lebontása a megfelelő szervetlen végtermékké, nitráttá.

„EC_x (hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely x %-osan gátoljaátolja a nitrogén nitráttá alakulását.

„EC_{50} (közepes hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely 50 százalékosan (50 %-osan) gátolja a nitrogén nitráttá alakulását.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs.

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Átszitált talajt porított növényi liszttel fel kell javítani, majd vagy kezelni kell a vizsgálandó anyaggal, vagy kezeletlenül kell hagyni (kontroll). Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén minimálisan két vizsgálati koncentráció alkalmazása ajánlott, amelyeket a szántóföldeken várható legmagasabb koncentráció függvényében kell megválasztani. Az inkubálás 0., 7., 14. és 28. napja után a kezelt és ellenőrző talajmintákat megfelelő oldószerrel extrahálni kell, és meg kell határozni a kivonatokban lévő nitrát mennyiségét. Ezt követően történik a kezelt talajokban mért nitrátképződés arányának összehasonlítása a kontrollokban mérttel, valamint a kezelt és az ellenőrző talajminták közötti százalékos eltérés kiszámítása. Minden vizsgálatot legalább 28 napig kell végezni. Ha a 28. napon a kezelt és nem kezelt talajok közötti különbség 25 % vagy annál nagyobb, a méréseket legfeljebb 100 napig folytatni kell. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, a vizsgálandó anyag egy sor különböző koncentrációjátoncentrációját kell a talajmintákhoz adni, és 28 napos inkubálás után meg kell mérni a kezelt és az ellenőrző mintákban képződött nitrát mennyiségét. A különféle koncentrációk alkalmazásával kapott vizsgálati eredményeket regressziós modell segítségével kell elemezni, majd ki kell számítani az EC_x-értékeket (azaz az EC_{50}-et, az EC_{25}-öt és/vagy az EC_{10}-et). Lásd a fogalommeghatározásokat.

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A mezőgazdasági vegyi anyagokkal kapott vizsgálati eredmények értékelése az ellenőrző és a kezelt talajminták nitráttartalma közötti viszonylag kis különbségeken (azaz az átlag ± 25 %-a) alapul, így az ellenőrző minták közötti nagy eltérések hamis eredményekhez vezethetnek. A párhuzamos ellenőrző minták közötti eltérésnek ±15 %-nál kisebbnek kell lennie.

▼B

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Eszközök**

Kémiailag inert anyagból készült vizsgálati edényeket kell használni. Ezeknek megfelelő, a talajok inkubálására alkalmazott eljárással, például az ömlesztve inkubálással vagy egyedi talajminták sorozataként történő inkubálásával összhangban lévő kapacitásúnak kell lenniük (lásd az 1.7.1.2. szakaszt). Ügyelni kell egyrészt a vízveszteség minimalizálására, másrészt a gázcsere lehetővé tételére a vizsgálat során (például a vizsgálati edények perforált polietilén fóliával fedhetők le). Illékony anyagok vizsgálata esetén zárható és légmentesen záródó edényeket kell alkalmazni. Az edényeknek olyan méretűnek kell lenniük, hogy a talajminta térfogatuk körülbelül egynegyedéig töltse fel őket.

Szabványos laboratóriumi eszközöket és ezen belül a következőket kell használni:

— keverőberendezés: mechanikai rázógép vagy ezzel egyenértékű más berendezés,

— centrifuga (3 000 g) vagy szűrőeszköz (nitrátmentes szűrőpapírral),

— a nitrátanalízishez megfelelő érzékenységet és reprodukálhatóságot biztosító műszer.

1.6.2. **A talajok kiválasztása és száma**

Csak egyféle talaj használható. A javasolt talajjellemzők a következők:

— homoktartalom: legalább 50 % és legfeljebb 75 %,

— pH: 5,5–7,5,

— szervesszén-tartalom: 0,5–1,5 %,

— meg kell mérni a mikrobiális biomasszát (8) (9), amelynek széntartalma a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1 %-a kell hogy legyen.

Az esetek többségében az ilyen jellemzőkkel rendelkező talaj a legrosszabb helyzetet reprezentálja, mivel minimális a vizsgálandó vegyület adszorpciója, viszont maximális a hozzáférhetősége a mikroflóra számára. Következésképpen általában nincs szükség más talajokkal végzett vizsgálatokra. Bizonyos körülmények között azonban, például amikor a vizsgálandó anyag várható fő felhasználási területe a különleges talajok, például a savanyú erdőtalajok vagy az elektrosztatikus töltéssel rendelkező vegyületek esetében is, szükség lehet egy másik talajtípus alkalmazására is.

▼B

1.6.3. **A talajminták begyűjtése és tárolása**

1.6.3.1. *Gyűjtés*

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések időpontjai, a szerves és szervetlen trágyák alkalmazásai, a biológiai anyagok hozzáadása vagy a véletlen szennyezések. A talajminták gyűjtéshez olyan helyet kell választani, amely hosszú távon használható erre a célra. Megfelelőek például az állandó legelők, az évente gabonatermést (kivéve kukoricát) hozó területek vagy a zöldtrágyával sűrűn bevetett területek. Követelmény, hogy a kiválasztott mintagyűjtési helyet a mintagyűjtést megelőzően legalább egy évig ne kezeljék növényvédő szerekkel. Továbbá legalább hat hónapig ne kapjon szerves trágyázást. Ásványi műtrágya alkalmazása csak akkor elfogadható, ha a haszonnövény igényeinek megfelelően történik, és a műtrágyázást követően legalább három hónapig nem szabad talajmintákat venni. Kerülni kell az ismert biocid hatású műtrágyákkal (pl. kalcium-ciánamiddal) kezelt talajok alkalmazását.

Kerülni kell a mintavételt hosszú (30 napnál hosszabb) ideig tartó szárazság vagy elvizesedés esetén, illetve közvetlenül ilyen időszakok után. Szántott talajok esetében a mintákat 0–20 cm mélységből kell venni. Legelők vagy egyéb olyan talajok esetében, amelyeket hosszú ideig (legalább egy vegetációs periódusig) nem szántanak fel, a mintavétel maximális mélysége 20 cm-nél kicsit több (pl. 25 cm) is lehet.

A talajmintákat olyan edényekben és olyan hőmérsékleti feltételek mellett kell elszállítani, amelyek garantálják, hogy a talaj eredeti tulajdonságai nem módosulnak szignifikáns mértékben.

1.6.3.2. *Tárolás*

Legelőnyösebb a frissen gyűjtött talajok alkalmazása. Ha a laboratóriumi tárolás nem kerülhető el, a talajok sötétben, 4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig tárolhatok. A talajok tárolása során aerob körülményeket kell biztosítani. Ha a talajminták begyűjtése olyan területeken történt, ahol a talaj az év legalább három hónapjában fagyott, szóba jöhet hat hónapos, mínusz 18 °C és mínusz 22 °C közötti hőmérsékleten való tárolás is. Minden egyes kísérlet előtt meg kell mérni a tárolt talajok mikrobiális biomasszáját, és a biomassza széntartalmának el kell érnie a talaj teljes szervesszéntartalmának legalább 1 %-át (lásd az 1.6.2. szakaszt).

1.6.4. **A talaj kezelése és előkészítése a vizsgálatra**

1.6.4.1. *Előinkubálás*

Tárolt talaj használata esetén (lásd az 1.6.3.2. szakaszt) ajánlatos 2-től 28 napig terjedő előinkubálást alkalmazni. Az előinkubálás során a talaj hőmérsékletének és nedvességtartalmának hasonlónak kell lennie a vizsgálat során alkalmazott hőmérséklethez és nedvességtartalomhoz (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt).

▼B

1.6.4.2. *Fizikai-kémiai tulajdonságok*

A talajból manuálisan el kell távolítani a nagyobb tárgyakat (például köveket, növényi részeket stb.), majd a túlzott kiszáradást kerülve a talajt nedvesen át kell szitálni úgy, hogy a részecskeméret legfeljebb 2 mm legyen. A talajminta nedvességtartalmát desztillált vagy ioncserélt vízzel a maximális víztartó képesség 40–60 %-ára kell beállítani.

1.6.4.3. *Szerves szubsztráttal történő javítás*

A talajt megfelelő szerves szubsztráttal, például 12:1 és 16:1 közötti C:N arányú, porított zöldlucernafű-liszttel (fő összetevő: *Medicago sativa*) fel kell javítani. A javasolt lucerna-talaj arány 5 g lucerna per 1 kilogramm talaj (szárazsúly).

1.6.5. **A vizsgálandó anyag előkészítése a talajon történő alkalmazáshoz**

A vizsgálandó anyagot általában hordozó segítségével kell alkalmazni. A hordozó lehet víz (vízben oldható anyagok esetében) vagy valamely inert szilárd anyag, így például finom kvarchomok (részecskeméret: 0,1–0,5 mm). Kerülni kell a víztől eltérő folyékony hordozók (például szerves oldószerek, így például aceton, kloroform) alkalmazását, mivel ezek károsíthatják a mikroflórát. Ha hordozóként homokot használunk, a homok be is vonható a megfelelő oldószerben feloldott vagy szuszpendált vizsgálandó anyaggal. Ilyen esetekben az oldószert a talajba való bekeverés előtt el kell párologtatni. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag optimális módon oszoljon szét a talajban, a következő arány ajánlott: 10 g homok per 1 kilogramm talaj (szárazsúly). Az ellenőrző mintákat ugyanilyen mennyiségű vízzel és/vagy kvarchomokkal kell kezelni.

Illékony vegyületek vizsgálata esetén, amennyire lehet, kerülni kell a kezelés közbeni veszteséget, valamint a vegyület talajban való homogén eloszlásának biztosítására is törekedni kell (például a vizsgálandó anyagot több helyen is be kell injektálni a talajba).

1.6.6. **Vizsgálati koncentrációk**

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább két koncentrációt kell alkalmazni. Az alacsonyabb koncentrációnak legalább a gyakorlatban a talajba várhatóan bejutó legnagyobb mennyiségnek kell megfelelnie, a magasabb koncentrációnak pedig az alacsonyabb koncentráció valamely többszörösének kell lennie. A talajhoz adott vizsgálandó anyag koncentrációját 5 cm-es mélységig egyenletes beépülést és 1,5 g/cm^3-es talaj térfogatsűrűséget feltételezve kell kiszámolni. A közvetlenül a talajra kihordott mezőgazdasági vegyi anyagok vagy az olyan vegyületek esetében, amelyeknek a talajba bejutó mennyisége előre jelezhető, az ajánlott vizsgálati koncentrációk a következők: a maximális becsült környezeti koncentráció (PEC) és ennek ötszöröse. Azoknak az anyagoknak az esetében, amelyeket egy idényben várhatóan több alkalommal is kihordanak a talajokra, a vizsgálathoz alkalmazandó koncentráció a PEC-értéknek a kihordások maximálisan várható számával történő megszorzásával számítható ki. A vizsgált magasabb koncentrációnak azonban nem szabad meghaladnia az egyszeri maximális alkalmazási arány tízszeresét. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt, mértani sort alkotó koncentrációt kell alkalmazni. A vizsgált koncentrációknak le kell fedniük az EC_x-értékek meghatározásához szükséges tartományt.

▼B

1.7. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.7.1. **Az expozíció körülményei**

1.7.1.1. *Kezelés és kontroll*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt három, egyenlő tömegű részre kell osztani. Két részlethez a terméket is tartalmazó hordozót kell keverni, a harmadikhoz pedig csak hordozót (kontroll). Ajánlatos a kezelt és nem kezelt talajokat is legalább három másolati mintában vizsgálni. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt hat, egyenlő tömegű részletre kell osztani. Öthöz a vizsgálandó anyagot is tartalmazó hordozót kell keverni, a hatodikhoz pedig csak hordozót. A kezeléseket és az ellenőrző kísérleteket is ajánlatos legalább három másolati mintában végezni. Vigyázni kell arra, hogy az anyag homogén módon legyen eloszlatva a kezelt talajmintákban. A bekeverés során el kell kerülni a talaj tömörödését vagy összecsomósodását.

1.7.1.2. *A talajminták inkubálása*

A talajminták inkubálása kétféle módon történhet: az egyes kezelt és nem kezelt talajokból vagy ömlesztett mintákat kell készíteni, vagy egy sor önálló és egyforma méretű részmintát. Illékony vegyületek vizsgálata esetén azonban a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni. A talajok ömlesztve történő inkubálása esetén minden kezelt és nem kezelt talajt nagy mennyiségben kell elkészíteni, és a vizsgálat során szükség szerint ezekből kell részmintákat venni a különféle analízisekhez. Az, hogy kiindulásképpen milyen mennyiséget kell készíteni az egyes kezelésekhez és ellenőrző vizsgálatokhoz, függ a részminták méretétől, az analízishez használt másolati minták számától, valamint a mintavételek várható maximális számától. A részminták vétele előtt az ömlesztve inkubált talajokat alaposan össze kell keverni. Ha a talajok inkubálása önálló részminták sorozataként történik, az egyes kezelt és nem kezelt ömlesztett talajmintákat a szükséges számú részmintára kell felosztani, amelyeket azután igény szerint kell felhasználni. Olyan kísérleteknél, amikor várhatóan több mint két alkalommal kell majd mintát venni, elegendő számú részmintát kell készíteni ahhoz, hogy azokból minden másolati mintára és mintavételi alkalomra jusson. A teszttalajokat legalább három másolati mintában kell aerob körülmények között inkubálni (lásd az 1.7.1.1. szakaszt). Minden egyes vizsgálat során megfelelő gőztérrel rendelkező edényeket kell használni annak érdekében, hogy ne alakuljanak ki anaerob körülmények. Illékony anyagok vizsgálata esetén a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni.

1.7.1.3. *A kísérlet körülményei és időtartama*

A vizsgálatot sötétben, 20 ± 2 °C-os szobahőmérsékleten kell elvégezni. A talajmintákat a vizsgálat időtartama alatt a talaj maximális víztartó kapacitásának 40 és 60 százaléka közötti értéken kell tartani (lásd az 1.6.4.2. szakaszt) ± 5 %-os eltéréssel. Szükség esetén desztillált vagy ioncserélt víz adható a mintákhoz.

A vizsgálat minimális időtartama 28 nap. Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén össze kell hasonlítani a kezelt és az ellenőrző mintákban mért nitrátképződési sebességet. Ha a 28. napon ezek több mint 25 %-kal eltérnek egymástól, a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a különbség 25 %-ra vagy az alá nem csökken, vagy legfeljebb 100 napig, ha az a korábbi időpont. A nem mezőgazdasági vegyi anyagok esetében a vizsgálat a 28 nap után véget ér. A 28. napon meg kell határozni a kezelt és az ellenőrző talajminták nitráttartalmát, és ki kell számítani az EC_x-értékeket.

▼B

1.7.2. **Mintavétel és a talajok elemzése**

1.7.2.1. *Talajminta-vételi program*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a 0., 7., 14. és 28. napon meg kell mérni a talajminták nitráttartalmát. Ha hosszabb időtartamú vizsgálatot kell végezni, a nitráttartalommméréseket a 28. nap után 14 naponta kell végezni.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt vizsgálati koncentrációt kell alkalmazni, és a talajminták nitráttartalmát az expozíciós időszak kezdetén (0. nap) és végén (28. nap) kell megmérni. Szükség esetén be lehet iktatni egy köztes mérést is, például a 7. napon. A 28. napon kapott adatok segítségével meg kell határozni a vegyület EC_x-értékeit. Szükség esetén a talaj kiindulási nitráttartalmának megadására a 0. napon az ellenőrző mintákban mért adatokat lehet felhasználni.

1.7.2.2. *A talajminták analízise*

Minden mintavételi időpontban meg kell határozni az egyes kezelt és ellenőrző másolati mintákban keletkezett nitrát mennyiségét. A nitrát kinyerése a talajból úgy történik, hogy a mintákat egy extrakciós oldószerrel, például 0,1 M kálium-klorid oldattal rázatni kell. A javasolt arány 5 ml KCl-oldat 1 gramm talaj szárazsúly-egyenértékre. Az extrahálás optimalizálásra érdekében a talajmintát és az extrakciós oldatot tartalmazó edények legfeljebb félig lehetnek. Az elegyeket 60 percig 150 rpm fordulatszámon kell rázatni. Ezt követően az elegyeket centrifugálni vagy szűrni kell, és a folyadékfázisban kell meghatározni a nitrát mennyiségét. A részecskementes folyékony kivonatok az analízist megelőzően mínusz 20 ± 5 °C-on legfeljebb hat hónapig tárolhatók.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén le kell jegyezni az egyes másolati talajmintákban képződött nitrát mennyiségét, és a másolati minták átlagát táblázatos formában kell megadni. A nitrogénátalakítási arányokat megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel (például F-teszt, 5 %-os szignifikanciaszint) kell kiértékelni. A képződött nitrát mennyiségét mg nitrát/kg talaj (szárazsúly)/nap egységekben kell kifejezni. Az egyes kezeléseknél mért nitrátképződési sebességeket össze kell hasonlítani az ellenőrző mintában mérttel, és ki kell számítani az ellenőrző mintától való százalékos eltérést.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén meg kell határozni az egyes másolati mintákban képződött nitrát mennyiségét, és dózis-válasz görbét kell felvenni az EC_x-értékek becsléséhez. A kezelt minták 28 nap után mért nitráttartalmát (mg nitrát/kg talaj (szárazsúly)) össze kell hasonlítani az ellenőrző mintákban mérttel. Ezekből az adatokból ki kell számítani az egyes vizsgálati koncentrációkra vonatkozó %-os gátlási értékeket. A százalékos értékeket a koncentráció függvényében kell ábrázolni, majd statisztikai eljárások alkalmazásával ki kell számítani az EC_x-értékeket. A számított EC_x-értékek konfidenciahatárát ($p = 0,95$) is a szabványos eljárások segítségével kell meghatározni (10) (11) (12).

A nagy mennyiségű nitrogént tartalmazó vizsgálandó anyagok növelhetik a vizsgálat során képződött nitrát mennyiségét. Ha magas koncentrációban történik az ilyen anyagok (azaz olyan vegyi anyagok, amelyek várhatóan ismételt kihordással kerülnek felhasználásra) vizsgálata, gondoskodni kell a megfelelő ellenőrző mintákról (talaj plusz vizsgálandó anyag, növényi liszt hozzáadása nélkül). Az ilyen ellenőrző mintákból származó adatokat is figyelembe kell venni az EC_x-értékek számításakor.

▼B

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Ha a mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok eredményeinek értékelésekor az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel (azaz a maximális becsült koncentrációval) és az ellenőrző mintákkal kapott nitrátképződési arányok különbsége a 28. nap utáni mintavételi időpontok valamelyikénél nem haladja meg a 25 %-ot, azt a következtetést kell levonni, hogy a terméknek nincs hosszú távú hatása a talajokban zajló nitrogénátalakításra. A nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok esetében a vegyületek értékeléséhez az EC_{50}-, EC_{25}- és/vagy EC_{10}-értékeket kell használni.

3. **JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

a talaj teljes körű azonosítása, ezen belül:

— a terület földrajzi meghatározása (földrajzi hosszúság és szélesség),

— a terület történetével kapcsolatos információk (növénytakaró, növényvédő szerekkel való kezelés, műtrágyázás, véletlen szennyezések stb.),

— földhasználat (például mezőgazdasági talaj, erdő stb.),

— a mintavétel mélysége (cm),

— homok-/iszap-/agyagtartalom (% szárazsúly),

— pH (vízben),

— szervesszén-tartalom (% szárazsúly),

— nitrogéntartalom (% szárazsúly),

— kiindulási nitrátkoncentráció (mg nitrát/kg szárazsúly),

— kationcserélő kapacitás (mmol/kg),

— mikrobiális biomassza a teljes szervesszén-tartalom százalékában kifejezve,

— hivatkozások az egyes paraméterek meghatározásához alkalmazott módszerekre,

— a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ,

— adott esetben a talaj előinkubálásával kapcsolatos részletek.

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben fizikai-kémiai tulajdonságok,

— -– kémiai azonosító adatok, és ezen belül adott esetben a szerkezeti képlet, tisztaság (növényvédő szerek esetében az aktív összetevő százalékos aránya), nitrogéntartalom.

Szubsztrát:

— a szubsztrát származása,

— összetétel (lucernaliszt, zöldlucernafű-liszt),

— szén- és nitrogéntartalom (% szárazsúly),

— szitaméret (mm).

▼B

Vizsgálati körülmények:

— a talaj szerves szubsztráttal való javításának részletei,

— a vizsgálandó vegyi anyag alkalmazott koncentrációinak száma és adott esetben a koncentrációk megválasztásának indoklása,

— a vizsgálandó anyag talaj on való alkalmazásának részletei,

— inkubálási hőmérséklet,

— a talaj nedvességtartalma a vizsgálat kezdetén és a vizsgálat alatt,

— az alkalmazott talajinkubálási módszer (ömlesztett minták vagy önálló részminták sorozata),

— másolati minták száma,

— mintavételi időpontok,

— a talaj nitráttartalmának extrahálására alkalmazott módszer.

Eredmények:

— a nitrátmeghatározáshoz alkalmazott analitikai eljárás és berendezés,

— táblázatos formában megadott adatok, ezen belül a nitrátmérések egyedi és átlagértékei,

— a másolati minták közötti eltérések a kezelt és ellenőrző mintákban,

— adott esetben a számításoknál alkalmazott korrekciók magyarázata,

— az egyes mintavételi időpontokban mért nitrátképződési sebességek százalékos eltérése vagy adott esetben a 95 százalékos konfidenciahatárral meghatározott EC_{50}-érték, a többi EC_x-érték (az EC_{25} vagy az EC_{10}) konfidenciaintervallumokkal, és a dózis-válasz görbe grafikonja,

— az eredmények statisztikai kezelése,

— az eredmények értelmezését segítő minden információ és megfigyelés.

4. **SZAKIRODALOM**

(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 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SET AC-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, Italie, 18-20 Janvier 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. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate- induced respiration method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer.)

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation- extraction method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

(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. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: SZÉNÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 217 (2000) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amelynek célja annak vizsgálata, hogy a növényvédő szerek és esetleg más vegyi anyagok egyszeri expozíció esetén milyen potenciális hosszú távú hatásokat gyakorolnak a talajlakó mikroorganizmusok szénátalakítási aktivitására. A vizsgálat elsősorban az Európai és Földközi-tenger Melléki Növényvédelmi Szervezet ajánlásain alapul (1). Azonban más iránymutatásokat, ezen belül a German Biologische Bundesanstalt (2), az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (3) és a SET AC (4) iránymutatásait is figyelembe vettünk. Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (5) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A talajminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról szóló ajánlások egy ISO-útmutatón (6) és a belgiratei munkaértekezlet ajánlásain alapulnak.

A vizsgálandó anyagok toxikus jellemzőinek meghatározása és értékelése során szükség lehet a talaj mikrobiális aktivitására gyakorolt hatások meghatározására, például olyan esetben, ha adatokra van szükség a növényvédő szereknek a talaj mikroflórájára gyakorolt esetleges mellékhatásaival kapcsolatban, vagy ha a talaj lakó mikroorganizmusoknak növényvédő szerektől eltérő vegyületekkel szembeni expozíciója várható. A szénátalakítási vizsgálat végrehajtásának célja az ilyen vegyületeknek a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásainak meghatározása. Amennyiben mezőgazdasági vegyi anyagok (pl. növényvédő szerek, műtrágyák, erdészeti vegyi anyagok) vizsgálatáról van szó, mind a szénátalakítási, mind a nitrogénátalakítási vizsgálatot el kell végezni. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, elég a nitrogénátalakítási vizsgálatot elvégezni. Ha azonban a nitrogénátalakítási vizsgálat az ilyen vegyületek esetében olyan EC_{50}-értékeket eredményez, amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható nitrifikációgátló szerek (pl. nitrapirin) esetében tapasztalt tartományba esik, további információk gyűjtése érdekében a szénátalakítási vizsgálatot is el lehet végezni.

A talajok élő és élettelen komponensekből épülnek fel, amelyek komplex és heterogén elegyek formájában léteznek. A mikroorganizmusok számos fajjal fontos szerepet játszanak a termőtalajok szervesanyag-tartalmának lebontásában és átalakításában, hozzájárulva a talajok termékenységének különféle aspektusaihoz. Az ilyen biokémiai folyamatokat megzavaró hosszú távú hatások potenciálisan megzavarhatják a tápanyag-körforgalmat, ami megváltoztathatja a talaj termékenységét. Szén- és nitrogénátalakítás minden termőtalajban folyik. Bár az e folyamatokért felelős mikrobaközösségek talajonként eltérőek, az átalakítási útvonalak lényegében azonosak.

▼B

Ennek a vizsgálati módszernek a célja valamely anyagnak az aerob feltalajokban zajló szénátalakítási folyamatra gyakorolt hosszú távú káros hatásainak kimutatása. A vizsgálati módszer érzékeny a szénátalakításért felelős mikrobaközösségek méretében és aktivitásában bekövetkező változásokra, mivel ez kémiai stresszt és szénéhezést okoz ezekben a közösségekben. A vizsgálathoz alacsony szervesanyag-tartalmú homokos talajt kell használni. Ezt a talajt kezelni kell a vizsgálandó anyaggal, majd gyors mikrobiális anyagcserét biztosító körülmények között inkubálni kell. Ilyen körülmények között hamar kimerülnek a talaj könnyen hozzáférhető szénforrásai. Ez szénéhezést okoz, ami elpusztítja a mikrobákat és egyben nyugalmi állapotot és/vagy spóraképzést idéz elő. Ha a vizsgálat több mint 28 napig tart, e reakciók összessége a kontroll- (kezeletlen) talajokban a metabolikusan aktív mikrobiális biomassza progresszív elvesztéseként mérhető (7). Ha valamely vegyi anyag jelenléte a vizsgálat körülményei között befolyást gyakorol a szénstresszelt talajban található biomasszára, akkor a biomassza nem tud visszatérni ugyanarra a szintre, mint a kontrolltalajokban. A vizsgálandó anyag által a vizsgálat során bármikor előidézett zavaró hatás tehát gyakran egészen a vizsgálat végéig fennmarad.

Azokat a teszteket, amelyekből ezt a vizsgálati módszert kifejlesztették, elsősorban olyan anyagokhoz dolgozták ki, amelyek esetében előre jelezhető a talajba kerülő mennyiség. Ez a helyzet például a növényvédő szerek esetében, amelyeknél ismert a szántóföldi alkalmazás mértéke. A mezőgazdasági vegyi anyagok esetében elegendő két, a várt vagy becsült alkalmazási mérték szempontjából releváns dózist alkalmazni. A mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálhatók aktív összetevőként (a.ö.) vagy formulázott termékként is. A vizsgálat azonban nem korlátozódik kizárólag a megbecsülhető környezeti koncentrációval rendelkező anyagokra. Mind a vizsgálandó anyagnak a talajban alkalmazott mennyiségét, mind az adatok kiértékelésének módját módosítva, a vizsgálat mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületekre is alkalmazható, amelyek esetében nem ismert a talajba várhatóan bejutó mennyiség. A nem mezőgazdasági vegyi anyagok esetében tehát egy sor koncentrációnál meg kell határozni a szénátalakításra gyakorolt hatásokat. Az ilyen vizsgálatokkal kapott adatok dózis-válasz görbék elkészítésére és EC_x-értékek számítására használhatók fel, ahol x jelentése % hatás.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

„Szénátalakítás”: szerves anyagok mikroorganizmusok által végzett lebontása a megfelelő szervetlen végtermékké, azaz szén-dioxiddá.

„EC_x (hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely x %-osan gátolja a szén szén-dioxiddá alakulását.

„EC_{50} (közepes hatásos koncentráció)”: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely 50 százalékosan (50 %-osan) gátolja a szén szén-dioxiddá alakulását.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Nincs.

▼B

1.4. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az átszitált talajt a vizsgálandó anyaggal kell kezelni, vagy kezeletlenül kell hagyni (kontroll). Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén minimálisan két vizsgálati koncentráció alkalmazása ajánlott, amelyeket a szántóföldeken várható legmagasabb koncentráció függvényében kell megválasztani. Az inkubálás 0., 7., 14. és 28. napja után a kezelt és az ellenőrző talajmintákhoz glükózt kell keverni, majd 12 órán át folyamatosan mérni kell a glükózindukált légzési sebességet. A légzési sebességet a felszabaduló szén-dioxidban (mg szén-dioxid/kg száraz talaj/óra) vagy az elfogyasztott oxigénben (mg oxigén/kg talaj/óra) kell kifejezni. A kezelt talajokban mért közepes légzési rátát össze kell hasonlítani az ellenőrző minta esetében mérttel, majd ki kell számítani a kezelt és az ellenőrző talajminták közötti százalékos eltérést. Minden vizsgálatot legalább 28 napig kell végezni. Ha a 28. napon a kezelt és nem kezelt talajok közötti különbség 25 % vagy annál nagyobb, a méréseket 14 napos intervallumokban, legfeljebb 100 napos időtartamig folytatni kell. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, a vizsgálandó anyag egy sor különböző koncentrációját kell a talajmintákhoz adni, és 28 nap után meg kell mérni a kezelt és az ellenőrző mintákban a glükózindukált légzési sebességeket (azaz a képződő szén-dioxid vagy az elfogyasztott oxigén átlagos mennyiségét). A különböző koncentrációk alkalmazásával kapott vizsgálati eredményeket regressziós modell segítségével kell elemezni, majd ki kell számítani az EC_x-értékeket (azaz az EC_{50}-et, az EC_{25}-öt és/vagy az EC_{10}-et). Lásd a fogalommeghatározásokat.

1.5. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A mezőgazdasági vegyi anyagokkal kapott vizsgálati eredmények értékelése az ellenőrző és a kezelt talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén közötti viszonylag kis különbségeken (azaz az átlag ± 25 %-a) alapul, így az ellenőrző minták közötti nagy eltérések hamis eredményekhez vezethetnek. A párhuzamos ellenőrző minták közötti eltérésnek ±15 %-nál kisebbnek kell lennie.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.6.1. **Eszközök**

Kémiailag inert anyagból készült vizsgálati edényeket kell használni. Ezeknek megfelelő, a talajok inkubálására alkalmazott eljárással, például az ömlesztve inkubálással vagy egyedi talajminták sorozataként történő inkubálással megfelelő összhangban lévő kapacitásúnak kell lenniük (lásd az 1.7.1.2. szakaszt). Ügyelni kell egyrészről a vízveszteség minimalizálására, másrészről a gázcsere lehetővé tételére a vizsgálat során (például a vizsgálati edények perforált polietilén fóliával fedhetők le). Illékony anyagok vizsgálata esetén zárható és légmentesen záródó edényeket kell alkalmazni. Az edényeknek olyan méretűnek kell lenniük, hogy a talajminta-térfogatuk körülbelül egynegyedéig töltse fel őket.

A glükózindukált légzés meghatározásához inkubálórendszerekre és a szén-dioxid-termelés vagy az oxigénfogyasztás mérésére alkalmas műszerekre van szükség. Ilyen rendszerekre és műszerekre példák a (8), (9), (10) és (11) hivatkozásban találhatók.

1.6.2. **A talajok kiválasztása és száma**

Csak egyféle talaj használható. A javasolt talajjellemzők a következők:

— homoktartalom: legalább 50 % és legfeljebb 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— szervesszén-tartalom: 0,5–1,5 %,

— meg kell mérni a mikrobiális biomasszát (12) (13), amelynek széntartalma a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1 %-a kell hogy legyen.

Az esetek többségében az ilyen jellemzőkkel rendelkező talaj a legrosszabb helyzetet reprezentálja, mivel minimális a vizsgálandó vegyület adszorpciója, viszont maximális a hozzáférhetősége a mikroflóra számára. Következésképpen általában nincs szükség más talajokkal végzett vizsgálatokra. Bizonyos körülmények között azonban, például amikor a vizsgálandó anyag várható fő felhasználási területe a különleges talajok, például a savanyú erdőtalajok vagy az elektrosztatikus töltéssel rendelkező vegyületek esetében is, szükség lehet ennek egy másik talajtípussal való helyettesítésre.

1.6.3. **A talajminták begyűjtése és tárolása**

1.6.3.1. *Gyűjtés*

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések időpontjai, a szerves és szervetlen trágyák alkalmazásai, a biológiai anyagok hozzáadása vagy a véletlen szennyezések. A talajminták gyűjtéshez olyan helyet kell választani, amely hosszú távon használható erre a célra. Megfelelőek például az állandó legelők, az évente gabonatermést (kivéve kukoricát) hozó területek vagy a zöldtrágyával sűrűn bevetett területek. Követelmény, hogy a kiválasztott mintagyűjtési helyet a mintagyűjtést megelőzően legalább egy évig ne kezeljék növényvédő szerekkel. Továbbá legalább hat hónapig ne kapjon szerves trágyázást. Ásványi műtrágya alkalmazása csak akkor elfogadható, ha a haszonnövény igényeinek megfelelően történik, és a műtrágyázást követően legalább három hónapig nem szabad talajmintákat venni. Kerülni kell az ismert biocid hatású műtrágyákkal (pl. kalcium-ciánamiddal) kezelt talajok alkalmazását.

Kerülni kell a mintavételt hosszú (30 napnál hosszabb) ideig tartó szárazság vagy elvizesedés esetén, illetve közvetlenül ilyen időszakok után. Szántott talajok esetében a mintákat 0–20 cm mélységből kell venni. Legelők vagy egyéb olyan talajok esetében, amelyeket hosszú ideig (legalább egy vegetációs periódusig) nem szántanak fel, a mintavétel maximális mélysége 20 cm-nél kicsit több (pl. 25 cm) is lehet. A talajmintákat olyan edényekben és olyan hőmérsékleti feltételek mellett kell elszállítani, amelyek garantálják, hogy a talaj eredeti tulajdonságai nem módosulnak szignifikáns mértékben.

1.6.3.2. *Tárolás*

Legelőnyösebb a frissen gyűjtött talajok alkalmazása. Ha a laboratóriumi tárolás nem kerülhető el, a talajok sötétben, 4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig tárolhatók. A talajok tárolása során aerob körülményeket kell biztosítani. Ha a talajminták begyűjtése olyan területeken történt, ahol a talaj az év legalább három hónapjában fagyott, szóba jöhet hat hónapos, mínusz 18 °C hőmérsékleten való tárolás is. Minden egyes kísérlet előtt meg kell mérni a tárolt talajok mikrobiális biomasszáját, és a biomassza széntartalmának el kell érnie a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1 %-át (lásd az 1.6.2. szakaszt).

▼B

1.6.4. **A talaj kezelése és előkészítése a vizsgálatra**

1.6.4.1. *Előinkubálás*

Tárolt talaj használata esetén (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt) ajánlatos 2-től 28 napig terjedő előinkubálást alkalmazni. Az előinkubálás során a talaj hőmérsékletének és nedvességtartalmának hasonlónak kell lennie a vizsgálat során alkalmazott hőmérséklethez és nedvességtartalomhoz (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt).

1.6.4.2. *Fizikai-kémiai tulajdonságok*

A talajból manuálisan el kell távolítani a nagyobb tárgyakat (például köveket, növényi részeket stb.), majd a túlzott kiszáradást kerülve a talajt nedvesen át kell szitálni úgy, hogy a részecskeméret legfeljebb 2 mm legyen. A talajminta nedvességtartalmát desztillált vagy ioncserélt vízzel a maximális víztartó képesség 40–60 %-ára kell beállítani.

1.6.5. **A vizsgálandó anyag előkészítése a talajon történő alkalmazáshoz**

A vizsgálandó anyagot általában hordozó segítségével kell alkalmazni. A hordozó lehet víz (vízben oldható anyagok esetében) vagy valamely inert szilárd anyag, így például finom kvarchomok (részecskeméret: 0,1–0,5 mm). Kerülni kell a víztől eltérő folyékony hordozók (például szerves oldószerek, így például aceton, kloroform) alkalmazását, mivel ezek károsíthatják a mikroflórát. Ha hordozóként homokot használunk, a homok be is vonható a megfelelő oldószerben feloldott vagy szuszpendált vizsgálandó anyaggal. Ilyen esetekben az oldószert a talajba való bekeverés előtt el kell párologtatni. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag optimális módon oszoljon szét a talajban, a következő arány ajánlott: 10 g homok per 1 kilogramm talaj (szárazsúly). Az ellenőrző mintákat ugyanilyen mennyiségű vízzel és/vagy kvarchomokkal kell kezelni.

Illékony vegyületek vizsgálata esetén kerülni kell a kezelés közbeni veszteséget, valamint a vegyület talajban való homogén eloszlásának biztosítására is törekedni kell (például a vizsgálandó anyagot több helyen is be kell injektálni a talajba).

1.6.6. **Vizsgálati koncentrációk**

Növényvédő szerek és egyéb, megbecsülhető környezeti koncentrációval rendelkező vegyületek vizsgálata esetén legalább két koncentrációt kell alkalmazni. Az alacsonyabb koncentrációnak legalább a gyakorlatban a talajba várhatóan bejutó legnagyobb mennyiségnek kell megfelelnie, a magasabb koncentrációnak pedig az alacsonyabb koncentráció valamely többszörösének kell lennie. A talajhoz adott vizsgálandó anyag koncentrációját 5 cm-es mélységig egyenletes beépülést és 1,5 g/cm^3-es talaj térfogatsűrűséget feltételezve kell kiszámolni. A közvetlenül a talajra kihordott mezőgazdasági vegyi anyagok vagy az olyan vegyületek esetében, amelyeknek a talajba bejutó mennyisége előre jelezhető, az ajánlott vizsgálati koncentrációk a következők: a megbecsülhető környezeti koncentráció (PEC) és ennek ötszöröse. Azoknak az anyagoknak az esetében, amelyeket egy idényben várhatóan több alkalommal is kihordanak a talajokra, a vizsgálathoz alkalmazandó koncentráció a PEC-értéknek a kihordások maximálisan várható számával történő megszorzásával számítható ki. A vizsgált magasabb koncentrációnak azonban nem szabad meghaladnia az egyszeri maximális alkalmazási arány tízszeresét.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt, mértani sort alkotó koncentrációt kell alkalmazni. A vizsgált koncentrációknak le kell fedniük az EC_x-értékek meghatározásához szükséges tartományt.

▼B

1.7. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.7.1. **Az expozíció körülményei**

1.7.1.1. *Kezelés és kontroll*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt három, egyenlő tömegű részre kell osztani. Két részlethez a terméket is tartalmazó hordozót kell keverni, a harmadikhoz pedig csak hordozót (kontroll). Ajánlatos a kezelt és nem kezelt talajokat is legalább három másolati mintában vizsgálni. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt hat, egyenlő tömegű részletre kell osztani. Öthöz a vizsgálandó anyagot is tartalmazó hordozót kell keverni, a hatodikhoz pedig csak hordozót. A kezeléseket és az ellenőrző kísérleteket is ajánlatos legalább három másolati mintában végezni. Vigyázni kell arra, hogy az anyag homogén módon legyen eloszlatva a kezelt talajmintákban. A bekeverés során el kell kerülni a talaj tömörödését vagy összecsomósodását.

1.7.1.2. *A talajminták inkubálása*

A talajminták inkubálása kétféle módon történhet: az egyes kezelt és nem kezelt talajokból vagy ömlesztett mintákat kell készíteni, vagy egy sor önálló és egyforma méretű részmintát. Illékony vegyületek vizsgálata esetén azonban a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni. A talajok ömlesztve történő inkubálása esetén minden kezelt és nem kezelt talajt nagy mennyiségben kell elkészíteni, és a vizsgálat során szükség szerint ezekből kell részmintákat venni a különféle analízisekhez. Az, hogy kiindulásképpen milyen mennyiséget kell készíteni az egyes kezelésekhez és ellenőrző vizsgálatokhoz, függ a részminták méretétől, az analízishez használt másolati minták számától, valamint a mintavételek várható maximális számától. A részminták vétele előtt az ömlesztve inkubált talajokat alaposan össze kell keverni. Ha a talajok inkubálása önálló részminták sorozataként történik, az egyes kezelt és nem kezelt ömlesztett talajmintákat a szükséges számú részmintára kell felosztani, amelyeket azután igény szerint kell felhasználni. Olyan kísérleteknél, amikor várhatóan több mint két alkalommal kell majd mintát venni, elegendő számú részmintát kell készíteni ahhoz, hogy azokból minden másolati mintára és mintavételi alkalomra jusson. A teszttalajokat legalább három másolati mintában kell aerob körülmények között inkubálni (lásd az 1.7.1.1. szakaszt). Minden egyes vizsgálat során megfelelő gőztérrel rendelkező edényeket kell használni annak érdekében, hogy ne alakuljanak ki anaerob körülmények. Illékony anyagok vizsgálata esetén a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni.

1.7.1.3. *A kísérlet körülményei és időtartama*

A vizsgálatot sötétben, 20 ± 2 °C-os szobahőmérsékleten kell elvégezni. A talajmintákat a vizsgálat időtartama alatt a talaj maximális víztartó kapacitásának 40 és 60 százaléka közötti értéken kell tartani (lásd az 1.6.4.2. szakaszt) ± 5 %-os eltéréssel. Szükség esetén desztillált vagy ioncserélt víz adható a mintákhoz.

A vizsgálat minimális időtartama 28 nap. Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén össze kell hasonlítani a kezelt és az ellenőrző mintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét. Ha a 28. napon ezek több mint 25 %-kal eltérnek egymástól, a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a különbség 25 %-ra vagy az alá nem csökken, vagy legfeljebb 100 napig, ha az a korábbi időpont. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a vizsgálat a 28. nap után véget ér. A 28. napon meg kell határozni a kezelt és az ellenőrző talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét, és ki kell számítani az EC_x-értékeket.

▼B

1.7.2. **Mintavétel és a talajok elemzése**

1.7.2.1. *Talajminta-vételi program*

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a 0., 7., 14. és 28. napon meg kell mérni a talajmintákban a glükózindukált légzési sebességeket. Ha hosszabb időtartamú vizsgálatot kell végezni, a további méréseket a 28. nap után 14 naponta kell végezni.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt vizsgálati koncentrációt kell alkalmazni, és a talajminták glükózindukált légzését az expozíciós időszak kezdetén (0. nap) és végén (28. nap) kell megmérni. Szükség esetén be lehet iktatni egy köztes mérést is, például a 7. napon. A 28. napon kapott adatokból meg kell határozni a vegyi anyag EC_x-értékét. Szükség esetén a 0. napon az ellenőrző mintákban mért adatok segítségével meg lehet becsülni, hogy a talajban eredetileg milyen mennyiségben volt jelen metabolikusan aktív mikrobiális biomassza (12).

1.7.2.2. *A glükózindukált légzési sebesség mérése*

Minden mintavételi időpontban meg kell határozni az egyes kezelt és ellenőrző másolati mintákban tapasztalható glükózindukált légzési sebességet. A talajmintákhoz olyan mennyiségű glükózt kell keverni, hogy az azonnali maximális légzési választ váltson ki. Az adott talajban a maximális válasz kiváltásához szükséges glükózmennyiséget előzetes vizsgálatokkal lehet meghatározni, amelyhez egy sor különböző glükózkoncentrációt kell alkalmazni (14). A 0,5–1,5 % szerves szént tartalmazó homokos talajok esetében azonban általában elegendő, ha 2 000 - 2 000 mg/kg talaj (szárazsúly) mennyiségben adunk hozzá glükózt. A glükóz tiszta kvarchomokkal (10 g homok/-kg talaj (szárazsúly)) porrá őrölhető és homogén módon a talajhoz keverhető.

A glükózzal feljavított talajmintákat a légzési sebességet folyamatosan, óránként vagy kétóránként mérő, megfelelő berendezésben (lásd az 1.6.1. szakaszt), 20 ± 2 °C-on inkubálni kell. A felszabaduló szén-dioxidot vagy elfogyasztott oxigént 12 órán át folyamatosan mérni kell, és a mérést a lehető leghamarabb, azaz a glükóz hozzáadása után 1-2 órán belül el kell kezdeni. Meg kell mérni a 12 óra alatt felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén teljes mennyiségét, és ebből meg kell határozni a közepes légzési sebességeket.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén le kell jegyezni az egyes másolati talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét, és a másolati minták átlagát táblázatos formában kell megadni. Az eredményeket megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel (például F-teszt, 5 %-os szignifikanciaszint) kell kiértékelni. A glükózindukált légzési sebességet szén-dioxid/kg talaj (szárazsúly)/óra vagy mg oxigén/talaj (szárazsúly)/óra egységekben kell kifejezni. Az egyes kezeléseknél mért közepes szén-dioxid képződési vagy közepes oxigénfogyasztási sebességeket össze kell hasonlítani az ellenőrző mintában mérttel, és ki kell számítani az ellenőrző mintától való százalékos eltérést.

▼B

Nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén meg kell határozni az egyes másolati mintákban a felszabaduló szén-dioxid vagy az elfogyasztott oxigén mennyiségét, és dózis-válasz görbét kell felvenni az EC_x-értékek becsléséhez. A kezelt mintákban 28 nap után mért glükózindukált légzési sebességeket (mg szén-dioxid/kg talaj (szárazsúly)/óra vagy mg oxigén/talaj (szárazsúly)/-óra) össze kell hasonlítani az ellenőrző mintákban mérttel. Ezekből az adatokból ki kell számítani az egyes vizsgálati koncentrációkra vonatkozó %-os gátlási értékeket. A százalékos értékeket a koncentráció függvényében kell ábrázolni, majd statisztikai eljárások alkalmazásával ki kell számítani az EC_x-értékeket. A számított EC_x-értékek konfidenciahatárát (p = 0,95) is a szabványos eljárások segítségével kell meghatározni (15) (16) (17).

2.2. AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Ha a mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok eredményeinek értékelésekor az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel (azaz a maximális becsült koncentrációval) és az ellenőrző mintákkal kapott légzési sebességek különbsége a 28. nap utáni mintavételi időpontok valamelyikénél nem haladja meg a 25 %-ot, akkor azt a következtetést kell levonni, hogy a terméknek nincs hosszú távú hatása a talajokban folyó szénátalakításra. A nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok esetében a vegyületek értékeléséhez az EC_{50}-, EC_{25}- és/vagy EC_{10}-értékeket kell használni.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

a talaj teljes körű azonosítása, ezen belül:

— a terület földrajzi meghatározása (földrajzi hosszúság és szélesség),

— a terület történetével kapcsolatos információk (növénytakaró, növényvédő szerekkel való kezelés, műtrágyázás, véletlen szennyezések stb.),

— földhasználat (például mezőgazdasági talaj, erdő stb.),

— a mintavétel mélysége (cm),

— homok-/iszap-/agyagtartalom (% szárazsúly),

— pH (vízben),

— szervesszén-tartalom (% szárazsúly),

— nitrogéntartalom (% szárazsúly),

— kationcserélő kapacitás (mmol/kg),

— kiindulási mikrobiális biomassza a teljes szervesszén-tartalom százalékában kifejezve,

— hivatkozások az egyes paraméterek meghatározásához alkalmazott módszerekre,

— a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ,

— adott esetben a talaj előinkubálásával kapcsolatos részletek.

▼B

Vizsgálandó anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben fizikai-kémiai tulajdonságok,

— kémiai azonosító adatok és ezen belül adott esetben a szerkezeti képlet, tisztaság (növényvédő szerek esetében az aktív összetevő százalékos aránya), nitrogéntartalom.

Vizsgálati körülmények:

— a talaj szerves szubsztráttal való javításának részletei,

— a vizsgálandó vegyi anyag alkalmazott koncentrációinak száma és adott esetben a koncentrációk megválasztásának indoklása,

— a vizsgálandó anyag talaj on való alkalmazásának részletei,

— inkubálási hőmérséklet,

— a talaj nedvességtartalma a vizsgálat kezdetén és a vizsgálat alatt,

— az alkalmazott talaj inkubálási módszer (ömlesztett minták vagy önálló részminták sorozata),

— másolati minták száma,

— mintavételi időpontok.

Eredmények:

— a légzési sebesség mérésére alkalmazott módszer és berendezés,

— táblázatos formában megadott adatok, ezen belül a szén-dioxid vagy oxigén mennyiségek egyedi és átlagértékei,

— a másolati minták közötti eltérések a kezelt és ellenőrző mintákban,

— adott esetben a számításoknál alkalmazott korrekciók magyarázata,

— az egyes mintavételi időpontokban mért glükózindukált légzési sebességek százalékos eltérése, vagy adott esetben a 95 százalékos konfidenciahatárral meghatározott EC_{50}-érték, a többi EC_x-érték (azaz az EC_{25} vagy az EC_{10}) konfidencia-intervallumokkal és a dózis-válasz görbe grafikonja,

— adott esetben az eredmények statisztikai kezelése,

— az eredmények értelmezését segítő minden információ és megfigyelés.

4. **SZAKIRODALOM**

(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 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SET AC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SET AC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 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. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

(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, Chap. 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. (Talajminőség. Útmutató a talajban levő szerves vegyi anyagok aerob feltételek melletti biológiai lebonthatóságának laboratóriumi vizsgálatára.)

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions. (Talajminőség. Laboratóriumi inkubációs rendszerek a talajban lévő szerves vegyi anyagok aerob feltételek mellett végbemenő mineralizációjának vizsgálatához.)

(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. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer.)

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß 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. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS A TALAJBAN

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 307 (2002) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer meglévő iránymutatásokon alapul (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Az ennél a vizsgálati módszernél ismertetett módszer célja a vegyi anyagok talajban zajló aerob és anaerob átalakításának értékelése. A kísérletek során meghatározható i. a vizsgálandó anyag átalakulási sebessége; valamint ii. azon átalakulási termékek jellege, illetve keletkezésének és eltűnésének sebessége, amelyekkel a növények és talajlakó szervezetek kapcsolatba kerülhetnek. Az ilyen vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében van szükség, amelyeket közvetlenül a talajokra hordanak ki, vagy amelyek valószínűleg bekerülnek a talaj környezetbe. Az ilyen laboratóriumi vizsgálatok eredményei a kapcsolódó szántóföldi vizsgálatok mintavételi és elemzési protokolljainak kidolgozásához is felhasználhatók.

Az egy talajtípussal végzett aerob és anaerob vizsgálatok általában elegendőek az átalakítási útvonalak értékeléséhez (8) (10) (11). Az átalakulási sebességeket legalább három további talajban meg kell határozni (8) (10).

Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/-üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (10) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A vizsgált talajtípusoknak reprezentatívnak kell lenniük azon környezeti feltételek vonatkozásában, ahol a használat vagy kibocsátás történik. Azokat a vegyi anyagokat például, amelyek kibocsátása a szubtrópusi-trópusi éghajlaton történhet, Ferrasol vagy Nitosol (FAO-rendszer) talajokkal kell vizsgálni. A munkaértekezleten az ISO-útmutató (15) alapján ajánlásokat fogalmaztak meg a talajminták gyűjtésével, kezelésével és tárolásával kapcsolatosan is. Ennél a módszernél esik szó a rizstalajok alkalmazásáról is.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

„Vizsgálandó anyag”: bármely anyag, legyen az a kiindulási vegyület, vagy megfelelő átalakulási termék.

„Átalakulási termékek”: minden olyan anyag, amely a vizsgálandó anyag biotikus vagy abiotikus átalakulási reakcióinyomán keletkezik, beleértve a CO_2-t, illetve a megkötött maradványokban lévő összes termék.

„Megkötött maradványok”: A „megkötött maradványok” a talajban, növényekben vagy állatokban jelen lévő olyan vegyületek, amelyek a kiindulási vegyület vagy annak anyagcsereterméke(i)/-átalakulási termékei formájában extrahálás után is a mátrixban maradnak. Az extrakciós módszer alapjában véve nem változtathatja meg magukat a vegyületeket vagy a mátrix szerkezetét. A kötés jellege részben mátrixmódosító extrakciós módszerek, valamint kifinomult analitikai technikák segítségével tisztázható. Ez idáig kovalens, ionos és szorpciós kötéseket, valamint bezáródásokat azonosítottak ilyen módon. A megkötött maradványok létrejötte általánosságban szignifikánsan csökkenti a biológiai elérhetőséget és biológiai hozzáférhetőséget (12) (az IUPAC 1984-ben módosította (13)).

„Aerob átalakulás”: molekuláris oxigén jelenlétében végbemenő reakciók (14).

▼B

„Anaerob átalakulás”: molekuláris oxigén kizárásával végbemenő reakciók (14).

„Talaj”: ásványi és szerves kémiai komponensek keveréke, amelyek közül az utóbbiak magas szén- és nitrogéntartalmú, valamint nagy molekulasúlyú vegyületek, amelyeket apró élő szervezetek (főleg mikroorganizmusok) népesítenek be. A talajok kétféle állapotban kezelhetők:

a) érintetlen talajok, különféle talajtípusok jellegzetes rétegződésével, ahogy azok a múltban kialakultak;

b) megbolygatott talajok, például ahogy általában szántóföldeken találhatók, vagy amikor ásással mintákat vesznek belőlük és e vizsgálati módszer céljára azokat felhasználják (14).

„Mineralizáció”: a szerves vegyületek teljes mértékű lebomlása aerob körülmények között CO_2-vé és H_20-vá, illetve anaerob körülmények között CH_4-gyé, CO_2-vé és H_20-vá. E vizsgálati módszer vonatkozásában a ^{14}C-jelölt vegyületek alkalmazásakor a mineralizáció kiterjedt lebomlást jelent, amelynek során egy jelölt szénatom oxidálódik, és megfelelő mennyiségű $^{14}CO_2$ szabadul fel (14).

„Felezési idő”: t0,5, a vizsgálandó anyag 50 %-ának átalakulásához szükséges idő, ha az átalakulás elsőrendű kinetikával leírható; a felezési idő független a koncentrációtól.

„**DT_{50} (lebomlási idő 50)”:** az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 50 %-kal csökken; akkor nem azonos a felezési idővel (t0,5), ha az átalakulás nem elsőrendű kinetikát követ.

„DT_{75} (lebomlási idő 75)”: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 75 %-kal csökken.

„**DT_{90} (lebomlási idő 90)”:** az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 90 %-kal csökken.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Az átalakulási termékek spektroszkópiás és kromatográfiás módszerekkel történő jellemzéséhez és/vagy azonosításához referenciaanyagokat kell alkalmazni.

1.4. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A módszer minden vegyi anyaghoz alkalmazható (legyen az nem jelölt vagy jelölt anyag), amelyhez létezik kielégítően pontos és érzékeny analitikai módszer. Enyhén illékony, nem illékony, vízben oldható és vízben nem oldható vegyületekhez is alkalmazható. A vizsgálat nem alkalmazható olyan vegyi anyagokra, amelyek a talajban nagymértékben illékonyak (például gáz alakú növényvédő szerek, szerves oldószerek), és ezért nem lehet őket a vizsgálat kísérleti körülményei között a talajban tartani.

▼B

1.5. A VIZSGÁLANDÓ ANYAGGAL KAPCSOLATOS INFORMÁCIÓK

Az átalakulás sebességének mérésére nem jelölt vagy jelölt vizsgálandó anyag is alkalmazható. Jelölt anyagra olyankor van szükség, ha az átalakulás útvonalait kívánjuk tanulmányozni vagy anyagmérleget kívánunk felállítani. A ^{14}C-jelölés az ajánlott, de más izotópok, így például C, N, H vagy P is alkalmazható. Amennyire csak lehetséges, a jelölést a molekula legstabilabb részén vagy részein kell elhelyezni ([1]). A vizsgálandó anyagnak legalább 95 %-os tisztaságúnak kell lennie.

A talajban zajló aerob és anaerob átalakulás vizsgálatának elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatban az alábbi információkkal kell rendelkezni:

a) oldhatóság vízben (A6. módszer);

b) oldhatóság szerves oldószerekben;

c) gőznyomás (A4. módszer) és Henry-törvény állandó;

d) n-oktanol/víz megoszlási hányados (A8. módszer);

e) kémiai stabilitás sötétben (hidrolízis) (C7. módszer);

f) pKa, ha valamelyik molekula hajlamos a protonálódásra vagy deprotonálódásra (112. számú OECD-iránymutatás) (16).

További hasznos információk lehetnek a vizsgálandó anyagnak a talaj lakó mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitásával kapcsolatos adatok (C.21. és C.22. vizsgálati módszer) (16).

A vizsgálandó anyagok és átalakulási termékeik mennyiségi és minőségi meghatározására szolgáló analitikai módszereknek (köztük az extrakciós és gázlekötő módszereknek) rendelkezésre kell állniuk.

1.6. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Talajmintákat a vizsgálandó anyaggal kell kezelni, és ellenőrzött laboratóriumi körülmények között (állandó hőmérséklet és talajnedvesség) sötétben, biométer-típusú lombikban vagy átfolyásos rendszerekben inkubálni kell őket. Megfelelő időközönként talajmintákat kell venni, amelyekben extrahálás után meg kell határozni a vizsgálandó anyagot, illetve az átalakulási termékeket. Megfelelő adszorpciós eszközök segítségével illékony termékek is gyűjthetők elemzés céljára. ^{14}C-jelölt anyagok alkalmazásával, a fejlődő $^{14}CO_2$ befogása után megmérhetők a vizsgálandó anyag különféle mineralizációs sebességei, és megállapítható az anyagmérleg, ezen belül a lekötött maradványok képződése is.

1.7. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.7.1. **Visszanyerés**

A vizsgálandó anyag hozzáadása után azonnal legalább két másolati talajmintát elemezve megkaphatók az analitikai módszer ismételhetőségével és a vizsgálandó anyag alkalmazására szolgáló eljárás egységességével kapcsolatos első információk. A kísérletek későbbi szakaszában a visszanyeréseket a vonatkozó anyagmérlegek adják. A visszanyeréseknek jelölt vegyületek esetében 90 % és 110 % között (8), nem jelölt vegyületek esetében pedig 70 % és 110 % között (3) kell mozogniuk.

([1]) Ha a vizsgálandó anyag például egy gyűrűt tartalmaz, akkor ezt a gyűrűt kell megjelölni; ha a vizsgálandó anyag két vagy több gyűrűt is tartalmaz, külön vizsgálatokra lehet szükség az egyes jelölt gyűrűk sorsának megismeréséhez, illetve az átalakulási termékek keletkezésével kapcsolatos információk összegyűjtéséhez.

▼B

1.7.2. **Az analitikai módszer megismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgálandó anyag és átalakulási termékei mennyiségi meghatározása vonatkozásában (a kiindulási extrakciós hatékonyság kivételével) az analitikai módszer megismételhetősége az átalakulási termékek megjelenéséhez elegendő ideig történő inkubálás után ugyanannak a talaj kivonatnak két másolati mintában történő mérésével ellenőrizhető.

Az adott vizsgálandó anyagra és átalakulási termékeire az analitikai módszer kimutathatósági határértékének (LOD) legalább 0,01 $mg.kg^{-1}$ talaj (mint vizsgálandó anyag), vagy – ha az a kisebb – az alkalmazott dózis 1 %-ának kell lennie. Meg kell határozni továbbá a mennyiségi meghatározás határértékét (LOQ) is.

1.7.3. **Az átalakulási adatok pontossága**

Ha a vizsgálandó anyag koncentrációját az idő függvényében regressziós analízisnek vetik alá, akkor megfelelő információk nyerhetők az átalakulási görbe megbízhatóságáról, és lehetővé válik a konfidenciahatárok kiszámítása a felezési időkhöz (pszeudo-elsőrendű kinetika esetén) vagy a DT_{50}-értékekhez, illetve adott esetben a DT_{75}- és DT_{90}-értékekhez is.

1.8. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.8.1. **Berendezés és reagensek**

Az inkubálórendszerek statikus, zárt rendszerekből vagy megfelelő átfolyásos rendszerekből állnak (7) (17). Megfelelő átfolyásos talajinkubáló berendezésekre és biométer-típusú lombikokra az 1., illetve 2. ábrán láthatók példák. Mindkét inkubálórendszernek megvannak az előnyei és korlátai (7) (17).

Szabványos laboratóriumi eszközökre van szükség, különösen a következőkre:

— analitikai műszerek, például GLC-, HPLC-, TLCLC-berendezés, ezen belül a radioaktívan jelölt vagy nem jelölt anyagok analízisére vagy a fordított izotóphígítási módszerhez alkalmazható megfelelő detektáló rendszerek,

— minőségi meghatározásra alkalmazható műszerek (például MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR stb.),

— folyadékszcintillációs számláló,

— oxidálószer a radioaktív anyagok elégetéséhez,

— centrifuga,

— extrakciós készülék (például centrifugacsövek hideg extraháláshoz és Soxhlet-készülék reflux alatt végzett folytonos extraháláshoz),

— oldatok és kivonatok töményítésére szolgáló berendezések (pl. rotációs evaporátor),

— vízfürdő,

— mechanikai keverőeszközök (pl. dagasztógép, rotációs keverő).

▼B

Az alkalmazott kémiai reagensek például az alábbiak:

— NaOH, analitikai minőségű, 2 mol dm^{-3}, vagy más megfelelő bázis (pl. KOH, etanolamin),

— H_2SO_4, analitikai minőségű, 0,05 mol. dm^{-3},

— etilén-glikol, analitikai minőségű,

— szilárd adszorpciós anyagok, például nátronmész, és poliuretán dugók,

— szerves oldószerek, analitikai minőségű, például aceton, metanol stb.,

— szcintillációs folyadék.

1.8.2. **A vizsgálandó anyag alkalmazása**

A vizsgálandó anyag talajhoz adásához és abban történő eloszlatásához azt először fel kell oldani (ioncserélt vagy desztillált) vízben vagy ha szükséges, minimális mennyiségű acetonban vagy más szerves oldószerben (6), amelyben a vizsgálandó anyag kellően oldható és stabil. A kiválasztott oldószer mennyisége azonban nem gyakorolhat szignifikáns hatásokat a talaj mikrobiális aktivitására (lásd az 1.5. és az 1.9.2–1.9.3. szakaszt). Kerülni kell az olyan oldószerek, például a kloroform, a diklór-metán és egyéb halogénezett oldószerek alkalmazását, amelyek gátolják a mikrobiális aktivitást.

A vizsgálandó anyag szilárd formában, például kvarchomokkal keverve (6) vagy elég száraz és sterilezett, kis térfogatú teszttalajrészmintában is a talajhoz adható. Ha a vizsgálandó anyagot oldószer alkalmazásával adjuk a talajhoz, az oldószernek el kell párolognia a vizsgálandó anyaggal kezelt részminta eredeti, nem steril talajmintához történő hozzáadása előtt.

Általános vegyi anyagok esetében, amelyeknél a talajba való bejutás fő útvonala a szennyvíziszap vagy a mezőgazdasági tevékenységek, a vizsgálandó anyagot először iszaphoz kell keverni, és ebben a formában kell a talajmintába juttatni (lásd az 1.9.2. és az 1.9.3. szakaszt).

A formulázott termékek alkalmazása általában nem ajánlott. A rosszul oldódó vizsgálandó anyagok esetében azonban megfelelő alternatíva lehet a formulázott anyag alkalmazása.

1.8.3. **Talajok**

1.8.3.1. *A talaj kiválasztása*

Az átalakulási útvonal meghatározásához reprezentatív talajok alkalmazhatók, így például ajánlott az olyan homokos vályog vagy iszapos vályog vagy vályog, vagy a vályogos homok (a FAO és az USDA osztályozása szerint (18)), amelynek pH-ja 5,5 és 8,0 közötti, szervesszén-tartalma 0,5–2,5 %, mikrobiális biomasszája pedig legalább a teljes szervesszéntartalom 1 %-ának megfelelő (10).

Az átalakulási sebesség vizsgálatokhoz legalább három további olyan talajt kell alkalmazni, amelyek jól reprezentálnak egy sor megfelelő talajtípust. A különféle talajokban eltérőnek kell lenniük a szervesszén-tartalom, a pH, az agyagtartalom és a mikrobiális biomassza értékeinek.

▼B

A talajokat legalább a szerkezet (%homok, %iszap, %agyag) (a FAO és az USDA osztályozása szerint (18)), a pH, a kationcserélő kapacitás, a szerves szén, a térfogatsűrűség, a vízvisszatartási jellemzők ([1]) 1 és mikrobiális biomassza (csak az aerob vizsgálatokhoz) szempontjából jellemezni kell. Az eredmények értelmezéséhez hasznosak lehetnek a talajok tulajdonságaival kapcsolatos további információk is. A talajok jellemzőinek meghatározására a (19), (20), (21), (22) és (23) hivatkozásban ajánlott módszerek alkalmazhatók. A mikrobiális biomasszát a szubsztrátindukált légzési (SIR) módszerrel (25) (26) vagy alternatív módszerekkel (20) kell meghatározni.

1.8.3.2. *A talajok gyűjtése, kezelése és tárolása*

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések, a szerves és szervetlen trágyákkal végzett kezelések, a biológiai anyagok hozzáadása vagy egyéb szennyezések. Nem alkalmazhatók átalakulási vizsgálatokhoz olyan talajok, amelyeket az elmúlt négy évben a vizsgálandó anyaggal vagy szerkezeti analógjaival kezeltek (10) (15).

A talajt frissen kell begyűjteni a területről (az A-rétegből vagy a felső 20 cm-es rétegből) a benne lévő talajnedvességgel együtt, amely megkönnyíti a szitálást. A rizsföldekről származó talajok kivételével kerülni kell a mintavételt a hosszabb (> 30 napos) szárazságok, fagyok vagy áradások idején vagy közvetlenül ezek után (14). A mintákat úgy kell szállítani, hogy közben minimális legyen a talaj víztartalmának változása, és – lehetőség szerint – sötétben kell tartani, illetve biztosítani kell a szabad levegőbeáramlást. Erre a célra általában megfelel egy lazán összekötött polietilén zsák.

A talajt a mintavételt követően a lehető leggyorsabban fel kell dolgozni. El kell távolítani belőle a növényi részeket, a nagyobb méretű talajfaunát és a köveket, majd 2 mm-es szitán át kell szitálni, ami eltávolítja a kisebb köveket, az állati és növényi törmeléket is. A szitálás előtt meg kell akadályozni a talaj erőteljes kiszáradását és összepréselődését (15).

Ha a téli időszakban (a talaj fagyottsága vagy a hótakaró miatt) nehézkessé válik a mintavétel, akkor üvegházban, növénytakaró (pl. fű vagy fű/lóhere keverék) alatt tárolt készletekből is vehető talajminta. A frissen gyűjtött talajokon végzett vizsgálatok a legelőnyösebbek, de ha a begyűjtött és feldolgozott talajt a vizsgálatok megkezdése előtt tárolni kell, akkor a mikrobiális aktivitás megőrzése érdekében ez csak megfelelő körülmények között és csak korlátozott ideig (4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig) megengedett ([2]). A biológiai átalakulási kísérletekhez alkalmazott talajok begyűjtésével, kezelésével és tárolásával kapcsolatos részletes instrukciók a (8), (10), (15), (26) és (27) hivatkozásban találhatók.

([1]) A talajok vízvisszatartási jellemzői mérhetők szántóföldi kapacitásként, vízmegtartó kapacitásként vagy vízszívó erőként (pF). A magyarázatokat lásd az 1. függelékben. A vizsgálati jelentésben ki kell térni arra, hogy a talajok vízvisszatartási jellemzőit és térfogatsűrűségét érintetlen szántóföldi mintákban vagy vagy megbolygatott (feldolgozott) mintákban mérték-e.

([2]) A legfrissebb kutatási eredmények szerint –20 °C -on a mérsékelt éghajlatról származó talajok három hónapnál tovább is eltarthatók (28) (29) anélkül, hogy szignifikénsan csökkenne a mikrobiális aktivitás.

▼B

Mielőtt a feldolgozott talaj felhasználásra kerülne ehhez a vizsgálathoz, a mintákat elő kell inkubálni a csírázás lehetővé tétele és a magok eltávolítása, valamint a mikrobiális anyagcsere-egyensúlynak a mintavételi vagy tárolási körülményekről az inkubációs körülményekre való átállást követően történő helyreállítása érdekében. Általában megfelelő, ha az előinkubálást 2–28 napig végezzük olyan hőmérsékleten és olyan nedvesség mellett, amely nagyjából megközelíti a vizsgálati körülményekre jellemző viszonyokat (15). A tárolás és előinkubálás együttes időtartama nem haladhatja meg a három hónapot.

1.9. A VIZSGÁLAT VÉGREHAJTÁSA

1.9.1. **Vizsgálati körülmények**

1.9.1.1. *Vizsgálati hőmérséklet*

A talajokat a vizsgálat teljes időtartama alatt sötétben és olyan állandó hőmérsékleten kell inkubálni, amely reprezentatív a használat vagy kibocsátás területén uralkodó éghajlati viszonyokra. Az ajánlott hőmérséklet minden olyan vizsgálandó anyag esetében 20 ± 2 °C, amelyek mérsékelt éghajlaton bejuthatnak a talajba. A hőmérsékletet nyomon kell követni.

A hidegebb éghajlatokon (pl. az északi országokban vagy az őszi-téli időszakban) alkalmazott vagy kibocsátott anyagok esetében további talajmintákat is inkubálni kell, de alacsonyabb hőmérsékleten (pl. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Nedvességtartalom*

Az aerob körülmények között végzett átalakulási vizsgálatok esetében a talaj nedvességtartalmát ([1]) úgy kell beállítani, hogy a pF-értéket 2,0 és 2,5 között tartsuk (3). A talaj nedvességtartalmát víztömeg/száraz talaj tömeg egységben kell kifejezni, és rendszeresen ellenőrizni kell (például kéthetente) inkubációs lombik tömegének megmérésével, és a vízveszteség víz (lehetőleg sterilszűrt csapvíz) hozzáadásával történő kompenzálásával. Figyelni kell arra, hogy a víz hozzáadásakor megakadályozzuk vagy minimálisra csökkentsük a vizsgálandó anyag és/vagy az átalakulási termékek párolgási és/vagy esetleges fotodegradációs veszteségeit.

Az anaerob vagy rizsföldi körülmények között végzett átalakulási vizsgálatoknál a talajt elárasztással kell víztelítetté tenni.

1.9.1.3. *Aerob inkubációs körülmények*

Az átfolyásos rendszerekben az aerob körülményeket a rendszer időről időre vízzel történő átöblítésével vagy nedves levegő folyamatos átfúvásával kell fenntartani. A biométer lombikokban a légcserét diffúzió segítségével kell fenntartani.

1.9.1.4. *Steril aerob körülmények*

A vizsgálandó anyag abiotikus átalakulásának jelentőségével kapcsolatban úgy nyerhetők információk, hogy a mintákat sterilezzük (a sterilezési módszereket lásd a (16) és (29) hivatkozásban), hozzáadjuk a steril vizsgálandó anyagot (például az oldat sterilszűrőn keresztül történő hozzáadásával) és nedves levegővel átszellőztetjük, az 1.9.1.3. szakaszban leírtak szerint. A rizstalajok esetében a talajt és a vizet sterilizálni kell, az inkubálást pedig az 1.9.1.6. szakaszban leírtak szerint kell végezni.

([1]) A talaj nem lehet sem túl nedves, sem túl száraz annak érdekében, hogy fenntartható legyen a talaj mikroflórájának megfelelő szellőzése és tápanyagellátása. Az optimális mikrobanövekedéshez az ajánlott nedvességtartalom a víztartóképesség (WHC) 40 és 60 %-a között, illetve 0,1 és 0,33 bar között mozog (6). Ez utóbbi tartomány pF 2,0–2,5-nek felel meg. A különböző talajtípusok tipikus nevességtartalma a 2. függelékben található.

▼B

1.9.1.5. *Anaerob inkubációs körülmények*

Anaerob körülmények kialakításához és fenntartásához a vizsgálandó anyaggal kezelt és 30 napig vagy egy felezési időig vagy egy DT_{50}-ig (amelyik a három közül a legrövidebb) aerob körülmények között inkubált talajt vízzel kell elárasztani (1–3 cm-es vízréteg), az inkubációs rendszert pedig inert gázzal (például nitrogénnel vagy argonnal) kell átöblíteni ([1]). A vizsgálati rendszernek lehetővé kell tennie a különféle méréseket, így például a pH, az oxigénkoncentráció és a redoxpotenciál meghatározását, továbbá csapdákat is tartalmaznia kell az illékony termékek befogására. A biométer-típusú rendszert le kell zárni a levegő diffúzióval történő bejutásának megakadályozása érdekében.

1.9.1.6. *Rizstalajok inkubációs körülményei*

A rizstalajokban végbemenő átalakulások tanulmányozására a talajt körülbelül 1–5 cm vízréteggel kell elárasztani, majd a vizsgálandó anyagot a vízfázisba kell juttatni (9). Javasolt legalább 5 cm mélységű talajréteg alkalmazása. A rendszer levegővel átszellőztetett, ugyanúgy, mint az aerob feltételek esetén. Nyomon kell követni, és rögzíteni kell a vizes réteg pH-ját, oxigénkoncentrációját és redoxpotenciálját. Az átalakulási vizsgálatok megkezdése előtt legalább kéthetes előinkubálási időszakra van szükség (lásd az 1.8.3.2. szakaszt).

1.9.1.7. *A vizsgálat időtartama*

A sebesség- és útvonalvizsgálatok időtartama általában nem haladhatja meg a 120 napot ([2]) (3) (6) (8), mivel azt követően egy, a természetes utánpótlástól izolált mesterséges laboratóriumi rendszerben idővel a talaj mikrobiális aktivitásának csökkenése lenne várható. Ahol az a vizsgálandó anyag csökkenésének, valamint a fő átalakulási termékek képződésének és csökkenésének jellemzéséhez szükséges, a vizsgálatok meghosszabbíthatók (például 6 vagy 12 hónapra) (8). A hosszabb inkubációs időtartamokat a vizsgálati jelentésben meg kell indokolni, és csatolni kell az ilyen hosszabb időtartamok során és végén elvégzett biomasszamérések eredményeit is.

1.9.2. **A vizsgálat végrehajtása**

Minden inkubációs lombikba (lásd a 3. függelék 1. és 2. ábráját) körülbelül 50–200 g talajt (szárazsúlyra vetítve) kell behelyezni, majd azt az 1.8.2 szakaszban leírt módszerek egyikének alkalmazásával a vizsgálandó anyaggal kell kezelni. Ha a vizsgálandó anyag alkalmazásához szerves oldószert használunk, azt párologtatással el kell távolítani a talajból. A talajt ezután spatulával és/vagy a lombik rázogatásával alaposan össze kell keverni. Ha a vizsgálatot rizsföldi körülmények között végezzük, a talajt és a vizet a vizsgálandó anyag alkalmazása után alaposan össze kell keverni. A kezelt talajok kis részleteiben (pl. 1-1 g-jában) meg kell határozni a vizsgálandó anyag mennyiségét az egyenletes eloszlás ellenőrzése érdekében. Az ezt kiváltó alternatív módszert lásd lent.

([1]) A feltalajokban túlnyomóan aerob viszonyok uralkodnak és ugyanígy a felszín alatti talajokban is, ahogyan azt egy, az Európai Unió által szponzorált kutatási program (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, fieldsite, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden] is igazolta. Anaerob feltételek csak alkalomszerűen, a talajok erős esőzések utáni elárasztásakor alakulnak ki, illetve amikor a rizsföldeket elárasztják.

([2]) Az aerob vizsgálatokat jóval a 120. nap előtt is be lehet fejezni, ha addigra egyértelműen elértük a végleges átalakítási útvonalat és a teljes mineralizációt. A vizsgálat 120 napon túl is befejezhető, illetve akkor is, ha a vizsgálandó anyag legalább 90 %-a átalakult, de csak akkor, ha már legalább 5 % CO_2 képződött.

▼B

A kezelési aránynak meg kell felelnie az adott növényvédő szer legmagasabb, a használati utasításban javasolt alkalmazási arányának, és a terepen megfelelő talaj mélységig (például a talaj felső 10 cm-es rétege [1]) egységes beépülést kell biztosítania. A talajba való beépülés nélkül csak a levélzetre vagy a talajra alkalmazott vegyületek esetében például 2,5 cm a megfelelő mélység annak kiszámításához, hogy mennyi vegyületet kell az egyes lombikokba bejuttatni. A talajba beépülő vegyületek esetében a megfelelő mélység a használati utasításban megadott beépülési mélység. Általános vegyi anyagok esetében az alkalmazási arányt az alapján kell megbecsülni, hogy melyik a legjellemzőbb bejutási útvonal; ha a talajba jutás fő útvonala például a szennyvíziszap, a vegyületet olyan koncentrációban kell az iszapba bejuttatni, amely tükrözi az iszapban várható koncentrációt, és a talajhoz adandó iszap mennyiségének tükröznie kell a mezőgazdasági talajok normál iszapterhelését. Ha ez a koncentráció nem elég magas a fő átalakulási termékek azonosításához, hasznos lehet külön talajminták nagyobb koncentrációkkal történő inkubálása, de kerülni kell a talaj mikrobiális funkcióját befolyásoló túlzott mennyiségeket (lásd az 1.5 és az 1.8.2. szakaszt).

Vagy nagyobb mennyiségű (1-2 kg) talaj is kezelhető a vizsgálandó anyaggal, megfelelő keverő berendezésben alaposan elkeverve és végül kis, 50–200 g-os részletekben az inkubációs lombikba téve (például mintaosztók segítségével). A kezelt talaj kis (például 1 g-os) részleteiben meg kell határozni a vizsgálandó anyag mennyiségét, így ellenőrizve annak egyenletes talajbeli eloszlását. Az ilyen eljárás azért előnyös, mert lehetővé teszi a vizsgálandó anyag még egyenletesebb eloszlását a talajban.

A nem kezelt talajmintákat is ugyanolyan (aerob) körülmények között kell inkubálni, mint a vizsgálandó anyaggal kezelt mintákat. Ezeket a mintákat a biomasszának a vizsgálat során és végén történő meghatározására kell felhasználni.

Ha a vizsgálandó anyagot szerves oldószer(ek)ben történő feloldás után visszük fel a talajra, az azonos mennyiségű oldószerrel vagy oldószerekkel kezelt talajmintákat ugyanolyan (aerob) körülmények között kell inkubálni, mint a vizsgálandó anyaggal kezelt mintákat. Ezeket a mintákat a vizsgálatok elején, alatt és végén végzett biomasszamérésekhez kell felhasználni, amelyekkel az oldószer(ek)nek a mikrobás biomasszára gyakorolt esetleges hatásai mérhetők fel.

A kezelt talajokat tartalmazó lombikokat vagy az 1. ábrán bemutatott átfolyásos rendszerhez kell kapcsolni, vagy a 2. ábrán bemutatott adszorpciós oszloppal kell lezárni (lásd a 3. függeléket).

([1]) A kiindulási koncentráció területi alapon történő kiszámítása a következő egyenlet segítségével:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha]\cdot 10^{6}[mg/kg]}{l[m]\cdot 10^{4}[m^{2}/ha]\cdot d\left[kg_{soil}/m^{3}\right]}$$

C_{soil} = kiindulási koncentráció a talajban [mg·kg^{-1}]

A = alkalmazásiarány [kg· ha^{-1}]; l = a szántóföldi talajréteg vastagsága [m]; d=a talaj száraz térfogat sűrűsége [kg· m^{-3}].

Általános szabály, hogy az 1 kg· ha^{-1} alkalmazási arány a talaj felsi, mintegy 10cm-es rétegében 1 mg· kg^{-1} koncentrációt alakít ki (feltéve, hogy a térfogatsűrűség 1 g· cm^{-3}).

▼B

1.9.3. **Mintavétel és mérés**

Megfelelő időközönként párhuzamos inkubációs lombikokat kell eltávolítani, és a talajmintákat megfelelő, különböző polaritású oldószerekkel kell extrahálni, majd meg kell határozni bennük a vizsgálandó anyagot és/vagy az átalakulási termékeket. Egy jól megtervezett vizsgálatban elegendő számú lombikot használunk ahhoz, hogy minden egyes mintavételi időpontban két lombikból tudjuk mérést végezni. Az egyes talajminták inkubálása során és végén különböző időközönként (az első hónapban 7 naponta, majd utána 17 naponta) el kell távolítani az adszorpciós oldatot vagy szilárd adszorpciós anyagot, és meg kell bennük határozni az illékony termékeket. A közvetlenül az alkalmazás után vett talajmintán (0. napi minta) kívül legalább öt további mintavételi pontot kell beiktatni. Az időközöket úgy kell megválasztani, hogy meghatározható legyen a vizsgálandó anyag csökkenésének mintázata és az átalakulási termékek képződésének és csökkenésének mintázata (például 0., 1., 3., 7. nap; 2, 3 hét; 1, 2, 3 hónap stb.).

^{14}C-jelölt vizsgálandó anyag alkalmazása esetén a nem extrahálható radioaktivitást égetéssel kell meghatározni, és minden egyes mintavételi intervallumra anyagmérleget kell számítani.

Az anaerob és a rizstalajos inkubálás esetén a talajban és a vizes fázisban együttesen kell meghatározni a vizsgálandó anyagot és az átalakítási termékeket, vagy az extrahálás és mérés előtt szűréssel vagy centrifugál ással kell szétválasztani őket.

1.9.4. **Opcionális vizsgálatok**

A hőmérsékletnek és a talajnedvességnek a vizsgálandó anyag és/vagy átalakítási termékei talajbeli átalakulására gyakorolt hatásának becsléséhez hasznos lehet, ha más hőmérsékleteken és talajnedvességek mellett is végzünk aerob, nem steril vizsgálatokat.

A nem extrahálható radioaktivitás további jellemzése megkísérelhető például szuperkritikus folyadékextrakcióval is.

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

A vizsgálandó anyag, az átalakulási termékek, az illékony anyagok (csak %-osan), és a nem extrahálható rész mennyiségét minden egyes mintavételi intervallumra az alkalmazott kiindulási koncentráció %-ában, illetve adott esetben mg.kg^{-1} talaj (szárazsúlyra vetítve) egységben kell megadni. Az alkalmazott kiindulási koncentráció százalékában anyagmérleget is fel kell állítani minden egyes mintavételi intervallumra. A vizsgálandó anyag koncentrációit az idő függvényében ábrázolva megbecsülhető a vizsgálandó anyag átalakulásának felezési ideje vagy DT_{50}-értéke. Meg kell határozni a fő átalakulási termékeket, valamint ezek koncentrációját is fel kell venni az idő függvényében, hogy képződési és csökkenési sebességük megállapítható legyen. Fő átalakulási termék minden olyan termék, amely a vizsgálat során bármikor az alkalmazott dózis legalább 10 %-nak megfelelő mennyiségben van jelen.

A befogott illékony termékek is adhatnak némi információt a vizsgálandó anyag és annak átalakulási termékei talajból való elillanási hajlamáról.

▼B

A felezési idő vagy DT_{50}-értékek, illetve adott esetben a DT_{75}- és DT_{90}-értékek pontosabb meghatározását megfelelő kinetikai modellszámítások alkalmazásával kell elvégezni. A felezési időt és a DT_{50}-értékeket az alkalmazott modell leírásával, a kinetika rendűségével és a determinációs koefficienssel (r_2) együtt kell a jelentésben feltüntetni. Az elsőrendű kinetikát kell előnyben részesíteni, kivéve, ha $r_2 < 0{,}7$. Adott esetben a számításokat a fő átalakulási termékekre is alkalmazni kell. A megfelelő modellekre példák a (31)–(35) hivatkozásban találhatók.

A sebességvizsgálatok több különböző hőmérsékleten történő végzése esetén az átalakítási sebességeket kísérleti hőmérséklet tartományon belül a hőmérséklet függvényében kell leírni az alábbi Arrhenius-összefüggés alkalmazásával:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ vagy } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

ahol In A és B az In k-nak az l/T függvényében való lineáris regressziójával előállított legjobb illesztésű egyenes tengelymetszetéből és meredekségből származó regressziós állandók; a k a T hőmérsékletnél kapott sebességi állandó; T pedig a hőmérséklet Kelvinben megadva. Ügyelni kell arra, hogy abban az esetben, ha az átalakítást a mikrobiális hatás szabályozza, akkor az Arrhenius-összefüggés csak egy igen korlátozott hőmérsékleti tartományban lesz érvényes.

2.2. ÉRTÉKELÉS ÉS AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

Bár a vizsgálatokat mesterséges laboratóriumi rendszerekben végezzük, az eredmények lehetővé teszik a vizsgálandó anyagok átalakulási sebességének, valamint az átalakulási termékek képződési és csökkenési sebességének szántóföldi körülmények közötti becslését (36) (37).

A vizsgálandó anyag átalakulási útvonalának vizsgálata információt szolgáltat arról, hogy az alkalmazott anyag szerkezete milyen változásokon megy keresztül a talajban a kémiai és mikrobiális reakciók hatására.

3. **JELENTÉS**

VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— hétköznapi név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyagok alkalmazása esetén a jelölés(ek) elhelyezkedése) és a lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt),

— a vizsgálandó anyag tisztasága (szennyezései),

— a jelölt anyagok radiokémiai tisztasága és specifikus aktivitása (adott esetben).

Referenciaanyagok:

— az átalakítási termék jellemzésére és/vagy azonosítására alkalmazott referenciaanyagok kémiai elnevezése és szerkezete.

Vizsgált talajok:

— a gyűjtés helyével kapcsolatos adatok,

— a talajmintavétel időpontja és az alkalmazott eljárás,

▼B

— a talajok tulajdonságai, például a pH, a szervesszén-tartalom, a szerkezet (% homok, % iszap, % agyag), a kationcserélő kapacitás, a térfogatsűrűség, a vízvisszatartási jellemzők, és a mikrobiális biomassza,

— adott esetben a talaj tárolásának időtartama és körülményei.

Vizsgálati körülmények:

— a vizsgálatok elvégzésének időpontjai,

— a vizsgálandó anyag alkalmazott mennyisége,

— az alkalmazott oldószerek és a vizsgálandó anyag alkalmazására használt módszer,

— a kezdetben kezelt és az egyes analízisek időpontjában megmintázott talaj tömege,

— az alkalmazott inkubációs rendszer ismertetése,

— légáramsebesség (csak az átfolyásos rendszerek esetében),

— a kísérleti rendszer hőmérséklete,

— a talaj nedvességtartalma az inkubálás során,

— mikrobiális biomassza az aerob vizsgálatok kezdetekor, alatt és végén,

— pH, oxigénkoncentráció és redoxpotenciál az anaerob és rizsföldi vizsgálatok kezdetekor, alatt és végén,

— extrakciós módszer(ek),

— a vizsgálandó anyagnak és fontosabb átalakulási termékeinek a talajban és az adszorpciós anyagokban történő mennyiségi és minőségi meghatározására alkalmazott módszerek,

— másolati minták és ellenőrző minták száma.

Eredmények:

— a mikrobiális aktivitás meghatározásának eredményei,

— az alkalmazott analitikai módszerek megismételhetősége és érzékenysége,

— visszanyerési arányok (egy érvényes vizsgálat %-os értékei az 1.7.1. szakaszban vannak feltüntetve),

— az alkalmazott kiindulási dózis %-ában és adott esetben $mg.kg^{-1}$ talaj (szárazsúlyra vetítve) egységben is kifejezett eredmények táblázatos összefoglalása,

— anyagmérleg a vizsgálatok közben és végén,

— a nem extrahálható (kötött) talajbeli radioaktivitás vagy maradványok jellemzése,

— a felszabaduló CO_2 és más illékony vegyületek mennyisége,

— a talajbeli koncentráció időbeli függvényének ábrázolása a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire,

— felezési idő vagy DT_{50}-, DT_{75}- és DT_{90}-értékek a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire, a konfidenciahatárokkal együtt,

▼B

— a steril körülmények közötti abiotikus lebontási sebesség becslése,

— a vizsgálandó anyag és adott esetben annak fő átalakulási termékei átalakulási kinetikájának becslése,

— adott esetben az átalakítás javasolt útvonalai,

— az eredmények tárgyalása és értelmezése,

— nyers adatok (minta kromatogramok, átalakítási sebességek mintaszámításai, és az átalakulási termékek azonosításnak módja).

4. **SZAKIRODALOM**

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. Európai Unió (EU) (1995). A Bizottság 1995. július 14-i 95/36/-EK irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról. AII. melléklet A. része és III. melléklet A. része: A növényvédő szerek sorsa és viselkedése a környezetben.

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. (Talajminőség. Útmutató a talajban levő szerves vegyi anyagok aerob feltételek melletti biológiai lebonthatóságának laboratóriumi vizsgálatára.)

7. ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions. (Talajminőség. Laboratóriumi inkubációs rendszerek a talajban lévő szerves vegyi anyagok aerob feltételek mellett végbemenő mineralizációjának vizsgálatához)

8. SET AC (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. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

16. A 67/548/EGK irányelv V. melléklete.

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. AL. 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., Schachtschabel, 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. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

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 16th 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, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, 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. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47-60.

36. Gustafson DL, 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

1. függelék

VÍZSZÍVÓ ERŐ, SZÁNTÓFÖLDI VÍZKAPACITÁS (FC) ÉS VÍZTARTÓ KÉPESSÉG (WHC) ([1])

A vízoszlop magassága [cm]	pF ([a])	bar ([b])	Megegyzések
10^7	7	10^4	Száraz talaj
$1{,}6 \cdot 10^4$	4,2	16	Hervadáspont
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])	Szántóföldi vízkapacitás tartomány ([d])
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (közelítés)
1	0	0,001	Vízzel telített talaj

([a]) pF = a vízoszlopmagasság cm-ben kifejezett értékéknek logaritmusa.
([b]) 1 bar = 10^5 Pa.
([c]) Homokban körülbelül 10 %-os, vályogban körülbelül 35 %-os, agyagban pedig körülbelül 45 %-os víztartalomnak felel meg.
([d]) A szántóföldi vízkapacitás nem állandó, hanem talajtípusként eltérő, és pF 1,5 és 2,5 között változik.

A vízszívó erőt vízoszlop-cm vagy bar mértékegységben mérjük. A szívóerő nagysága igen széles tartományban mozoghat, ezért egyszerűen csak pF-értékként adjuk meg, amely a vízoszlop-cm érték logaritmusa.

A szántóföldi vízkapacitás azt a vízmennyiséget jelenti, amelyet egy természetes talaj egy hosszabb esőzés vagy kellő mértékű öntözés után 2 nappal gravitáció ellenében tárolni tud. A szántóföldi vízkapacitást érintetlen talajban, in situ, a terepen határozzák meg. A mérés tehát nem alkalmazható megbolygatott, laboratóriumi talajmintákra. A megbolygatott mintákban meghatározott FC-értékek nagyobb szisztematikus varianciát mutathatnak.

A víztartó képességet (WHC) laboratóriumban határozzák meg érintetlen és megbolygatott talajokban úgy, hogy egy talajoszlopot kapilláris transzport útján vízzel telítenek. Különösen jól alkalmazható megbolygatott talajok esetében, és akár 30 %-kal is meghaladhatja a szántóföldi vízkapacitást (1). Emellett egyszerűbben meghatározható kísérletileg, mint a megbízható FC-értékek.

Megjegyzések

([1]) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

2. függelék

KÜLÖNBÖZŐ ORSZÁGOKBÓL SZÁRMAZÓ KÜLÖNBÖZŐ TALAJTÍPUSOK NEDVESSÉGTARTALMA (G VÍZ/100 G SZÁRAZ TALAJ)

Talajtípus	Ország	Talajnedvesség		
		WHC (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Homok	Németország	28,7	8,8	3,9
Vályogos homok	Németország	50,4	17,9	12,1
Vályogos homok	Svájc	44,0	35,3	9,2
Iszapos vályog	Svájc	72,8	56,6	28,4
Agyoagos vályog	Brazília	69,7	38,4	27,3
Agyoagos vályog	Japán	74,4	57,8	31,4
Homokos vályog	Japán	82,4	59,2	36,0
Iszapos vályog	USA	47,2	33,2	18,8
Homokos vályog	USA	40,4	25,2	13,3

(1) Víztartó képesség

▼B

3. függelék

1. ábra

Példa vegyi anyagok talajbeli átalakulásának vizsgálatára szolgáló át folyásos készülékre ([1]) ([2])

1: tűszelep

2: vizet tartalmazó gázmosó üveg

3: ultramembrán (csak steril körülmények esetén), pórus-méret: 0,2 μm

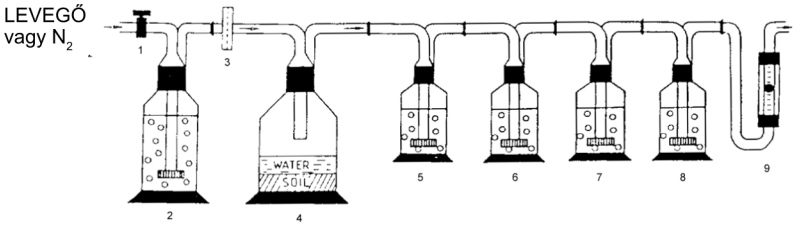
4: talajanyagcsere-palack (vizes elárasztás csak anaerob vagy rizsföldi mérési körülmények esetén)

5: etilén-glikol-csapda az illékony szerves vegyületekhez

6: kénsavcsapda a lúgos illékony vegyületekhez

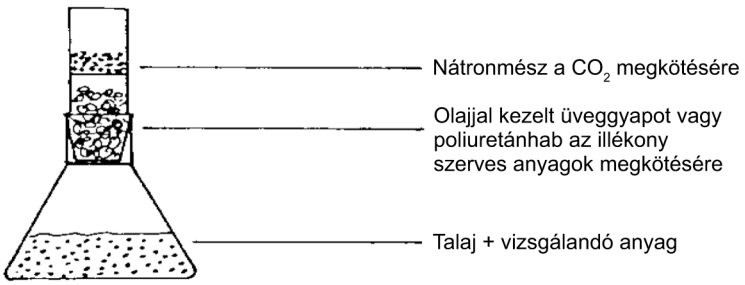
7, 8: nátrium-hidroxid-csapda a CO_2-höz és más savas illékony vegyületekhez

9: áramlásmérő.



2. ábra

Példa vegyi anyagok talajbeli átalakulásának vizsgálatára szolgáló biométer-típusú lombikra ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. 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 ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS VÍZI ÜLEDÉKRENDSZEREKBEN**

1. **MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 308 (2002) módszer megfelelője.

1.1. BEVEZETÉS

A sekély és mély felszíni vizekbe a vegyi anyagok például a következő útvonalakon keresztül juthatnak be: közvetlen alkalmazás, permetszéthordás, felszíni elfolyás, belvízelvezetés, hulladéklerakás, ipari, háztartási vagy mezőgazdasági szennyvizek és légköri kiülepedés. Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amellyel szerves anyagok aerob és anaerob átalakulását vizsgálhatjuk vízi üledékrendszerekben. Ez a módszer meglévő irányelveken alapul (1) (2) (3) (4) (5) (6). Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (7) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó üledékek számáról és típusáról. A munkaértekezlet egy ISO Útmutató (8) alapján ajánlásokat fogalmazott meg az üledékminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról is. Az ilyen vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében van szükség, amelyek közvetlenül a vizekbe kerülnek, vagy amelyek a fenti útvonalakon át valószínűleg bekerülnek a vízi környezetbe.

A természetes vízi üledékrendszerekben a felső vízfázis gyakran aerob. Az üledék felszíni rétege lehet aerob vagy anaerob is, a mélyebb üledék viszont általában anaerob. Ez a dokumentum aerob és anaerob vizsgálatokat is ismertet annak érdekében, hogy a fenti lehetőségek mindegyikét felölelje. Az aerob vizsgálat egy aerob üledékréteg felett elhelyezkedő aerob vízoszlopot szimulál, ahol az aerob üledékréteget alulról egy anaerob gradiens határolja. Az anaerob vizsgálat egy teljesen anaerob víz-üledék rendszert szimulál. Ha a körülmények arra utalnak, hogy jelentős mértékben el kell térni az itt megfogalmazott ajánlásoktól, például amiatt, hogy ép üledékmagokat vagy olyan üledékeket használunk, amelyek esetleg érintkezésbe léphettek a vizsgálandó anyaggal, akkor a célra más módszerek is rendelkezésre állnak (9).

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Minden esetben SI (Standard International) egységeket kell használni.

„Vizsgálandó anyag”: bármely anyag, legyen az a kiindulási vegyület, vagy megfelelő átalakulási termék.

„Átalakulási termékek”: minden olyan anyag, amely a vizsgálandó anyag biotikus és abiotikus átalakulási reakcióiban keletkezik, ideértve a CO_2-t és minden kötött maradványt is.

„Kötött maradványok”: a „kötött maradványok” a talajban, növényekben vagy állatokban jelen lévő olyan vegyületek, amelyek a kiindulási anyag vagy anyagcsereterméke(i) formájában extrakció után is a mátrixban maradnak. Az extrakciós módszer alapjában véve nem változtathatja meg magukat a vegyületeket vagy a mátrix szerkezetét. A kötés jellege részben mátrixmódosító extrakciós módszerek, illetve kifinomult analitikai technikák segítségével tisztázható. Ez idáig kovalens, ionos és szorpciós kötéseket, valamint zárványokat azonosítottak ilyen módon. A kötött maradványok létrejötte általában szignifikánsan csökkenti a biológiai elérhetőséget és biológiai hozzáférhetőséget (10) [az IUPAC 1984-ben módosította (11)].

▼B

„Aerob átalakulás”: (oxidáló): molekuláris oxigén jelenlétében végbemenő reakciók (12).

„Anaerob átalakulás”: (redukáló): molekuláris oxigén kizárásával végbemenő reakciók (12).

„Természetes vizek”: tavakból, folyókból, patakokból stb. származó felszíni vizek.

„Üledék”: ásványi és szerves kémiai komponensek keveréke, amelyek közül az utóbbiak magas szén- és nitrogéntartalmú és nagy molekulasúlyú vegyületek. A természetes vizekből ülepednek ki és azzal határfelületet képeznek.

„Mineralizáció”: a szerves vegyületek teljes mértékű lebomlása aerob körülmények között CO_2-dá és H_2O-zé, illetve anaerob körülmények között CH_4-ná, CO_2-dá és H_2O-zé. E vizsgálati módszer vonatkozásában radioaktívan jelölt vegyületek alkalmazásakor a mineralizáció egy molekula nagyfokú lebomlását jelenti, amelynek során egy jelölt szénatom kvantitatívan oxidálódik vagy redukálódik, és az ennek megfelelő mennyiségű $^{14}CO_2$, illetve $^{14}CH_4$ szabadul fel.

„Felezési idő”: $t_{0,5}$, a vizsgálandó anyag 50 %-ának átalakulásához szükséges idő, ha az átalakulás elsőrendű kinetikával írható le; a felezési idő független a kiindulási koncentrációtól.

„DT_{50} (lebomlási idő **50)”**: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 50 %-kal csökken.

„DT_{75} (lebomlási idő **75)”**: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 75 %-kal csökken.

„DT_{90} (lebomlási idő **90)”**: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 90 %-kal csökken.

1.3. REFERENCIAANYAGOK

Az átalakulási termékek spektroszkópiás és kromatográfiás módszerekkel történő azonosításához és/vagy mennyiségi méréséhez referenciaanyagokat kell alkalmazni.

1.4. A VIZSGÁLANDÓ ANYAGGAL KAPCSOLATOS INFORMÁCIÓK

Az átalakulás sebességének mérésére nem jelölt vagy izotóppal jelölt vizsgálandó anyagot is alkalmazhatunk, bár előnyben kell részesíteni a jelölt anyagokat. Jelölt anyagra olyankor van szükség, ha az átalakulási útvonalakat kívánjuk tanulmányozni vagy anyagmérleget akarunk felvenni. A ^{14}C jelölés az ajánlott, de más izotópok, így például ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H vagy ^{32}P is alkalmazható. A jelölést lehetőleg a molekula legstabilabb részén vagy részein kell elhelyezni ([1]). A vizsgálandó anyag kémiai és/vagy radiokémiai tisztaságának legalább 95 %-nak kell lennie.

A vizsgálat elvégzése előtt az alábbi információkkal kell rendelkezni a vizsgálandó anyagról:

a) oldhatóság vízben (A.6. módszer);

b) oldhatóság szerves oldószerekben;

c) gőznyomás (A.4. módszer) és Henry-állandó;

([1]) Ha például a vizsgálandó anyag egy gyűrűt tartalmaz, akkor ezt a gyűrűt kell megjelölni. Ha a vizsgálandó anyag két vagy több gyűrűt is tartalmaz, esetleg külön vizsgálatot kell végezni az egyes jelölt gyűrűk sorsának megismeréséhez, illetve az átalakulási termékek keletkezésével kapcsolatos információk összegyűjtéséhez.

▼B

d) n-oktanol/víz megoszlási hányados (A8. módszer);

e) adszorpciós koefficiens (adott esetben K_d, K_f vagy K_{oc}) (C.18. módszer);

f) hidrolízis (C7. módszer);

g) disszociációs állandó (pK_a) [112. számú OECD Útmutató] (13);

h) vizsgálandó anyag kémiai szerkezete és adott esetben az izotóp-jelölés(ek) elhelyezkedése.

Megjegyzés: A jelentésben azt is fel kell tüntetni, hogy a méréseket milyen hőmérsékleten végeztük.

További hasznos információk lehetnek a vizsgálandó anyag mikro-organizmusokra gyakorolt toxicitásával kapcsolatos információk, a gyors és/vagy inherens biológiai lebonthatósággal kapcsolatos adatok, valamint a talajbeli aerob és anaerob átalakulással összefüggő adatok.

Rendelkezésre kell hogy álljanak a vizsgálandó anyagoknak és átalakulási termékeiknek vízben és üledékben történő mennyiségi és minőségi meghatározására szolgáló analitikai módszerek (ezen belül az extrakciós és edényzettisztítási módszerek) (lásd az 1.7.2. szakaszt).

1.5. A VIZSGÁLATI MÓDSZER ELVE

Az itt ismertetett módszer egy aerob és egy anaerob vízi üledékrendszert (lásd az 1. függeléket) alkalmaz, amely lehetővé teszi, hogy:

(i) mérjük a vizsgálandó anyag átalakulásának sebességét a víz-üledék rendszerben;

(ii) mérjük a vizsgálandó anyag átalakulásának sebességét az üledékben;

(iii) mérjük a vizsgálandó anyag és/vagy átalakulási termékei mineralizációjának sebességét (ha ^{14}C-jelölt vizsgálandó anyagot alkalmazunk);

(iv) azonosítsuk és mennyiségileg is meghatározzuk az átalakulási termékeket a víz- és az üledékfázisban, és ezen belül anyagmérleget is készítsünk (ha jelölt vizsgálandó anyagot alkalmazunk);

(v) sötétben (például az algavirágzást elkerülendő) és állandó hőmérsékleten történő inkubálással mérjük a vizsgálandó anyag és átalakulási termékei megoszlását a két fázis között. Ha az adatok indokolják, meg kell határozni a felezési időt, valamint a DT_{50}-, DT_{75}- és DT_{90}-értékeket is, de a kísérleti időszakot jóval meghaladó időtartamokra nem szabad extrapolálni (lásd az 1.2. szakaszt).

Legalább két-két üledékre és a hozzájuk kapcsolódó vizekre van szükség az aerob, illetve az anaerob vizsgálatokhoz (7). Lehetnek azonban olyan esetek is, amikor több mint kétféle vízi üledéket kell használni, így például olyan vegyi anyag esetében, amely édesvizekben és/vagy tengeri környezetben is megjelenhet.

▼B

1.6. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

A módszer bármilyen kémiai anyaghoz alkalmazható (legyen az nem jelölt vagy jelölt anyag), amelyhez létezik kielégítően pontos és érzékeny analitikai módszer. Enyhén illékony, nem illékony, vízben oldható és vízben kevéssé oldható vegyületekre is alkalmazható. A vizsgálat nem alkalmazható olyan vegyületekre, amelyek a vízben nagymértékben illékonyak (pl. gázalakú növényvédő szerek, szerves oldószerek), és ezért nem lehet őket a vizsgálat kísérleti körülményei között a vízben és/vagy az üledékben tartani.

A módszerrel az eddigiekben vegyi anyagok édesvizekben és üledékeikben történő átalakulását vizsgálták, de elvben torkolati/tengeri rendszerekhez is alkalmazható. Nem alkalmas azonban folyóvízi vagy nyílttengeri körülmények szimulálására.

1.7. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNYEK

1.7.1. **Kinyerési fok**

A vizsgálandó anyag hozzáadása után azonnal legalább két párhuzamos víz- vagy üledékminta extraktumát elemezve kaphatjuk az analitikai módszer ismételhetőségével és a vizsgálandó anyag alkalmazására szolgáló eljárás egységességével kapcsolatos első információkat. A kísérletek későbbi szakaszában a kinyerési fokokat a vonatkozó anyagmérlegek adják (ha jelölt anyagot alkalmazunk). Jelölt vegyi anyagok esetén 90 % és 110 % közé (6), nem jelölt vegyi anyagok esetén pedig 70 % és 110 % közé kell esnie a kinyerési foknak.

1.7.2. **Az analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgálandó anyag és átalakulási termékei mennyiségi meghatározására használt analitikai módszer ismételhetőségét az átalakulási termékek megjelenéséhez elegendő ideig végzett inkubálás után a vízből vagy üledékből egy extrahálással nyert kivonat két párhuzamos mérésével ellenőrizhetjük (a kezdeti extrakciós hatásfok kivételével).

Az adott vizsgálandó anyagra és átalakulási termékeire az analitikai módszer kimutatási határának (limit of detection, LOD) vízben vagy üledékben legalább 0,01 $mg.kg^{-1}$-nak (mint vizsgálandó anyag), vagy – ha az a kisebb – egy vizsgálati rendszerben alkalmazott kiindulási mennyiség 1 %-ának kell lennie. Meg kell állapítani emellett a mennyiségi meghatározás határát (limit of qualification, LOQ) is.

1.7.3. **Az átalakulási adatok pontossága**

Ha a vizsgálandó anyag koncentrációjának időfüggvényét regressziós analízisnek vetjük alá, akkor megfelelő információkat kaphatunk az átalakulási görbe pontosságáról, és lehetővé válik a konfidenciahatárok kiszámítása a felezési időkhöz (pszeudo-elsőrendű kinetika esetén) vagy a DT_{50}-értékekhez, illetve adott esetben a DT_{75}- és DT_{90}-értékekhez is.

1.8. A MÓDSZER ISMERTETÉSE

1.8.1. **Vizsgálati rendszer és készülék**

A vizsgálatot üvegedényekben (pl. palackokban és centrifugacsövekben) kell végezni, kivéve ha az előzetes információk (így például az n-oktanol/víz megoszlási hányados, a szorpciós adatok stb.) szerint a vizsgálandó anyag megtapadhat az üvegfelületen, ilyenkor esetleg fontolóra kell venni más szerkezeti anyag (így például teflon) alkalmazását. Az alábbi módszerek alkalmazásával enyhíthetjük a problémát, ha ismert, hogy a vizsgálandó anyag megtapad az üvegfelületen:

▼B

— meghatározzuk az üvegfelülethez kötődő vizsgálandó anyag és átalakulási termékek tömegét,

— a vizsgálat végén minden üvegedényt oldószerrel mosunk,

— formulázott terméket alkalmazunk (lásd még az 1.9.2. szakaszt),

— a vizsgálandó anyagot nagyobb mennyiségű társoldószerrel együtt vezetjük be a vizsgálati rendszerbe; csak olyan társoldószert szabad használni, amely nem oldja a vizsgálandó anyagot.

A tipikus vizsgálati készülékekre, azaz a gázátfolyásos és a biométer-típusú rendszerre a 2., illetve 3. függelékben láthatunk példákat (14). További alkalmazható inkubáló rendszereket ismertet a (15) hivatkozás. A kísérleti berendezést úgy kell kialakítani, hogy lehetővé tegye a lég- vagy nitrogéncserét és az illékony termékek befogását. A berendezés méreteit pedig úgy kell megválasztani, hogy teljesüljenek a vizsgálatra vonatkozó követelmények (lásd az 1.9.1 szakaszt). A ventillációt vagy óvatos buborékoltatással, vagy a vízfelszín feletti levegő- vagy nitrogénbefújással kell biztosítani. Ez utóbbi esetben ajánlatos lehet a vizet felülről óvatosan kevertetni, hogy az oxigén vagy a nitrogén egyenletesebben oszoljon szét a vízben. Nem szabad CO_2-mentes levegőt használni, mivel az a víz pH-jának növekedését eredményezheti. Az üledék perturbációja egyik esetben sem kívánatos, és lehetőség szerint minél inkább kerülni kell. Az enyhén illékony vegyi anyagokat biométer-típusú rendszerben kell vizsgálni a vízfelszín óvatos kevertetése mellett. Alkalmazható továbbá légköri levegős vagy nitrogénes gáztérrel rendelkező zárt rendszer is, amely az illékony termékek elnyeletésére belső fiolákat tartalmaz (16). Aerob vizsgálatok esetében rendszeresen cserélni kell a gáztérben lévő levegőt, hogy kompenzálni lehessen a biomassza oxigénfogyasztását.

Az illékony átalakulási termékek gyűjtésére alkalmas elnyelető folyadékok többek között a következők: a szén-dioxidhoz 1 $mol.dm^{-3}$ koncentrációjú kálium-hidroxid- vagy nátrium-hidroxid-oldat ([1]), szerves vegyületekhez pedig az etilén-glikol, az etanol-amin vagy 2 %-os xilolos paraffinoldat. Az anaerob körülmények között képződő illékony vegyületek, mint a metán, például molekulaszitákkal köthetők meg. További lehetőség, hogy az ilyen illékony vegyületeket CuO-dal töltött kvarccsövön átvezetve 900 °C hőmérsékleten CO_2-dá oxidáljuk, és a képződött CO_2-ot lúgos abszorberben fogjuk fel (17).

A vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek elemzéséhez különféle laboratóriumi műszerek szükségesek (pl. gáz-folyadék kromatográf [GLC], nagy teljesítményű folyadékkromatográf [HPLC], vékonyréteg-kromatográf [TLC] tömegspektrométer [MS], gázkromatográf/tömegspektrométer [GC-MS], folyadékkromatográf/-tömegspektrométer [LC-MS], magmágneses rezonancia berendezés [NMR] stb.), a radioaktívan jelölt vagy nem jelölt anyagokhoz alkalmas detektorrendszerrel. Ha radioaktívan jelölt anyagot alkalmazunk, akkor folyadékszcintillációs számlálóra és oxidáló égetőkamrára is szükség van (az üledékmintáknak a radioaktivitás-mérés előtti elégetéséhez).

A fizikai, kémiai és biológiai mérésekhez (lásd az 1.8.2.2. szakasz 1. táblázatát) további szokványos laboratóriumi eszközök, illetve esetenként további üvegeszközök, vegyszerek és reagensek is szükségesek.

([1]) Mivel az ilyen lúgos elnyelető oldatok a szellőztetőlevegőben lévő, illetve az aerob kísérletekben a légzés nyomán képződő szén-dioxidot is megkötik, rendszeres időközönként cserélni kell őket, hogy meg lehessen előzni a telítődésüket és abszorpciós kapacitásuk ezzel járó csökkenését.

▼B

1.8.2. **A vízi üledékminták kiválasztása és száma**

A mintavételi helyeket minden esetben a vizsgálat céljával összhangban kell kiválasztani. A mintavételi helyek kiválasztásakor figyelembe kell venni a korábbi mezőgazdasági, ipari vagy háztartási tevékenységek vízgyűjtőre és a felvizekre gyakorolt hatását is. Nem szabad olyan üledékeket alkalmazni, amelyek az előző 4 évben a vizsgálandó anyaggal vagy szerkezeti analógjaival szennyeződtek.

1.8.2.1. *Az üledék kiválasztása*

Az aerob vizsgálatokhoz általában kétféle üledéket kell alkalmazni (7), amelyeknek szerves széntartalom és szerkezet szempontjából el kell térniük egymástól. Az egyik üledéknek legyen magas (2,5–7,5 %) szervesszén-tartalma, és legyen finomszerkezetű, a másiknak pedig legyen alacsony (0,5–2,5 %) a szervesszén-tartalma, és legyen durvaszerkezetű. A szervesszén-tartalom különbségének általában legalább 2 %-nak kell lennie. A „finomszerkezet” > 50 % [agyag + iszap] ([1]) -tartalmat, a „durvaszerkezet” pedig < 50 % [agyag + iszap]-tartalmat jelent. A két üledék [agyag + iszap]-tartalma különbségének általában legalább 20 % kell lennie. Olyan esetekben, amikor a vegyi anyag sós vizekbe is eljuthat, legalább az egyik mintaként tengeri eredetű víz-üledék rendszert kell használni.

A szigorúan anaerob vizsgálatban a két üledéket (és kapcsolódó vizeiket) a felszíni víztestek anaerob zónáiból kell venni (7). Mind az üledék-, mind pedig a vízfázist óvatosan és az oxigén kizárása mellett kell kezelni és szállítani.

Az üledékek kiválasztásakor más paraméterek is fontosak lehetnek, amelyeket minden esetben egyedileg kell fontolóra venni. Például az üledékek pH-tartománya is fontos lehet az olyan vegyi anyagok vizsgálata szempontjából, amelyeknek átalakulása és/vagy szorpciója pH-függő. A szorpció pH-függését jellemezheti a vizsgálandó anyag pK_a-értéke is.

1.8.2.2. *A víz-üledék minták jellemzése*

A táblázat összefoglalja a víz és az üledék legfontosabb mérendő és (az alkalmazott módszerre való hivatkozással együtt) rögzítendő paramétereit, valamint azt, hogy ezeket a paramétereket a vizsgálatok melyik fázisában kell meghatározni. Tájékoztatásul: alkalmas elemzési módszerek találhatók a (18), a (19), a (20) és a (21) hivatkozásban.

Esetenként még további paramétereket is mérni és jelenteni kell (pl. édesvizek esetében: lebegőanyag, lúgosság, vízkeménység, vezetőképesség, NO_3/PO_4 [arány és egyedi értékek]; az üledékek esetében: kationcserélő kapacitás, víztartó képesség, karbonáttartalom, összes nitrogén és foszfor; valamint tengeri rendszerekben a sótartalom). Különösen az anaerob átalakulás szempontjából hasznos lehet még a redoxkörülmények értékeléséhez a víz és az üledék nitrát-, szulfát-, biológiailag hozzáférhető vas- és esetleges egyéb elektronakceptor-tartalmának meghatározása is.

([1]) Az [agyag + iszap] az üledék < 50 m részecskeméretű ásványi frakciója.

▼B

A víz-üledék minták jellemzésére szolgáló paraméterek mérése (7) (22) (23).

Paraméter	A vizsgálati eljárás szakaszai					
	minta-gyűjtés	mintake-zelés után	akklimati-záció kezdete	vizsgálat kezdete	vizsgálat közbülső szakaszai	vizsgálat vége
Víz						
Eredetforrás	X					
Hőmérséklet	x					
pH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
O_2-koncentráció*	X		X	X	X	X
Redoxpotenciál*			X	X	X	X
Üledék						
Eredetforrás	X					
A réteg mélysége	X					
pH		x	X	X	X	X
Szemcseméret-eloszlás		X				
TOC		X	X	X		X
Mikrobális biomassza (**)		X		X		X
Redoxpotenciál (*)	érzék-szervi (szín/ szag)		X	X	X	X

(*) A legfrissebb kutatási erednények igazolták, hogy a víz oxigénkoncentrációjának és redoxpotenciáljának mérése nem rendelkezik sem mechanisztikus, sem prediktív értékkel a felszíni vizek mikrobapopulációinak növekedése és fejlődése szempontjából (24) (25). Az aerob biológiai átalakulási sebességek és útvonalak értelmezését és értékelését jobban segíti a biológiai oxigénigény (BOI. a mintavételkor, illetve a vizsgálat kezdetén és végén), a mikro- és makrotápanyagok. a Ca, az Mg és az Mn (a vizsgálat kezdetén és végén) vízben, illetve az összes N és az összes P (a mintavételkor és a vizsgálat végén) üledékben történő meghatározása.

(**) Az aerob vizsgálatokhoz mikrobalégzési rátamódszer (26), gázzal történő fertőtlenítési módszer (27) vagy mikroszkópos számlálás (pl. baktériumok, sugárgombák, gombák és teljes kolóniák): az anaerob vizsgálatokhoz metánképződési sebesség.

1.8.3. **Mintavétel, kezelés és tárolás**

1.8.3.1. *Mintavétel*

Az üledékekből történő mintavételhez a fenéküledékek mintavételéről szóló ISO-útmutatótervezetet (8) kell használni. Az üledék teljes 5–10 cm-es felső rétegéből üledékmintákat kell venni. Az ehhez társított vizet ugyanarról a helyről kell venni, és ugyanabban az időben, mint az üledéket. Az anaerob vizsgálathoz az üledék és víz mintavételét, valamint szállítását oxigén kizárása mellett kell végezni (28) (lásd az 1.8.2.1. szakaszt). Egyes mintavevő eszközöket a (8) és a (23) hivatkozás ismertet.

▼B

1.8.3.2. *Kezelés*

Az üledéket 2 mm-es szitán végzett nedves szűréssel választjuk el a víztől, nagy feleslegben alkalmazva azonos helyről származó, helyileg elvezetett vizet. Ezt követően inkubáló lombikban ismert mennyiségű üledéket és vizet a kívánt arányban egymáshoz keverünk (lásd az 1.9.1. szakaszt), és előkészítjük az akklimatizálódási periódusra (lásd az 1.8.4. szakaszt). Az anaerob vizsgálathoz a kezelés minden lépését oxigén kizárása mellett kell végezni (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Tárolás*

A frissen gyűjtött üledék és víz alkalmazása a legelőnyösebb, de ha tárolás szükséges, akkor az üledéket és a vizet a fentiek szerint le kell szűrni, majd sötétben, 4 ± 2 °C-on (13), vízzel elárasztva (6-10 cm-es vízréteg) kell együtt tárolni őket, legfeljebb négy hétig (7) (8) (23). Az aerob vizsgálatokhoz alkalmazott mintákat szabad levegőbeáramlás mellett kell tárolni (pl. nyitott edényekben), az anaerob vizsgálatok esetében viszont oxigén kizárásával. Vigyázni kell arra, hogy a szállítás és tárolás során az üledék és a víz ne fagyjon ki, illetve az üledék ne száradjon ki.

1.8.4. **Az üledék/víz minták előkészítése a vizsgálathoz**

A vizsgálandó anyag hozzáadása előtt akklimatizációs időszakot kell hagyni, amelyhez minden üledék/víz mintát a fő vizsgálathoz használt inkubáló edénybe kell tenni, és az akklimatizáció idején pontosan ugyanazokat a körülményeket kell fenntartani, mint a fő vizsgálatban (lásd az 1.9.1. szakaszt). Az akklimatizációs időszak ahhoz szükséges, hogy a rendszer a pH, a víz oxigénkoncentrációja, az üledék és a víz redoxpotenciálja és a fázisok makroszkopikus elkülönülése tekintetében viszonylag stabillá váljon. Az akklimatizáció időtartama általában egy-két hét, de semmiképpen sem haladhatja meg a négy hetet. Az ebben a szakaszban végzett mérések eredményeit is fel kell tüntetni a jelentésben.

1.9. A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

1.9.1. **Kísérleti körülmények**

A vizsgálatot az inkubálóberendezésben kell végezni (lásd az 1.8.1. szakaszt) úgy, hogy a víz és az üledék térfogatának aránya 3:1 és 4:1 között legyen, az üledék vastagsága pedig 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Javasolt az egyes inkubáló edényekbe minimum 50 g üledéket (szárazsúly) tenni.

A vizsgálatot sötétben, 10 °C és 30 °C közötti állandó hőmérsékleten kell végezni. A legmegfelelőbb a (20 ± 2) °C. Egyes esetekben, a vizsgálattól várt információk függvényében fontolóra lehet venni, hogy a méréseket más, alacsonyabb hőmérsékleten (pl. 10 °C-on) is elvégezzék. Az inkubálási hőmérsékletet folyamatosan ellenőrizni kell, és a jelentésben is fel kell tüntetni.

([1]) A legutóbbi kutatások szerint a 4 °C-on való tárolás az üledék szervesszén-tartalmának csökkenését okozhatja, ami esetleg a mikrobiális aktivitás csökkenéséhet vezethet (34).

▼B

1.9.2. **A vizsgálandó anyag kezelése és alkalmazása**

A vizsgálathoz egyféle koncentrációban kell használni a vegyi anyagot ([1]). A közvetlenül a vizekbe jutott növényvédő szerek esetében a címkén lévő maximális adagolást kell a vizsgálati edényben lévő víz felszíne alapján kiszámolt maximális alkalmazási rátának venni. Minden más esetben a környezeti kibocsátásokon alapuló előrejelzések alapján kell kiválasztani az alkalmazandó koncentrációt. Ügyelni kell arra, hogy a vizsgálandó anyagot olyan koncentrációban alkalmazzuk, amely lehetővé teszi az átalakulási útvonal jellemzését, valamint az átalakulási termékek képződésének és fogyásának mérését. Olyan esetekben, amikor a vizsgálandó anyag koncentrációja a vizsgálat kezdetén közel van a kimutatási határhoz és/vagy a vizsgálandó anyag alkalmazási rátájának 10 %-át kitevő mennyiségben jelen lévő fő átalakulási termékeket nem lehet könnyen kimutatni, akkor magasabb (pl. tízszeres) dózisok alkalmazására lehet szükség. Ha azonban magasabb tesztkoncentrációkat alkalmazunk, ellenőrizni kell, hogy nem gyakorolnak-e jelentős káros hatásokat a víz-üledék rendszer mikrobális aktivitására. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag állandó koncentrációban legyen jelen a különféle méretű edényekben, indokoltnak tűnhet az alkalmazott anyagmennyiség megfelelő beállítása az alapján, hogy hogyan aránylik egymáshoz az edénybeli és a terepi vízoszlopmélység (amely utóbbit 100 cm-nek feltételezzük, de ettől eltérő mélységek is alkalmazhatók). Ilyen számításra lásd a 4. függelékben található példa.

A vizsgálandó anyagot ideálisan vizes oldat formájában kell a vizsgálati rendszer vízfázisába juttatni. Ha elkerülhetetlen, akkor a vizsgálandó anyag bejuttatására és eloszlatására a vizsgálati rendszerben kis mennyiségben felhasználhatunk vízzel elegyedő oldószereket is (például acetont, etanolt), de az oldószerek mennyisége nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot, és nem lehetnek káros hatásaik a vizsgálati rendszer mikrobális aktivitására. A vizsgálandó anyag vizes oldatának előállításakor is gondosan kell eljárni, és a teljes homogenitás érdekében oldatkészítő oszlopot vagy előkeverést is lehet alkalmazni. Érdemes a vizes fázist óvatosan megkeverni, miután a vizes oldatot a rendszerbe juttattuk, vigyázva arra, hogy az üledéket a lehető legkevésbé keverjük fel.

Formulázott termékek alkalmazása általában nem ajánlott, mivel a készítmény összetevői befolyásolhatják a vizsgálandó anyag és/vagy az átalakulási termékek megoszlását a víz- és az üledékfázis között. A vízben rosszul oldódó vizsgálandó anyagok esetében azonban megfelelő alternatíva lehet a formulázott anyag alkalmazása.

Az inkubáló edények száma a mintavétel gyakoriságától függ (lásd az 1.9.3. szakaszt). Megfelelő számú vizsgálati rendszert kell alkalmazni ahhoz, hogy minden mintavételhez két-két rendszert tudjunk felhasználni. Ha minden egyes vízi üledékrendszerhez van kontrollegység, ezeket nem szabad a vizsgálandó anyaggal kezelni. A kontrollegységeket arra használhatjuk, hogy a vizsgálat végén meghatározzuk az üledék mikrobás biomasszáját, illetve a víz és az üledék teljes szervesszén-tartalmát. A kontrollegységek közül kettőt (mindkét víziüledék-mintához egyet-egyet) arra használhatunk fel, hogy az akklimatizációs időszakban nyomon kövessük az üledékben és a vízben a megfelelő paramétereket (lásd az 1.8.2.2. szakasz táblázatát). Ha a vizsgálandó anyagot oldószerrel juttatjuk be a rendszerbe, akkor még további két kontrollegységre van szükség, hogy mérni tudjuk az oldószernek a vizsgálati rendszer mikrobális aktivitására gyakorolt káros hatásait is.

([1]) Ha az alacsonyabb koncentrációkat kellő pontossággal lehet mérni, hasznos lehet a vizsgálat elvégzése egy másik koncentrációértékkel is az olyan vegyi anyagok esetén, amelyek többféle útvonalon is bejuthatnak a felszíni vizekbe, ezért szignifikánsan eltérő koncentrációban jelenhetnek meg.

▼B

1.9.3. **A vizsgálat időtartama és a mintavétel**

A kísérlet időtartama általában nem lehet több 100 napnál (6). Akkor fejezhető be, amikor elegendő eredmény van a bomlási útvonal és a víz/üledék megoszlás lefutásának megállapítására, vagy amikor a vizsgálandó anyag 90 %-a az átalakulás és/vagy az elpárolgás miatt elfogy a rendszerből. A vizsgálat kezdetét is beleszámítva legalább hat alkalommal kell mintákat venni, ez kiegészíthető a megfelelő mintavételi rend és vizsgálati időtartam meghatározására szolgáló, opcionális előzetes vizsgálattal (lásd az 1.9.4. szakaszt), ha korábbi vizsgálatok alapján nem áll rendelkezésre elegendő adat a vizsgálandó anyagról. Hidrofób anyagok esetében a vizsgálat kezdeti szakaszában esetleg további mintavételi időpontok beiktatására is szükség lehet a víz- és üledékfázis közötti megoszlási hányados meghatározásához.

A megfelelő mintavételi időpontokban komplett inkubálóedényeket veszünk ki a vizsgálatokhoz (mindig kettőt a párhuzamos mérésekhez). Az üledéket és felette lévő vizet külön-külön analizáljuk ([1]). A felszíni vizet óvatosan kell eltávolítani, vigyázva arra, hogy eközben ne keverjük fel az üledéket. A vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek kivonását és jellemzését megfelelő analitikai eljárásokkal kell elvégezni. Gondoskodni kell arról, hogy eltávolítsuk az esetlegesen az inkubáló edény falán vagy az illékony anyagok befogására használt elnyeletők összekötő vezetékein megtapadt anyagokat is.

1.9.4. **Opcionális előzetes vizsgálat**

Ha a vizsgálat időtartamát és a mintavételi rendet nem lehet meghatározni a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos más vizsgálatok eredményei alapján, célszerű lehet opcionális előzetes vizsgálatot végezni a végleges vizsgálathoz javasolttal egyező körülmények között. A jelentésben a megfelelő kísérleti körülményeket és az előzetes vizsgálatok eredményeit is össze kell foglalni.

1.9.5. **Mérések és elemzések**

Minden egyes mintavételi időpontban meg kell határozni, és fel kell jegyezni a vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek koncentrációját mind a vízben, mind az üledékben (abszolút koncentráció és az alkalmazott mennyiséghez viszonyított százalékos arány). Általában minden olyan átalakulási terméket azonosítani kell, amely bármelyik mintavételi időpontban a teljes víz-üledék rendszerben alkalmazott radioaktivitás > 10 %-át reprezentáló mennyiségben detektálható, kivéve, ha ennek elhagyása megfelelően megindokolható. Meg kell fontolni a fenti küszöbérték alatt maradó, de vizsgálat során folyamatosan növekvő mennyiségű átalakulási termékek azonosítását is, mert ezeknél tartós fennmaradásra utalhatnak az eredmények. Az esetleges perzisztencát mindig egyedileg kell értékelni és a jelentésben megfelelően indokolni.

A gáz/illékony komponens elnyelető rendszerben mért eredményeket (CO_2 és egyéb anyagok, pl. illékony szerves vegyületek) is minden mintavételi időpontra fel kell tüntetni a jelentésben. Szerepeltetni kell a mineralizációs rátákat. Meg kell adni az üledékben lévő nem extrahálható (kötött) maradványokat is minden mintavételi pontra.

([1]) Azokban az esetekben, ha az anaerob átalakulási termékek könnyen és gyorsan újraoxidálódhatnak, az anaerob körülményeket a mintavétel időtartama alatt is fenn kell tartani.

▼B

2. **ADATOK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

Mindegyik mintavételre ki kell számítani a hozzáadott radioaktivitás teljes mérlegét vagy kinyerési fokát (lásd az 1.7.1. szakaszt). Az eredményeket a hozzáadott radioaktivitás százalékában kell kifejezni. A radioaktivitásnak a víz és az üledék közötti megoszlását koncentrációértékként és százalékos arányként is meg kell adni minden mintavételi időpontban.

Ki kell számolni a vizsgálandó anyag felezési idejét, DT_{50}-értékét, valamint adott esetben DT_{75}- és DT_{90}-értékét is a konfidenciahatárokkal együtt (lásd az 1.7.3. szakaszt). Információt lehet kapni a vizsgálandó anyag vízre és üledékre vonatkoztatott kiürülési sebességéről is a megfelelő kiértékelő módszerek segítségével. Ilyen módszerek például a pszeudo-elsőrendű kinetikák alkalmazása, a grafikus vagy numerikus megoldásokat alkalmazó empirikus görbeillesztési technikák, illetve a még komplexebb eljárások, amelyek például egy- vagy több-kompartmentumos modelleket alkalmaznak. Ezzel kapcsolatos további részletek a szakirodalomban találhatók (35) (36) (37).

Minden megközelítésnek megvannak a maga előnyei és hátrányai és komplexitásuk tekintetében is igen sokfélék lehetnek. Az elsőrendű kinetika feltételezése a bomlási és megoszlási folyamatok túlzott leegyszerűsítését jelentheti, de amikor lehetséges, könnyen érthető és mind a szimulációs modellek, mind a becsült környezeti koncentrációk számítása szempontjából értékes eredményt (sebességi állandó vagy felezési idő) szolgáltat. Az empirikus módszerek vagy a lineáris transzformációk jobb görbeillesztést eredményezhetnek, így pontosabban lehet becsülni a felezési időket, a DT_{50}-értékeket, valamint adott esetben a DT_{75}- és a DT_{90}-értékeket is. A kapott állandók alkalmazhatósága azonban korlátozott. A kompartmentumos (környezeti elemeket alkalmazó) modellekkel egy sor hasznos állandót kaphatunk, amelyek a kockázatfelmérések szempontjából értékesek, mivel leírják a vegyi anyag különböző környezeti elemekben végbemenő degradációját és megoszlási arányait is, továbbá felhasználhatók a fő átalakulási termékek képződéséhez és lebomlásához tartozó sebességi állandók becslésére is. A módszer kiválasztását minden esetben megfelelően indokolni kell, és a kísérletezőnek grafikusan és/vagy statisztikailag igazolnia kell az illesztés jóságát.

3. **JELENTÉS**

3.1. VIZSGÁLATI JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

— hétköznapi név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet (radioaktívan jelölt anyagok alkalmazása esetén a jelölés(ek) elhelyezkedése) és a lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt),

— a vizsgálandó anyag tisztasága (szennyezései),

— a jelölt vegyi anyagok radiokémiai tisztasága és moláris aktivitása (adott esetben).

▼B

Referenciaanyagok:

— az átalakulási termék jellemzésére és/vagy azonosítására alkalmazott referenciaanyagok kémiai elnevezése és szerkezete.

A vizsgálathoz használt üledékek és vizek:

— a vízi üledékminták vételének mintavételi helye(i) és ez(ek) ismertetése, ezen belül lehetőleg a korábbi szennyezések története,

— a víz-üledék rendszerek gyűjtésével, esetleges tárolásával és akklimatizációjával kapcsolatos összes információ,

— a víz-üledék minták tulajdonságai, az 1.8.2.2. szakasz táblázatában foglaltak szerint.

Kísérleti körülmények:

— az alkalmazott vizsgálati rendszerek (pl. átfolyásos, biométer, a szellőzés módja, a keverési módszer, a víz térfogata, a víz- és az üledékréteg vastagsága, a tesztedény méretei stb.),

— a vizsgálandó anyag bejuttatása a vizsgálati rendszerbe: a vizsgálatban alkalmazott koncentrációk, a párhuzamos és kontrollmérések száma, a vizsgálandó anyag alkalmazásának módja (pl. oldószer használata) stb.,

— inkubálási hőmérséklet,

— a mintavételek időpontjai,

— extrakciós módszerek és hatékonyságuk, valamint az analitikai módszerek és kimutatási határok,

— az átalakulási termékek jellemzésére/azonosítására alkalmazott módszerek,

— a kísérleti protokolltól vagy vizsgálati feltételektől való eltérések a vizsgálat folyamán.

Eredmények:

— reprezentatív elemzések nyers adatai (minden nyers adatot a GLP-archívumban kell tárolni),

— az alkalmazott analitikai módszerek ismételhetősége és érzékenysége,

— kinyerési fokok (az érvényes vizsgálat százalékértékeit az 1.7.1. szakasz adja meg),

— az alkalmazott kiindulási dózis százalékában és $mg.kg^{-1}$ egységekben kifejezett, az üledékre, vízre és teljes rendszerre vonatkoztatott (utóbbira csak százalékos) eredmények táblázatos összefoglalása a vizsgálandó anyagra, valamint adott esetben az átalakulási termékekre és a nem extrahálható radioaktivitásra is,

— anyagmérleg a vizsgálatok közben és végén,

— a vízfrakcióban, az üledékfrakcióban és a teljes rendszerben végbemenő átalakulás (ezen belül mineralizáció) grafikus megjelenítése,

— mineralizációs sebességek,

▼B

— felezési idő, DT_{50} (esetenként DT_{75} és DT_{90} is) a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire az üledékben, vízben és a teljes rendszerben, a konfidenciahatárok feltüntetésével,

— a vizsgálandó anyag és adott esetben fő átalakulási termékeinek átalakulási kinetikájának becslése,

— adott esetben az átalakítás feltételezett útvonalai,

— az eredmények diszkussziója.

4. **SZAKIRODALOM**

(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 (1982). 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. SET AC-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 304A: 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 14C-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 (17th 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 31, 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 14C-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

1. függelék

ÚTMUTATÓ AZ AEROB ÉS ANAEROB VIZSGÁLATI RENDSZEREKHEZ

Aerob vizsgálati rendszer

Az ebben a módszerben ismertetett aerob vizsgálati rendszer egy aerob vízrétegből (a tipikus oxigénkoncentráció 7 és 10 $mg.l^{-1}$ közötti) és egy üledékrétegből áll, amelynek felszíni része aerob, felszín alatti része pedig anaerob (az üledék anaerob zónájában a tipikus átlagos redoxpotenciál) 80 és –190 mV között változik). A víz felszíne felett nedvesített levegőt vezetnek át minden inkubációs egységen, hogy kellő oxigénszintet tartsanak a gáztétben.

Anaerob vizsgálati rendszer

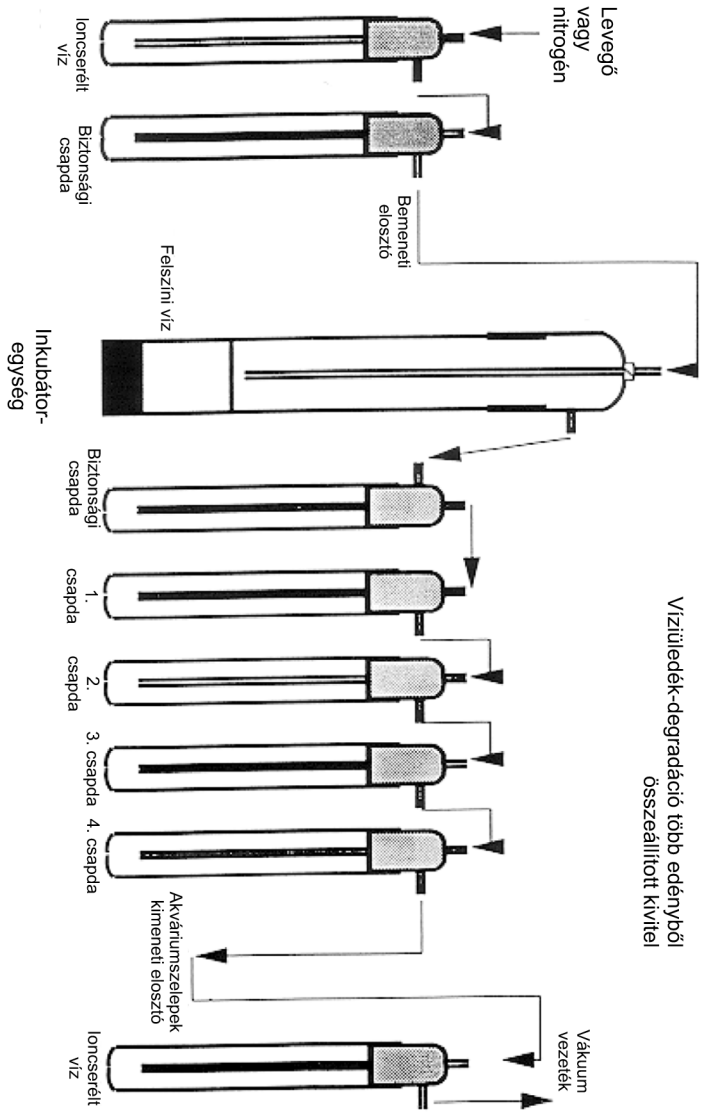
Az anaerob vizsgálati rendszernél a vizsgálati eljárás lényegében megegyezik az anaerob rendszernél vázolttal, azzal a különbséggel, hogy itt minden inkubációs egységen nedvesített nitrogént vezetnek át a víz felszíne felett, hogy nitro géngázteret tartsanak fenn. Ha a redoxpotenciál (E_h) - 100 mV-nál alacsonyabb, akkor az üledék és a víz is anaerobnak tekinthető.

Az anaerob vizsgálatban, a mineralizació vizsgálata magában foglalja a képződött szén-dioxid és metán mérését is.

▼B

2. függelék

PÉLDA EGY GÁZÁTVEZETÉSES KÉSZÜLÉKRE

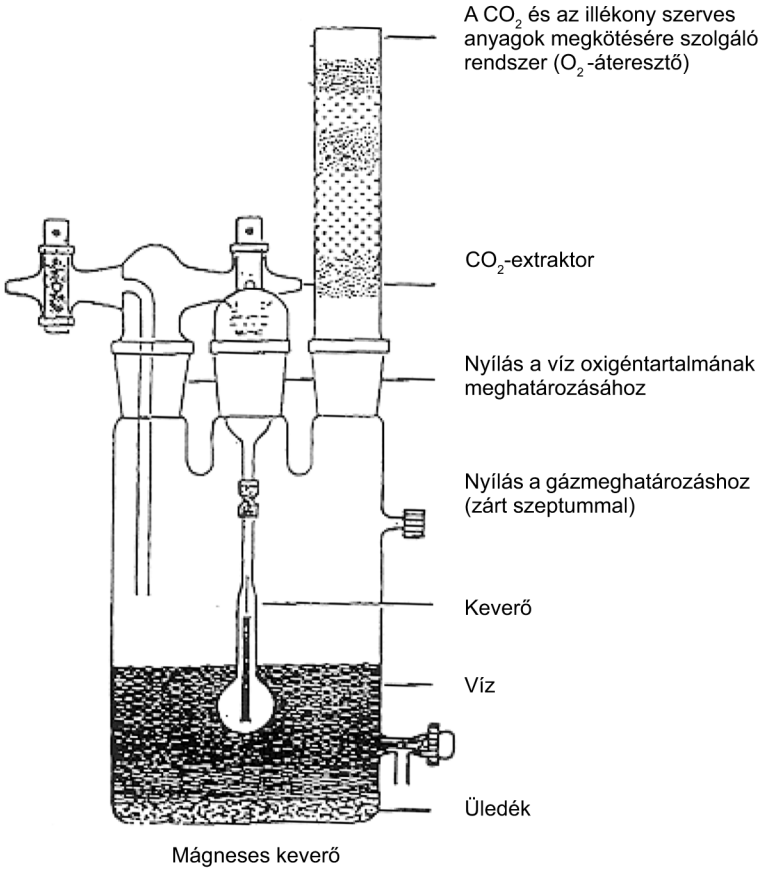


Biztonsági csapda, üres
1. csapda:
etilén-glikol az illékony szerves anyagok megkötésére
2. csapda:
0,1 M kénsav a lúgos illékony anyagok megkötésére
3. és 4. csapda
2 M nátrium-hidroxid a CO_2 és más savas illékony anyagok megkötésére

▼B

3. függelék

PÉLDA EGY BIOMÉTER-KÉSZÜLÉKRE



▼B

4. függelék

MINTASZÁMÍTÁS A TESZTEDÉNYBEN ALKALMAZANDÓ DÓZISHOZ

A henger belső átmérője:	= 8 cm
Vízoszlopmélység az üledék nélkül:	= 12 cm
Vízfelszín nagysága: 3,142 × 4^2	= 50,3 cm^2
Alkalmazási arány: 500 g vizsgálandó anyag/ha 5 µg/cm^2-nek felel meg	
Teljes µg: 5 × 50,3	= 251,5 µg
A mennyiség korrigálása a 100 cm-es mélységre:	
12 × 251,5 + 100	= 30,18 µg
A vízoszlop térfogata: 50,3 × 12	= 603 ml
Koncentráció a vízben: 30,18 × 603	= 0,050 µg/ml vagy 50 µg/l

▼M1

C.25. **AEROB MINERALIZÁCIÓ FELSZÍNI VIZEKBEN – VIZSGÁLAT A BIOLÓGIAI LEBONTÁS SZIMULÁLÁSÁRA**

1. **MÓDSZER**

Ez a módszer megegyezik az OECD TG 309 (2004) (1) jelű módszerrel.

1.1. BEVEZETÉS

A vizsgálat célja az aerob természetes vízben, kis koncentrációban jelenlévő vizsgálati anyag biológiai lebontása időtartamának meghatározása, és a megfigyelések reakciókinetikai kifejezések szerinti számszerűsítése. Maga a szimuláció egy laboratóriumi, rázó-lombikos egymenetes vizsgálat, amelynek a segítségével természetes felszíni vizek (édes-, brakk- vagy tengervíz) mintáiban jelen lévő szerves anyagok aerob biológiai lebontásának sebessége megadható. A módszer alapja az ISO/DIS 14592–1 (2), de magában hordozza a C.23 és a C.24 (3)(4) módszerek egyes elemeit is. Lehetőség van arra, hogy hosszú vizsgálati idő esetén az egymenetes működtetést félfolyamatos működtetésre változtassuk a vizsgálati mikrokozmosz romlásának megelőzése céljából. A szimulációs vizsgálat alapvető célja a felszíni vízben jelen lévő vizsgálni kívánt anyag mineralizációjának meghatározása, ahol a mineralizáció a lebontás kinetikája kifejezésének az alapját képezi. Emellett azonban a vizsgálat másodlagos célja, hogy információt szolgáltasson az elsődleges lebontásról és a keletkező fő transzformációs termékekről. Ez utóbbiak azonosítása, és amennyiben lehetséges, koncentrációjuk számszerűsítése a nagyon lassan mineralizálódó anyagok (pl. ha a teljes maradvány ^{14}C izotóp felezési ideje meghaladja a 60 napot) esetében különösen fontos. Az analitikai megkötésekből következően a fő transzformációs termék azonosításához és mennyiségi meghatározásához a vizsgálati anyagot jellemzően magasabb koncentrációban (pl. > 100 μg/l) kell alkalmazni.

Ebben a vizsgálatban alacsony koncentráció alatt olyan koncentrációértéket értünk (pl. kisebb mint 1–100 μg/l), amely elég alacsony ahhoz, hogy biztosítsa azt, hogy a vizsgálatban kapott biológiai lebontási kinetika jól tükrözze a környezetben várható kinetikát. A vizsgálathoz használt természetes vízben található biológiailag lebontható szén szubsztrátok teljes mennyiségéhez képest a vizsgálati anyag csak kis koncentrációban van jelen, és csak másodlagos szubsztrátként fog szolgálni. Ez maga után vonja, hogy a várható biológiai lebontási kinetika elsőrendű (nem-növekedési kinetika), és hogy a vizsgálati anyag lebontása kometabolizmussal történhet. A kinetika elsőrendűségéből következik, hogy a lebontás sebessége (mg/l/nap) arányos a szubsztrát koncentrációjával, amelynek értéke az időben folyamatosan csökken. A valódi elsőrendű kinetikában a specifikus lebontási sebességi állandó, a k, független az időtől és a koncentrációtól. Vagyis k értéke nem változik jelentősen egy kísérlet során, és a különböző kísérletekben éppen alkalmazott vizsgálati anyag koncentrációjának hatására sem. Lényegében a specifikus lebontási sebességi állandó értéke megegyezik a koncentráció időegységenkénti relatív változásával: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Bár rendesen az előírt kritériumok teljesülése mellett az elsőrendű kinetika várható, lehetnek bizonyos körülmények, amelyek között más kinetikák megfelelőbbek. Az elsőrendű kinetikától való eltérést tapasztalhatunk, ha tömegátviteli jelenség, például a diffúziósebesség határozza meg a biotranszformáció sebességét, és nem a biológiai reakció sebessége. Ezek az adatok azonban majdnem mindig leírhatóak pszeudo-elsőrendű kinetikával, ha bevezetünk egy koncentrációfüggő sebességi állandót is.

▼M1

A kísérletek megtervezését és a kapott eredmények értelmezését megkönnyíti, ha a vizsgálat megkezdése előtt megfelelő információk (pl. szabványos szűrővizsgálatokból) állnak rendelkezésre a nagy koncentrációjú vizsgálati anyag biológiai lebonthatóságáról, valamint abiotikus lebontásáról, a transzformációs termékekről és vonatkozó fizikokémiai tulajdonságaikról. A teljes biológiai lebontás mértékének meghatározását a ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag alkalmazása, és annak a vizsgálat végén kapott fázismegoszlása teszi lehetővé. Jelöletlen vizsgálati anyag alkalmazása esetén a teljes biológiai lebontás mértékének megállapítása csak akkor lehetséges, ha a vizsgálati anyag koncentrációja magas és a fő transzformációs termékek ismertek.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Elsődleges biológiai lebontás: Egy kémiai anyagban a mikroorganizmusok által létrehozott szerkezeti változás (transzformáció), amely a kémiai azonosság elvesztésével jár.

Funkcionális biológiai lebontás: Egy kémiai anyagban a mikroorganizmusok által létrehozott szerkezeti változás (transzformáció), amely a kiindulási anyag egy specifikus tulajdonságának elvesztésével jár.

Teljes aerob biológiai lebontás: Egy kémiai anyag oxigén jelenlétében történő, mikroorganizmusok általi lebontása szén-dioxiddá, vízzé és a jelen lévő bármely más elem ásványi sóivá (mineralizáció), valamint új biomassza és szerves mikrobiális bioszintézistermékek létrehozása.

Mineralizáció: Egy vegyi vagy szerves anyag oxigén jelenlétében történő, mikroorganizmusok általi lebontása szén-dioxiddá, vízzé és a jelen lévő bármely más elem ásványi sóivá.

Lappangási fázis: A vizsgálat kezdetétől addig eltelt idő, amíg a lebontást végző mikrobák adaptációja megtörténik, és a vegyi anyag vagy a szerves anyag biológiai lebontásának mértéke a detektálható szint fölé emelkedik (pl. a legmagasabb elméleti biológiai lebontás 10 %-a, vagy ennél kisebb érték a mérési módszer pontosságától függően)

A legmagasabb biológiai lebontási szint: A vizsgált vegyi vagy szerves anyag biológiai lebontásának mértéke százalékban, amely felett további biológiai lebontás a vizsgálat folyamán már nem történik.

Elsődleges szubsztrát: A természetes szén- és energiaforrások összessége, amely a mikrobiális biomassza növekedésére és fenntartására fordítódik.

Másodlagos szubsztrát: Egy olyan, kis koncentrációban jelen lévő szubsztrátkomponens, amelynek a lebontása csak elhanyagolhatóan kis szén- és energiaforrást jelent az érintett mikroorganizmus számára, a fő komponensek (elsődleges szubsztrát) lebontásával szolgáltatott szén- és energiaforráshoz viszonyítva.

Lebontási sebességi állandó: Egy elsőrendű, vagy pszeudo-elsőrendű kinetikus sebességi állandó, k (nap^{-1}), ami a lebontási folyamatok sebességét jelzi. Egymenetes kísérletben k a lappangási fázis vége után nyert lebontási görbe kezdeti szakaszából következtethető.

▼M1

Felezési idő, $t_{1/2}$ (nap): Az elsőrendű reakció sebességének leírására használt kifejezés. A koncentráció felére csökkenéséhez szükséges időintervallum. A felezési idő és a lebontási sebességi állandó a $t_{1/2} = \ln 2/k$ egyenlet szerint aránylik egymáshoz.

Lebontásos felezési idő, DT_{50} (nap): A biológiai lebontási vizsgálat eredményének számszerűsítésére használt kifejezés. Az a lappangási fázist is tartalmazó időintervallum, amely az 50 %-os biológiai lebontási érték eléréséhez szükséges.

Mennyiségi meghatározás határa (LOD) és a mérhetőségi határ (LOQ): A mennyiségi meghatározás határa (LOD) az adott anyagnak az a koncentrációja, amely alatt az anyag egyértelmű azonosításához szükséges jel nem különböztethető meg az analitika háttérzajától. A mérhetőségi határ (LOQ) az adott anyagnak az a koncentrációja, amely alatt a koncentráció nem határozható meg elfogadható pontossággal.

Oldott szerves széntartalom (DOC): A vízminta szerves széntartalmának az a része, amely nem távolítható el meghatározott fázis szétválasztással (pl. 15 percig tartó 40 000 ms^{-2}-es centrifugálással vagy 0,2 – 0,45 μm pórusátmérőjű membránon keresztül történő szűréssel).

Teljes szerves ^{14}C aktivitás (TOA): A szerves széntartalomhoz tartozó teljes ^{14}C aktivitás.

Oldott szerves ^{14}C aktivitás (DOA): Az oldott szerves széntartalomhoz tartozó teljes ^{14}C aktivitás.

Szemcsés szerves ^{14}C aktivitás (POA): A szemcsés szerves széntartalomhoz tartozó teljes ^{14}C aktivitás.

1.3. A VIZSGÁLAT ALKALMAZHATÓSÁGA

Ez a szimulációs vizsgálat kis koncentrációban alkalmazott nem illékony, vagy kis mértékben illékony szerves anyagok vizsgálatára alkalmas. A légkör felé nyitott (pl. vattadugóval lezárt) lombikok alkalmazása mellett a gyakorlatban az 1 $Pa•m^3$/mol-nál (kb. 10^{-5} $atm•m^3$/mol) kisebb Henry-állandójú anyagok tekinthetők nem illékonynak. A gőztérrel rendelkező zárt lombikok esetében a kis mértékben illékony anyagok (Henry-állandójuk < 100 $Pa•m^3$/mol vagy < 10^{-3} $atm•m^3$/mol) is vizsgálhatóak anélkül, hogy anyagveszteség lépne fel. A megfelelő óvintézkedések elhagyása esetén a ^{14}C-jelölt anyag elvesztése léphet fel, amikor a CO_2 eltávozik a rendszerből. Ilyen esetekben szükséges lehet a CO_2 visszatartása egy belső lúg abszorbenssel, vagy egy külső abszorbens rendszerrel (direkt $^{14}CO_2$ meghatározás; lásd 3. melléklet). A biológiai lebontási kinetika meghatározásához a vizsgálati anyag koncentrációjának kisebbnek kell lennie a vízben való oldhatósági határánál. Meg kell jegyezni azonban, hogy a vízben való oldhatóság szakirodalmi értékei jelentősen magasabbak lehetnek, mint a vizsgálati anyag természetes vízben való oldhatósága. Lehetőség van arra is, hogy a vízben különösen gyengén oldódó vizsgálati anyagok oldhatóságát megállapítsuk a vizsgált természetes vizek alkalmazásával.

A biológiai lebontást szimuláló módszer használható mind durva részecskéktől mentes víz („nyílt vízi vizsgálat”), mind pedig olyan zavaros felszíni vizek esetében, amelyek pl. a víz/üledék határfelülethez közel fordulhatnak elő („lebegő-üledék vizsgálat”).

▼M1

1.4. A VIZSGÁLAT ALAPELVE

A vizsgálatot egy adagban hajtják végre, vagy csak felszíni vízben inkubálva a vizsgálati anyagot („nyílt vízi vizsgálat”), vagy 0,01–1 g/l száraztömegű lebegő szilárd anyaggal/üledékkel kiegészített felszíni vízben inkubálva a vizsgálati anyagot (lebegő üledék vizsgálat). Ez utóbbi módszer szimulálja a lebegő szilárd anyagot vagy felkavart üledéket tartalmazó víztestet. A lebegő szilárd anyag/üledék ilyen koncentráció-intervallumának alsó tartománya jellemző a legtöbb felszíni vízre. A vizsgálati lombikok inkubálása aerob körülmények között, rázatva, környezeti hőmérsékleten, sötétben történik. A lebontásos kinetika meghatározásához legalább két különböző vizsgálatianyag-koncentráció alkalmazása szükséges. A koncentrációknak ötös-tizes szorzófaktorral kell eltérniük egymástól, és a környezetben várható koncentrációtartományt kell mutatniuk. A vizsgálati anyag maximális koncentrációja nem lépheti túl a 100 μg/l–t, de 10 μg/l alatti, vagy még kisebb tesztkoncentrációkat részesítenek előnyben annak biztosításához, hogy a biológiai lebontás valóban elsőrendű kinetikát kövessen. A minimális koncentráció nem lehet több 10 μg/l-nél, de az 1–2 μg/l, vagy az 1 μg/l-nél kisebb a legelőnyösebb. Normál esetben az ilyen alacsony koncentrációk megfelelő analízise a kereskedelmi forgalomból beszerezhető ^{14}C-jelzett anyagokkal elvégezhető. Az analitikai módszer korlátjai miatt gyakran lehetetlen a vizsgálati anyag koncentrációjának kívánt pontosságú mérése abban az esetben, ha a vizsgálati anyag bemérési koncentrációja ≤ 100 μg/l (lásd az 1.7.2. pont második bekezdését). A fő transzformációs termék azonosításához és mennyiségi meghatározásához, illetve ha nem áll rendelkezésre alacsony mennyiségi meghatározási határral bíró specifikus analitikai módszer, a vizsgálati anyag magas koncentrációban is alkalmazható (> 100 μg/l és néha > 1 mg/l). Ilyen esetekben a kapott eredmények nem használhatóak az elsőrendű lebontási sebességi állandó és a felezési idő számításához, hiszen a lebontás valószínűleg nem elsőrendű kinetikát követ.

A lebontás nyomon követése megfelelő időpontokban mért maradó ^{14}C koncentráció mérésével, vagy specifikus kémiai vizsgálat használata esetén a vizsgálati anyag maradvány koncentrációjának mérésével történik. A molekula legstabilabb részének ^{14}C-jelölése biztosítja a teljes mineralizáció értékének meghatározását, míg a molekula kevésbé stabil részének jelölése, valamint a specifikus vizsgálat használata teszi lehetővé az elsődleges biológiai lebontás mértékének becslését. Mindamellett a legstabilabb rész nem feltétlenül foglalja magában a molekula vonatkozó funkciós csoportját (ami egy speciális tulajdonsággal, pl. toxicitással, bioakkumulációval stb. lehet kapcsolatos). Ebben az esetben célszerű lehet olyan vizsgálati anyag alkalmazása, amely a funkcionális részen ^{14}C-jelölt, hogy az adott tulajdonság megszűnése követhetővé váljon.

1.5. INFORMÁECIÓK A VIZSGÁLATI ANYAGRÓL

Radioaktívan jelölt és nem jelölt anyagok egyaránt használhatóak a vizsgálat során. Ajánlott a ^{14}C-jelöléses technika. A jelölésnek normál esetben a molekula legstabilabb részét kell érintenie (lásd az 1.4. szakaszt is). Egynél több aromás gyűrűt tartalmazó anyagok esetében célszerű minden gyűrű egy vagy több szénatomjának ^{14}C-jelölése. Emellett javasolt a kapcsolódó, könnyen lebontható csoportok mindkét oldalán egy vagy több szénatom jelölése is. A vizsgálati anyag kémiai és/vagy radiokémiai tisztaságának > 95 %-nak kell lennie. Radioaktívan jelölt anyagok esetében javasolt a kb. 50 μCi/mg (1,85 MBq), vagy még nagyobb specifikus aktivitás, ami megkönnyíti a ^{14}C mérést a kis kezdeti koncentrációjú vizsgálatokban. A vizsgálati anyagokról az alábbi információkkal kell rendelkezni:

▼**M1**

— vízben való oldhatóság [A.6. módszer],

— szerves oldószer(ek)ben való oldhatóság (oldószerrel együtt alkalmazott, vagy vízben rosszul oldódó anyagok),

— disszociációs állandó (pKa), amennyiben az anyag hajlamos a protonálódásra, illetve deprotonálódásra [OECD TG 112] (5),

— gőznyomás [A.4 módszer] és Henry-állandó,

— kémiai stabilitás vízben és sötétben (hidrolízis) [C.7. módszer].

Amennyiben vízben rosszul oldódó anyagot vizsgálunk tengervízben, hasznos tudni a kisózási állandót (vagy „Setschenow-állandót”) K^s, amely a log (S/S') = K^s C_m egyenletből fejezhető ki, ahol S és S' az anyag oldhatósága édes-, illetve tengervízben és C_m a moláris sókoncentráció értéke.

Ha a vizsgálatokat „lebegő üledék vizsgálatként” végezzük el, az alábbi információkkal kell rendelkezni:

— n-oktanol/víz megoszlási együttható [A.8. módszer],

— adszorpciós együttható [C.18. módszer].

További fontos adatok lehetnek:

— a vizsgálati anyag környezeti koncentrációja, ha ez ismert, vagy becsült,

— a vizsgálati anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitása [C.11. módszer],

— gyors és/vagy inherens lebonthatóságáról [C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5) módszerek],

— aerob vagy anaerob lebonthatóság a talaj és üledék/víz transzformációs kísérletekben [C.23., C.24. módszer].

1.6. REFERENCIAANYAG

Referenciaanyagként célszerű egy aerob körülmények között könnyen lebontható anyagot (pl. anilin, vagy nátrium-benzoát) használni. Az anilin és nátrium-benzoát lebontásának várható időtartama rendszerint kevesebb mint 2 hét. A referenciaanyag használatával megbizonyosodhatunk arról, hogy a mikrobiális aktivitás a tesztvízben bizonyos határokon belül mozog, azaz, hogy a vízminta tartalmazz aktív mikrobiális populációt.

▼M1

1.7. MINŐSÉGI KRITÉRIUMOK

1.7.1. **Visszanyerés (recovery)**

Közvetlenül a vizsgálati anyag hozzáadása után minden egyes kiindulási vizsgálati koncentrációt ^{14}C aktivitásméréssel, vagy nem jelölt anyag esetén kémiai analízissel ellenőrizni kell legalább ellenmintában. Ez információval szolgál az analitikai módszer alkalmazhatóságáról és ismételhetőségéről, valamint a vizsgálati anyag eloszlásának homogenitásáról. A későbbi adatkiértékelések során célszerű a kezdeti ^{14}C aktivitás, vagy vizsgálatianyag-koncentráció adattal számolni a névleges koncentráció helyett, hiszen a szorpció miatti veszteségek és az adagolási hibák ezáltal kompenzálhatóak. ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag esetében a kísérlet végén történő visszanyerés értékét tömegkiegyenlítéssel adják meg (lásd 1.8.9.4. pont utolsó bekezdése). Ideális esetben a radioaktívan jelölt izotóp tömegkiegyenlítése 90 és 110 % közötti tartományban mozog, míg a nem jelölt vizsgálati anyag esetében a pontos analitikának 70–110 % közötti kezdeti visszanyerést kell eredményeznie. Ezeket a számokat mint elérendő céltartományokat, és nem mint a vizsgálat elfogadhatósági kritériumait kell kezelni. Az analízis megbízhatóságát választhatóan a kiindulásinál kisebb vizsgálatianyag-koncentrációra, vagy a fő transzformációs termékekre is meg lehet határozni.

1.7.2. **Az analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége**

A vizsgálati anyag és a transzformációs termékek mennyiségi meghatározásához az analitikai módszer ismételhetőségét (a kiindulási kivonás hatékonyságát is beleértve), amennyiben szükséges, a felszíni vízminta 5 független kivonatának analízisével kell ellenőrizni.

Az analitikai módszernek a vizsgálati anyagra és a transzformációs termékekre vonatkozó mennyiségi meghatározási határa (LOD) a tesztrendszerben alkalmazott kiindulási mennyiség legalább 1 %-a legyen. A mérhetőségi határnak (LOQ) az alkalmazott koncentráció 10 %-ával egyenlőnek, vagy annál kevesebbnek kell lennie. Számos szerves anyag és transzformációs termékeik kémiai analízise gyakran megkívánja a vizsgálati anyag viszonylag magas koncentrációjának (azaz > 100 μg/l) alkalmazását.

1.8. A VIZSGÁLATI MÓDSZER LEÍRÁSA

1.8.1. **Eszközök**

A vizsgálatok megfelelő térfogatú (pl. 0,5 vagy 1,0 literes), szilikon-, vagy gumidugóval lezárt kúp, vagy henger alakú lombikokban, illetve CO_2-biztos tetővel (pl. butilgumi-szeptum) ellátott szérumlombikokban végezhetőek. A vizsgálat megvalósításának másik módja, ha nagyszámú lombikot használunk és minden mintavételi időpontban legalább kétszer feldolgozzuk a lombikok teljes tartalmát (lásd az 1.8.9.1. pont utolsó bekezdését). Radioaktívan nem jelölt, nem illékony vizsgálati anyagok esetében gázbiztos dugók vagy fedelek nem szükségesek, a kívülről történő beszennyeződéstől megóvó laza vattadugók megfelelőek (lásd az 1.8.9.1. pont második bekezdését). A kis mértékben illékony anyagok tesztelését biométertípusú rendszerekben végezhetjük, a vízfázis óvatos kevertetése mellett. A felhasználásukat megelőzően hővel vagy autoklávozással a laboreszközök sterilizálhatóak, így a bakteriális beszennyeződésük kizárható. Ezek mellett az alábbi általános laboreszközök kerülnek felhasználásra:

— rázógép vagy mágneses keverő a tesztlombikok folyamatos kevertetéséhez,

▼M1

— centrifuga,

— pH mérő,

— turbiditásmérő a zavarosság mértékének meghatározására,

— hevítőkemence vagy mikrohullámú sütő a száraz tömeg meghatározására,

— membránszűrő apparátus,

— autokláv vagy hőlégsterilizáló az üvegeszközök sterilizálásához,

— ^{14}C-jelölt anyagokkal végzett munkához szükséges felszerelés,

— műszer a ^{14}C-activitás megkötött CO_2-t tartalmazó oldatmintákból, vagy szükség esetén üledékmintákból történő mennyiségi meghatározásához,

— specifikus kémiai analízis alkalmazása esetén a vizsgálati anyag (és a referenciaanyag) méréséhez szükséges analitikai berendezés (pl. gázkromatográf, nagynyomású folyadékkromatográf).

1.8.2. **A vizsgálati anyag törzsoldatai**

A vizsgálat- és referenciaanyag törzsoldatainak elkészítéséhez ioncserélt vizet használunk (lásd az 1.8.7. pont első bekezdését). Az ioncserélt víznek a mikroorganizmusokra toxikus anyagoktól mentesnek kell lennie, és oldott szerves széntartalma (DOC) nem lehet több 1 mg/l-nél (6).

1.8.3. **A felszíni vízminta begyűjtése és szállítása**

A felszíni vízminta vételére szolgáló mintavételi helyet mindenkor a vizsgálat céljainak megfelelően kell kiválasztani. A mintavételi hely kiválasztásakor figyelembe kell venni a mezőgazdasági, az ipari és a háztartási eredetű korábbi hatásokat. Amennyiben ismeretes, hogy az elmúlt négy évben a vízbázis a vizsgálati anyaggal, vagy annak szerkezeti analógjaival szennyeződött, akkor tesztvíz vételére nem használható, hacsak a vizsgálatot végzőnek nem kifejezetten az a célja, hogy korábban szennyezett területen vizsgálja a lebontási sebességét. A víz pH-ját és hőmérsékletét a mintavételi helyszínen kell megmérni. Továbbá fel kell jegyezni a mintavétel mélységét és a vízminta állagát is (szín és zavarosság) (lásd 3. pont). Az aerob körülmények jelenlétének bizonyításához – hacsak ez már a területen végzett előző kísérletek és azok eredményei alapján, valamint a külső megjelenés alapján nyilvánvalóan el nem dönthető – a víz és az üledék felszíni rétege oxigén-koncentrációjának és/vagy redoxpotenciáljának mérése is szükséges. A felszíni vizet alaposan kitisztított edényben szállítsuk. A szállítás során a minta hőmérséklete jelentősen nem haladhatja meg a vizsgálat hőmérsékletét. Ha a szállítás 2–3 óránál hosszabb időt vesz igénybe, a mintát ajánlatos 4 °C-ra hűteni. A vízminta fagyasztása tilos.

▼M1

1.8.4. **A felszíni vízminta tárolása és előkészítése**

A vizsgálatot célszerű a mintavételt követő egy napon belül elvégezni. Ha szükséges a minta tárolása, a tárolás időtartamát minimalizálni kell, és semmilyen körülmények között sem szabad 4 hétnél tovább tárolni. A felhasználásig a vízmintát levegőztetés mellett tartsuk 4 °C-on. A felhasználás előtt távolítsuk el a durva részecskéket (pl. kb. 100 μm pórusméretű nylon szűrőn vagy durva szűrőpapíron történő átszűréssel, vagy ülepítéssel).

1.8.5. **Üledékkel kiegészített vízminta előkészítése (választható)**

A lebegőüledékes iszap vizsgálathoz (a durva részecskéktől az 1.8.4. pontban leírtak szerint szűréssel megszabadított) természetes vízmintát tartalmazó lombikokba juttassunk felszíni üledéket, hogy szuszpenziót kapjunk. A lebegő szilárd anyag koncentrációjának 0,01 és 1 g/l közöttinek kell lennie. A felszíni üledéknek a vízminta kivételi helyéről kell származnia. A vízbázis adott környezetétől függően a felszíni üledék lehet nagy szervesszén-tartalmú (2,5–7,5 %) és finom szerkezetű, vagy kis szervesszén-tartalmú (0,5–2,5 %) és durva szerkezetű (3). A felszíni üledék előkészítésekor átlátszó műanyagcső segítségével emeljünk ki több üledékdarabot, a mintavétel után azonnal vágjuk le a felső aerob réteget (a felszíntől max. 5 mm-es mélységig), és egyesítsük ezeket. Az így kapott üledéket nagy légterű edényben kell szállítani, hogy az üledék aerob körülmények között maradjon (ha a szállítási idő 2–3 óránál több, hűtsük 4 °C-ra). Az üledékmintából 10-szeres mennyiségű vízzel készítsünk szuszpenziót, és a felhasználásig levegőztetés mellett 4 °C-on tartsuk. Ha szükséges az üledék tárolása, a tárolás időtartamát minimalizálni kell, és semmilyen körülmények között sem szabad 4 hétnél tovább tárolni.

1.8.6. **Félfolyamatos eljárás (opcionális)**

Ha hosszú várakozási időnek kell eltelnie azelőtt, hogy a vizsgálati anyag szignifikáns mértékű lebontását lehetne mérni, akkor hosszabb inkubációra (több hónap) lehet szükség. Ha ez az anyag korábbi vizsgálatai alapján ismert, akkor a vizsgálat félfolyamatos eljárással kezdhető, ami lehetővé teszi a tesztvíz vagy szuszpenzió egy részének időről időre történő kicserélését (lásd 2. melléklet). Másik megoldásként a szokásos egymenetes vizsgálat átalakítható félfolyamatos vizsgálattá, ha a vizsgálati anyagnál az egymenetes eljárással körülbelül 60 nap alatt sem tapasztalunk lebontást (lásd az 1.8.8.3. pont második bekezdése).

1.8.7. **A vizsgálati anyag (vagy referenciaanyag) bejuttatása a rendszerbe**

A vízben jól oldódó (> 1 mg/l) és kis illékonyságú (Henry-állandó < 1 Pa•m^3/mól vagy < 10^{-5} atm•m^3/mól) anyagokból ioncserélt vízzel (lásd 1.8.2. pont) törzsoldat készíthető. Ebből megfelelő mennyiséget a tesztedényekbe juttatva beállíthatjuk a kívánt koncentrációkat. A hozzáadott törzsoldat térfogatát a gyakorlatilag lehetséges minimum szinten kell tartani (ha lehetséges, a végső folyadéktérfogat 10 %-a alatt). Egy másik lehetséges módszer a vizsgálati anyag feloldása nagyobb térfogatú tesztvízben, ami a szerves oldószer használatának alternatívájaként tekinthető.

▼M1

Ha ez elkerülhetetlen, a vízben rosszul oldódó nem illékony anyagok törzsoldatait illékony szerves oldószer felhasználásával is előállíthatjuk, de a tesztrendszerbe juttatott oldószer mennyisége nem lépheti túl az 1 tf %-ot, és nem lehet káros hatása a mikrobás aktivitásra, vagy a vizsgálati anyag stabilitására a vizes oldatban. Az oldószert annyira ki kell űzni az oldatból, hogy lehetőleg csak nagyon kis mennyiségben maradjon, ami már jelentős mértékben nem emeli a tesztvíz vagy szuszpenzió DOC koncentrációját. Ezt anyagspecifikus analízissel, vagy ha lehetséges DOC analízissel kell ellenőrizni (6). Figyelmet kell fordítani arra, hogy a bejuttatott oldószer mennyiségét az abszolút szükséges mennyiségre korlátozzuk, és biztosítani kell, hogy a vizsgálati anyag feloldódhasson a tesztvíz végleges térfogatában. A vizsgálati anyagnak a reakcióedényekbe történő bejuttatására szolgáló más módszereket a (7) és (8) referencia tartalmazza. Abban az esetben, ha a vizsgálati anyaghoz szerves oldószert adunk, tesztvizes (más adalék nélküli) oldószer-kontrollt és referencia szubsztrát-kontrollt is alkalmazni kell. Ez utóbbit hasonlóan kezeljük, mint a vivőoldószerben oldott vizsgálati anyaggal kiegészített aktív tesztedényeket. Az oldószer-kontrollok célja, hogy megvizsgáljuk a szolvens által okozott, a mikrobapopulációra gyakorolt lehetséges gátló hatást, amit a referenciaanyag lebontási kinetikája jelez előre.

1.8.8. **Tesztkörülmények**

1.8.8.1. *Teszthőmérséklet*

Az inkubációnak sötétben vagy szórt fényben, kontrollált hőmérsékleten (± 2 °C) kell történnie, amely lehet terepi hőmérséklet vagy 20–25 °C-os szobahőmérséklet. A terepi hőmérséklet a minta mintavételkor mért tényleges hőmérséklete, vagy a mintavételi hely átlagos terepi hőmérséklete.

1.8.8.2. *Kevertetés*

A kevertetés a folyamatos rázatás vagy keverés révén gondoskodik a részecskék és a mikrobák szuszpenzióban tartásáról. A kevertetés elősegíti a gáztérből az oxigén bejutását a folyadékfázisba, ezáltal az aerob körülmények megfelelő módon fenntarthatóak. Helyezzük a lombikokat a rázógépbe (kb. 100 rpm-es kevertetés) vagy használjunk mágneses keverőt. A kevertetésnek folyamatosnak kell lennie. Mindazonáltal a rázatásnak vagy a keverésnek a homogén szuszpenzió fenntartása mellett a lehető legenyhébbnek kell lennie.

1.8.8.3. *A vizsgálat időtartama*

A vizsgálat időtartama általános esetben nem lépi túl a 60 napot, hacsak a félfolyamatos eljárás szerint a vizsgálati szuszpenziót időről időre nem cseréljük (lásd a 1.8.6. pontot és a 2. mellékletet). Az egymenetes vizsgálati periódus is kiterjeszthető azonban maximum 90 napra, ha a vizsgálati anyag lebontása az első 60 napon belül megkezdődött. A lebontás rendszeres időközönkénti nyomon követése a visszamaradó ^{14}C aktivitás, vagy a kibocsátott $^{14}CO_2$ (lásd 1.8.9.4. pont) mérésével és/vagy a kémiai analízissel (lásd 1.8.9.5. pont) történik. A lebontási folyamat értékelhetőségéhez az inkubációs időnek megfelelően hosszúnak kell lennie. A lebontás mértékének lehetőleg 50 % felett kell lennie, lassan bomló anyagoknál a lebontás mértékének megfelelőnek (normális esetben 20 % feletti lebontás) kell lennie ahhoz, hogy biztosítsa a kinetikus lebontásos sebességi állandó becsülhetőségét.

▼M1

A vizsgálati rendszerben a pH-t és az oxigénkoncentrációt rendszeresen mérni kell, hacsak az ugyanarról a területről származó víz- és üledékmintákkal végzett hasonló vizsgálatokból leszűrhető tapasztalatok ezt szükségtelenné nem teszik. Bizonyos körülmények között a vízben vagy üledékben sokkal nagyobb koncentrációban jelen lévő elsődleges szubsztrátok metabolizmusa elegendő CO_2-termelődést és oxigénfogyást eredményez ahhoz, hogy a vizsgálat során a kísérleti körülmények jelentősen megváltozzanak.

1.8.9. **Kísérleti eljárás**

1.8.9.1. *A lombikok előkészítése nyílt vízi vizsgálathoz*

Juttassunk megfelelő mennyiségű tesztvizet a tesztlombikokba, a lombikokat térfogatuk kb. harmadáig töltve, de legalább kb. 100 ml tesztvizet töltve beléjük. Több lombik használata esetén (ami lehetővé teszi a lombik teljes tartalmának feldolgozását minden mintavételi időpontban) is kb. 100 ml a kívánt tesztvíz-mennyiség, mivel a kis mintatérfogatok hatással lehetnek a lappangási fázis hosszára. A vizsgálati anyag törzsoldatból történő bejuttatása az 1.8.2. és 1.8.7. pontokban leírtak szerint történik. Hogy a lebontási kinetika meghatározása és a kinetikus lebontásos sebességi állandó számíthatóvá váljon, a vizsgálati anyagot legalább két, egymástól ötös-tizes szorzófaktorral eltérő koncentrációban kell használni. Mindegyik választott koncentrációnak 100 μg/l-nél kisebbnek kell lennie, lehetőleg a < 1–10 μg/l tartományban.

Zárjuk le a lombikokat a levegő és CO_2 számára áthatolhatatlan dugókkal vagy fedelekkel. ^{14}C izotóppal nem jelölt nem-illékony vizsgálati anyagok esetében elegendő laza vattadugókat használni a légkörből érkező szennyezések elkerülésére (lásd 1.8.1. pont), feltéve hogy az összes fő transzformációs termék ismerten nem illékony, és indirekt CO_2 meghatározást (lásd 3. melléklet) alkalmazunk.

Inkubáljuk a lombikokat a választott hőmérsékleten (lásd 1.8.8.1. pont). Különítsünk el mintákat a kémiai analízishez vagy a ^{14}C méréshez a vizsgálat kezdetén (azaz mielőtt a biológiai lebontás megindulna; 1.7.1. pont), majd végig a vizsgálat folyamán megfelelő időközönként. A mintavétel történhet úgy, hogy minden párhuzamosból kis mennyiségű mintát (pl. 5 ml-es alikvótok) veszünk, vagy minden egyes mintavételi időpontban feldolgozhatjuk teljes lombikok tartalmát. A vizsgálati anyag mineralizációját meghatározhatjuk indirekt és direkt módon is (lásd 3. melléklet). A sebességi állandó megbízható becsléséhez általában legalább öt mintavételi pont szükséges a lebontási fázisban (azaz a lappangási fázist követően), hacsak nem igazolható, hogy három mérési pont elégséges a gyorsan bomló anyagok esetében. Lassan bomló anyagoknál a lebontásos fázisban több mérés is könnyen kivitelezhető, ennek következtében a k számításához több adatpontot használhatunk. Mivel a biológiai lebontás sebessége eltérő, egy fix mintavételi ütemterv nem határozható meg, bár ha a lebontás lassú heti egy mintavétel elvégzése ajánlatos. Ha a vizsgálati anyag lebontása gyors, az első három napban napi egy mintát, majd ezt követően két-háromnaponta egy mintát kell venni. Bizonyos körülmények között (például gyorsan hidrolizáló anyagok esetében) óránkénti mintavételre is szükség lehet. A vizsgálat megkezdése előtt ajánlott elővizsgálatok lefolytatása a mintavételi intervallumok meghatározására. Ha a mintákat további specifikus analízisnek is alá kell vetni, akkor tanácsos több mintát venni, majd az analizálandókat a kísérlet végén, a visszafelé mérés stratégiáját alkalmazva (azaz az utoljára levett mintákat analizáljuk először) kiválasztani (a minták tárolás közbeni stabilitására vonatkozó útmutatót lásd az 1.8.9.5. pont második bekezdésében).

▼M1

1.8.9.2. *A lombikok és minták száma*

Állítsunk be megfelelő számú tesztlombikot, hogy rendelkezésre álljanak a következők:

— minden egyes vizsgálati anyag-koncentrációhoz legalább két párhuzamos (lehetőleg legalább 3), vagy minden egyes koncentrációhoz számos tesztlombik, ha minden mintavételkor teljes lombikok tartalmának feldolgozása történik (F_T-vel jelölve),

— tesztlombikok az tömegkiegyenlítés-kalkulációhoz legalább két párhuzamosban minden egyes tesztkoncentrációhoz (F_M-mel jelölve),

— vizsgálati anyag nélküli vak kontroll; legalább egy, csak tesztvizet tartalmazó tesztlombik (F_B-mel jelölve),

— referenciakontroll; a referenciaanyagot (pl. anilin vagy nátrium-benzoát) tartalmazó tesztlombikok két párhuzamosban (F_C-vel jelölve). A referenciakontroll célja a mikrobiális aktivitás minimumának ellenőrzése. Ha lehetséges, radioaktívan jelölt referenciaanyag is használható, még akkor is, ha a vizsgálati anyag lebontását kémiai analízissel követjük,

— steril kontroll; egy-két sterilizált tesztvizet tartalmazó lombik az abiotikus lebontás, vagy a vizsgálati anyag más, nem biológiai eredetű elvesztésének vizsgálatához (F_S-sel jelölve). A biológiai aktivitás leállítható a tesztvíz autoklávozásával (121 °C; 20 perc), mérgező anyag hozzáadásával (pl. 10–20 g/l nátrium-azid (NaN_3), 100 mg/l higany-klorid ($HgCl_2$), vagy 100 mg/l formalin), vagy gammasugárzással. $HgCl_2$ használata esetén ezeket mint veszélyes hulladékot kell ártalmatlanítani. Nagy mennyiségben alkalmazott vizes üledékeknél a steril körülményeket nem könnyű kialakítani, ebben az esetben ismételt (pl. háromszori) autoklávozás javasolt. Figyelembe kell venni, hogy az autoklávozás hatására az üledék szorpciós tulajdonságai megváltozhatnak,

— tesztvizet, referenciaanyagot és tesztvizet tartalmazó oldószer kontrollok; azonos mennyiségű oldószerrel és a vizsgálati anyag alkalmazásával megegyező módon előállított lombikok két párhuzamosban. Ennek célja az oldószer esetleges gátló hatásának megállapítása a referenciaanyag lebontásának meghatározásán keresztül.

A vizsgálat megtervezése során a vizsgálatot kivitelező személynek fontolóra kell vennie, hogy számára inkább a nagyobb számú kísérleti ismétlés, vagy ezzel szemben a nagyobb számú mintavétel a fontosabb. A szükséges lombikok pontos száma a lebontás mérésére szolgáló módszertől függ (lásd az 1.8.9.1. pont harmadik bekezdését; az 1.8.9.4. pontot és a 3. mellékletet).

▼M1

Minden mintavételi időpontban minden lombikból két mintát (pl. 5ml-es alikvótokat) kell venni. Ha számos lombik használatos, hogy teljes lombikok tartalmát fel lehessen dolgozni, akkor minden mintavételi időpontban legalább két lombikot kell feláldozni (lásd az 1.8.9.1. pont első bekezdését).

1.8.9.3. *Lombikok előkészítése lebegő üledék vizsgálathoz [választható]*

Ha szükséges, juttassunk megfelelő mennyiségű tesztvizet és üledéket a tesztedényekbe (lásd 1.8.5. pont). A lombikoknak a lebegő üledék vizsgálathoz történő előkészítése megegyezik a nyílt vízi vizsgálatnál leírtakkal (lásd 1.8.9.1. és 1.8.9.2. pontok). Használjunk inkább szérumpalackokat vagy hasonló alakú lombikokat. Helyezzük a lezárt lombikokat vízszintesen a rázógépbe. A nem ^{14}C-jelölt, nem-illékony anyagokat tartalmazó nyitott lombikokat nyilvánvalóan függőlegesen kell elhelyezni, ebben az esetben mágneses keverés, vagy üveggel bevont mágnesrudak használata ajánlott. Ha szükséges, a megfelelő aerob körülmények eléréséhez levegőztessük a reakcióedényeket.

1.8.9.4. *Radiokémai mérések*

A képződő $^{14}CO_2$ mérhető indirekt, vagy direkt módon (lásd 3. melléklet). Az indirekt $^{14}CO_2$ meghatározás a tesztvíz vagy szuszpenzió kezdeti $^{14}CO_2$ aktivitásának, és a mintavétel alkalmával a minta pH 2–3-ra történő lesavanyítása és a CO_2 kiűzése után mért teljes maradó aktivitásnak a különbsége alapján történik. Így a szervetlen széntartalom is távozik, és a maradó aktivitás a szerves anyagtól származik. Ha a vizsgálati anyag átalakulása során illékony fő transzformációs termék képződik, az indirekt $^{14}CO_2$ meghatározás nem használható (lásd 3. melléklet). Amennyiben lehetséges, a $^{14}CO_2$ képződését minden egyes mintavételi pontban legalább egy lombikban direkt módon kell mérni (lásd 3. melléklet). Ez a módszer lehetővé teszi mind az tömegkiegyenlítés, mind a biológiai lebontási folyamat nyomon követését, de használata korlátozott a zárt lombikos vizsgálatok esetében.

Ha a vizsgálat során a termelődő $^{14}CO_2$-t direkt módon mérjük, erre a célra a vizsgálat kezdetekor több lombikot kell beállítani. Ha a vizsgálati anyagból illékony fő transzformációs termék képződik, ez a módszer az ajánlott. A többi tesztlombik tartalmát minden mérési pontban pH 2–3-ra savanyítjuk, és a $^{14}CO_2$-t belső vagy külső abszorbenssel kötjük meg (lásd 3. melléklet).

A ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag és a fő transzformációs termék koncentrációját esetleg radiokromatográfiásan (pl. vékonyréteg-kromatográfia, RAD-TLC), vagy radiokémiai detekcióval, HPLC (nagynyomású folyadékkromatográfia) segítségével is meghatározhatjuk.

Opcionálisan a maradó radioaktivitás (lásd 1. melléklet), a vizsgálati anyag és a transzformációs termék fázismegoszlását is meghatározhatjuk.

▼M1

A vizsgálat végén a tömegkiegyenlítést direkt $^{14}CO_2$ méréssel kell megállapítani, olyan független tesztlombikokból, amelyekből a vizsgálat folyamán nem vettünk mintákat (lásd 3. melléklet).

1.8.9.5. *Specifikus kémiai analízis*

Ha lehetőség van érzékeny, specifikus analitikai módszer használatára, az elsődleges biológiai lebontás mértéke az izotópos jelölés helyett a vizsgálati anyag teljes maradó koncentrációjának mérésével állapítható meg. Amennyiben jelölt vizsgálati anyagot használunk (a teljes mineralizáció mérésére), a specifikus kémiai analízis ezzel párhuzamosan elvégezhető, hasznos többlet-információval szolgál, és ellenőrizhetjük vele a módszert. A specifikus kémiai analízis a vizsgálati anyag lebontása során keletkező transzformációs termék mérésére is használható, és ez ajánlott is olyan anyagok esetében, amelyek mineralizációs felezési ideje 60 napnál hosszabb. A vizsgálati anyag és a transzformációs termék koncentrációját minden mintavételi pontban mérni kell és ki kell értékelni (koncentrációban vagy százalékos formában). Általánosságban az alkalmazott koncentráció 10 %-a ≤, bármely mintavételi időpontban kimutatható transzformációs termékeket azonosítani kell, hacsak nincs más értelmű ésszerű indoklás. A kísérlet során folyamatosan emelkedő koncentrációban jelen lévő transzformációs termékek azonosítását is meg kell fontolni, még akkor is, ha ezek nem érik el a fenti határt, mivel ez a lebontással szembeni ellenállóképességet jelezhet. Ha a vizsgálati anyag gyors abiotikus lebontása lehetségesnek tűnik (pl. hidrolízis), akkor fontolóra kell venni a transzformációs termékek analízisét a steril kontrollokban. A transzformációs termékek mennyiségi és minőségi meghatározását az adott esetben kell eldönteni, és az indoklásokkal együtt a kiértékelésben közzétenni. A szerves oldószerrel végzett extrakciós technikákat a megfelelő analitikai módszer előírásai alapján kell elvégezni.

Minden mintát 2 és 4 °C között, légmentesen kell tárolni, ha az analízis 24 órán belül megtörténik (ajánlott). Hosszabb tárolásnál a mintákat – 18 °C alá kell fagyasztani, vagy kémiai módszerrel tartósítani kell. Utóbbi módszerhez a savanyítás nem javasolt, hiszen ezek a minták instabilak lehetnek. Ha a mintákat 24 órán belül nem analizálják és hosszabb tárolásra kerülnek, akkor egy tárolási stabilitás-vizsgálatot kell kapcsolni a kísérlethez, hogy a vizsgált vegyületek kémiai stabilitása – 18 °C alatt vagy tartósított állapotban demonstrálható legyen. Oldószeres extrakciós vagy szilárd fázisú extrakciós (SPE) lépést is magában foglaló analitikai módszereknél az extrakciót azonnal a mintavétel után, vagy a fagyasztott minta maximum 24 óráig tartó tárolása után el kell végezni.

Az analitikai módszer érzékenységének függvényében a pont 16. sorában jelzetteknél nagyobb mintatérfogatok lehetnek szükségesek. A vizsgálat könnyedén kivitelezhető 2–3 literes lombikokban egy literes teszttérfogatokkal, amely lehetővé teszi kb. 100 ml minta levételét.

▼M1

2. **ADATOK ÉS DOKUMENTÁLÁSUK**

2.1. AZ EREDMÉNYEK KEZELÉSE

2.1.1. **Az adatok ábrázolása**

Kerekítsük a mintavételi időpontokat egész órákra (hacsak az anyag lényeges mértékű lebontása nem percek kérdése), de ne egész napokra. Ábrázoljuk a vizsgálati anyag becsült maradó aktivitását (^{14}C-jelölt anyagok esetében), vagy maradó koncentrációját (nem jelölt anyagok esetében) az idő függvényében mind lineáris, mind fél-logaritmikus skálán (lásd 1a., 1b. ábra). Ha lebontás játszódik le, hasonlítsuk össze az F_T lombikok eredményeit az F_S lombikokéval. Ha a vizsgálati anyagos lombikok (F_T) eredményeinek átlaga kevesebb mint 10 %-kal tér el a steril lombikokétól (F_S), akkor megállapítható, hogy a tapasztalt lebontás alapvetően abiotikus. Amennyiben az F_S lombikokban a lebontás kisebb mértékű, az értékekkel korrigáljuk az F_T lombikoknál kapott értékeket (kivonással), hogy becsülni tudjuk a biológiai lebontás mértékét. Ha a fő transzformációs termékek választható analízisét elvégeztük, akkor ezek keletkezését és fogyását is ábrázolni kell a vizsgálati anyag fogyása mellett.

Határozzuk meg a lappangási fázis t_L hosszát a lebontási görbéből (fél-logaritmikus ábrázolás) úgy, hogy extrapoláljuk ennek lineáris részét a zéró lebontásig, vagy úgy, hogy meghatározzuk a 10 %-os lebontáshoz szükséges időt (lásd 1a., 1b. ábra). A fél-logaritmikus ábrából becsüljük meg az elsőrendű sebességi állandót (k) és standard hibáját az idő függvényében felvett ln (maradó ^{14}C aktivitás vagy vizsgálati anyag-koncentráció) lineáris regressziójából. Főleg a ^{14}C méréseknél csak a görbének lappangási fázis vége utáni kezdeti lineáris szakaszát használjuk, és a kiválasztásnál a kisszámú, reprezentatív adatokat részesítsük előnyben a nagyobb számú, de bizonytalan adatokkal szemben. A bizonytalanság tartalmazza a mért maradó ^{14}C aktivitások javasolt direkt felhasználásából eredő hibákat (lásd lent). Ha a lebontás kétfázisú lefutást követ, néha fontos lehet két különböző sebességi állandó számítása. Ebből a célból a lebontási görbe két különböző fázisa definiálható. Az ugyanabból a lombikból vett minták esetében a párhuzamosokban minden egyes lombikra számítani kell a sebességi állandót (k) és a felezési időt ($t_{½}$ = ln2/k); vagy ha a lombik teljes tartalmát analizáljuk (lásd az 1.8.9.2. pont utolsó bekezdése), akkor az eredmények átlagából. Amikor az első módszert használjuk, a sebességi állandót és a felezési időt megadjuk a párhuzamosok minden egyes lombikjára, és ezek átlagát is a standard hibával. Magas koncentrációjú vizsgálati anyag esetében a lebontási görbe jelentősen eltérhet az egyenestől (fél-logaritmikus ábrázolás) és az elsőrendű kinetika érvénytelen lehet. Ennek következtében a felezési idő megadásának nincs értelme. Egy limitált adattartományra azonban használható pszeudo-elsőrendű kinetika, és a lebontási felezési idő DT_{50} (az 50 %-os lebontáshoz szükséges idő) becsülhető. Ugyanakkor fontos szem előtt tartani, hogy a lebontás időtartama a kiválasztott adattartományon túl a DT_{50} használatával nem határozható meg, mivel ez az érték csupán ennek az adatsornak a sajátja. A statisztikai számításokat és a görbeillesztést könnyítő segédeszközök könnyen hozzáférhetőek, és az ilyen típusú szoftverek alkalmazása ajánlott is.

▼M1

Specifikus kémiai analízis elvégzése esetén határozzuk meg a lebontási állandókat és felezési időket az elsődleges lebontásra, a teljes mineralizációra leírtak szerint (lásd fent). Ha az elsődleges lebontás a meghatározó folyamat, néha a teljes lebontási időtartam pontjai felhasználhatóak. Ennek oka az, hogy szemben a ^{14}C aktivitásméréssel, ezek a mérések direktek.

Ha ^{14}C-jelölt anyagot használunk, a tömegkiegyenlítést a bemért kezdeti koncentráció százalékában kell kifejezni, legalább a vizsgálat végeztével.

2.1.2. **Maradó aktivitás**

Amikor a ^{14}C-jelzett szerves anyag lebontódik, a ^{14}C nagy része $^{14}CO_2$-dá alakul, míg a másik része a biomassza növekedésére és/vagy extracelluláris metabolitok szintézisére használódik fel. Ennek következtében az anyag biológiai lebontásának maximális szintje nem eredményezi széntartalmának 100 %-os átalakulását $^{14}CO_2$-dá. A ^{14}C bioszintézis-termékekbe épül be, majd ezt követően, a másodlagos mineralizációnak köszönhetően lassan, $^{14}CO_2$ formában felszabadul. Ezen okok miatt a maradó ^{14}C aktivitás (a CO_2 kiűzése után) vagy az idő függvényében felvett termelődő $^{14}CO_2$ ábrázolásakor a lebontás befejeződése után egy „lecsengési fázist” fogunk látni. Ez bonyolultabbá teszi az adatok kinetikai interpretációját, ezért csupán a görbe kezdeti szakaszát (a lappangási fázis befejeződése után és a kb. 50 %-os lebontási szint elérése előtt) használjuk a lebontási sebességi állandó számításához. Ha a vizsgálati anyag lebomlik, a teljes maradó szerves ^{14}C aktivitás mindig nagyobb, mint a maradó intakt vizsgálati anyaghoz kapcsolható ^{14}C aktivitás. Ha a vizsgálati anyag elsőrendű reakció szerint bomlik, és egy állandó α mennyisége CO_2-dá mineralizálódik, a ^{14}C csökkenés görbéjének (teljes szerves ^{14}C az idő függvényében) kezdeti meredeksége α-szorosa lesz a vizsgálati anyag koncentrációjának (vagy egészen pontosan a vizsgálati anyag ^{14}C-gyel jelölt részének) megfelelő görbe meredekségének. A teljes szerves ^{14}C aktivitás korrigálatlan mért értékeit használva a számított lebontási sebességi állandó ennek következtében csak óvatos becslés lesz. Különféle egyszerűsítő feltételeken alapuló, a vizsgálati anyag koncentrációját a mért radiokémiai aktivitásokból becslő módszer a szakirodalomból ismert (2)(9)(10)(11). Az ilyen eljárások a legkönnyebben a gyorsan bomló anyagokra alkalmazhatóak.

2.2. AZ EREDMÉNYEK INTERPRETÁCIÓJA

Amennyiben k függetlennek bizonyul az alkalmazott koncentrációtól (azaz a k számított értéke közel azonos a különböző vizsgálati anyag-koncentrációk esetén) megállapítható, hogy az elsőrendű sebességi állandó reprezentatív az adott körülményekre, azaz a vizsgálati anyagra, a vízmintára és a teszthőmérsékletre. Hogy az eredmények milyen mértékben általánosíthatóak és vetíthetőek ki más rendszerekre, csak szakértői vélemények alapján határozható meg. Amennyiben a vizsgálati anyagot magas koncentrációban alkalmazzuk, és így a lebontás nem elsőrendű kinetikát követ, az adatok nem használhatóak fel elsőrendű lebontási sebességi állandó és a megfelelő felezési idő megadásához. Az ilyen adatok azonban még mindig használhatóak a teljes mineralizáció mértékének becslésére és/vagy a transzformációs termékek kimutatására és mennyiségi meghatározására.

▼M1

Amennyiben a biológiai lebontáson kívüli egyéb, a vizsgálati anyag mennyiségének csökkenésével járó folyamatok (hidrolízis vagy volatilizáció) sebessége ismert, ezek értékét a teljes koncentráció csökkenési sebességéből a vizsgálat során kivonva egy közelítő biológiai lebontási sebességet kaphatunk. A hidrolízis-adatokhoz a steril kontrollból vagy nagyobb koncentrációjú párhuzamos vizsgálati anyagkísérletből juthatunk.

A $^{14}CO_2$ indirekt és direkt meghatározása (lásd 1.8.9.4. pont és 3. melléklet) csupán a vizsgálati anyag CO_2-dá történő mineralizációja mértékének mérésére használható. A ^{14}C-jelölt vizsgálati anyag koncentrációját és a fő transzformációs termék (lásd 1.8.9.4. pont harmadik bekezdését) keletkezését radiokromatográfiával (RAD-TLC) vagy HPLC-vel analizálhatjuk. A felezési idő direkt meghatározásához szükséges, hogy ne legyen jelen fő transzformációs termék (definíció szerint az alkalmazott vizsgálati anyag 10 %-a ≤). Ha a definíció szerint ilyen anyag jelen van, az adatok részletes kiértékelésére van szükség. Ez jelenthet megismételt vizsgálatot, és/vagy a transzformációs termék azonosítását (lásd 1.8.9.5. pont első bekezdése), hacsak a termék sorsa a gyakorlatban egyértelműen meg nem állapítható (pl. a lebontási útvonal ismerete). Mivel a vizsgálati anyag CO_2-dá alakult hányada változó (erősen függ a vizsgálati anyag és más hozzáférhető szubsztrátok koncentrációjától, a tesztkörülményektől és a mikrobiális populációtól) ez a vizsgálat nem alkalmas a teljes biológiai lebontás közvetlen számítására, amit pl. a DOC fogyási vizsgálatban láthatunk, de az eredmények hasonlóak a respirometriás vizsgálatból kaphatóakkal. A mineralizáció mértéke így a teljes biológiai lebontás minimális szintjénél kisebb, vagy azzal egyenlő lesz. Hogy még teljesebb képet kapjunk a teljes biológiai lebontásról (mineralizáció és biomasszába történő beépülés), a ^{14}C fázismegoszlásának analízisét a vizsgálat végén el kell végezni (lásd 1. melléklet). A ^{14}C a diszpergált fázisban a bakteriális biomasszába beépült ^{14}C-ből és a szerves részecskékhez tapadt ^{14}C-ből fog állni.

2.3. A VIZSGÁLAT VALIDITÁSA

Amennyiben a referenciaanyag nem bomlik le a várt időtartam alatt (anilinre és nátrium-benzoátra általában kevesebb mint két hét), a vizsgálat validitása kétségbe vonható és további ellenőrzése szükséges, vagy a vizsgálatot új vízmintával meg kell ismételni. A módszer egy ISO-körméréses tesztsorozatában, amelyben Európa-szerte hét laboratórium vett részt, az anilinre alkalmas lebontási sebességi állandó a 0,3–1,7 nap^{-1}-es tartományban mozgott, 20 °C-on 0,8 nap^{-1}-es átlaggal és ± 0,4 nap^{-1} standard hibával ($t_{½}$ = 0,9 nap). A vizsgált vízmintákra vonatkozóan milliliterenként 10^3–10^4 CFU-nak (telepképző egység) megfelelő bakteriális biomassza-tartalmat írtak le. A lebontási sebességek az ásványi anyagban dúsabb közép-európai vizekben nagyobbak voltak, mint a skandináv oligotróf vizekben, amit a különböző ásványianyag-ellátottság, vagy a kémiai anyagokkal való előzetes kitettség okozhat.

A kísérlet végén a teljes visszanyerésnek (anyagmérleg) 90 és 110 % között kell lennie radioaktívan jelölt anyagoknál, míg nem jelölt anyagok esetében a kezdeti visszanyerésnek (recovery) a kísérlet kezdetén 70 és 110 % között kell lennie. Az említett tartományok azonban csak megcélzandó értékek, és nem használhatók a vizsgálat elfogadhatósági kritériumaiként.

▼M1

3. **VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV**

A vizsgálat típusának (azaz nyílt vízi vagy lebegő üledék vizsgálat) egyértelműen meg kell jelennie a vizsgálat jegyzőkönyvében, amelynek az alábbi információt is tartalmaznia kell:

Vizsgálati anyag és referenciaanyag(ok):

— közkeletű nevek, kémiai elnevezések (ajánlottak a IUPAC és/-vagy CAS elnevezések), CAS számok, szerkezeti képletek (ha az alkalmazott anyag radioaktívan jelölt a ^{14}C pozíciójának megjelölésével) és a vizsgálati anyag és referenciaanyag fontos fizikokémiai tulajdonságai (lásd 1.5. és 1.6. pont),

— a transzformációs termék azonosításához és mennyiségi meghatározásához használt standardok kémiai elnevezései, CAS számai, szerkezeti képletei (ha az alkalmazott anyag radioaktívan jelölt, a ^{14}C pozíciójának megjelölésével), fontos fizikokémiai tulajdonságai,

— a vizsgálati anyag és referenciaanyag tisztasága (szennyezései),

— a jelölt vegyület radiokémiai tisztasága és specifikus aktivitása (ahol szükséges).

Felszíni víz:

A levett vízmintáról az alábbi minimális információkat közre kell adni:

— a mintavételi hely fekvése és leírása, ha lehetséges, szennyezettségi előtörténete,

— a mintavétel időpontja,

— ásványi anyagok (totál N, ammónium, nitrit, nitrát, totál P, oldott ortofoszfát),

— mintavételi mélység,

— a minta állaga (pl. szín és zavarosság),

— DOC és TOC,

— BOD,

— hőmérséklet és pH a mintavétel helyén és idején,

— oxigén vagy redoxpotenciál (csak abban az esetben kötelező, ha az aerob körülmények megléte nem nyilvánvaló),

— ionerősség vagy konduktivitás (tengervíz és brakk víz esetében),

— lebegő szilárd anyagok (zavaros minta esetén),

— egyéb, esetleg fontos információk a mintavétel időpontjában a mintavétel helyszínéről (pl. a folyók, vagy tengeráramlatok aktuális vagy múltbéli adatai, közeli fő kiömlések és ezek típusa, időjárási körülmények a mintavétel időpontját megelőzően),

és választhatóan:

— mikrobiális biomassza (pl. akridinnarancs direkt sejtszám vagy telepképző egység),

▼M1

— szervetlen szén,

— klorofill-a koncentráció, mint az alga- biomassza speciális mérése.

Ezen túlmenően lebegő üledék vizsgálat végzése esetén az alábbi információkat kell rendelkezésre bocsátani az üledékről:

— az üledék mintavételi mélysége,

— az üledék állaga (úgymint színes, saras, iszapos, vagy homokos),

— textúra (pl. durva homok, finom homok, iszap és agyag %-ban),

— a lebegő szilárd anyag száraztömege g/l-ben, TOC koncentráció vagy égetés során fellépő tömegcsökkenés mint a szervesanyag-tartalom mérőszáma,

— pH,

— oxigén vagy redoxpotenciál (csak abban az esetben kötelező, ha az aerob körülmények megléte nem nyilvánvaló).

Tesztkörülmények:

— a mintavétel és a laboratóriumi felhasználás között eltelt idő, mintatárolás és a minta előkezelése, a vizsgálatok kivitelezésének időpontja,

— az alkalmazott vizsgálati anyag mennyisége, tesztkoncentráció és referenciaanyag,

— a vizsgálati anyag alkalmazásának módszere, oldószer használata,

— a használt felszíni víz és üledék (ha használjuk) térfogata, és az egyes időközönként analízisre levett minták térfogata,

— az alkalmazott tesztrendszer leírása,

ha a kivitelezés nem sötétben folyik, a szórt fényre vonatkozó információ;

— információ a steril kontrollok beállításának módszereiről (pl. hőmérséklet, az autoklávozások ideje és száma),

— inkubációs hőmérséklet,

— információ az analitikai technikákról, a radiokémiai mérési módszerekről, a tömegkiegyenlítés ellenőrzésének és a fázismegoszlás mérésének (amennyiben használjuk) módszeréről,

— a párhuzamosok száma.

Eredmények:

— a visszanyerés százaléka (lásd 1.7.1. pont),

— az alkalmazott analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége, beleértve a mennyiségi meghatározási határt (LOD) és a mérhetőségi határt (LOQ) (lásd 1.7.2. pont),

▼M1

— az összes mért adat (beleértve a mintavételi időpontokat) és számított érték táblázatos formában, a lebontási görbe minden egyes tesztkoncentrációra minden párhuzamosban, a logaritmikus ábrázolás meredekségének korrelációs koefficiense, a becsült lappangási fázis és az elsőrendű vagy pszeudo-elsőrendű sebességi állandó (ha lehet), és a megfelelő lebontási felezési idő (vagy féléletidő, t_{50}),

— fontos értékek, mint az egyedi mintákból kapott eredmények átlagai, pl. a lappangási fázis hossza, lebontási sebességi állandó, lebontási felezési idő (vagy t_{50}),

— a rendszer nem adaptálódottként, vagy adaptálódottként történő kategorizálása a lebontási görbe lefutásából, vagy a tesztkoncentráció esetleges hatásából,

— a végső anyagmérleg-ellenőrzés eredményei és a fázismegoszlás-mérések eredményei (ha vannak),

— a mineralizálódott ^{14}C aránya és specifikus kémiai analízis használata esetén az elsődleges biológiai lebontás végső szintje,

— az alkalmazott és fő transzformációs termékek azonosítása, moláris koncentrációja és százalékos aránya (lásd az 1.8.9.5. pont első bekezdése), ahol szükséges,

— a transzformáció feltételezett lebontási útja, ahol szükséges,

— az eredmények összegzése.

4. **IRODALOM**

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. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

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 (to be published summer 2000).

▼**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

1. melléklet

A ^{14}C Fázismegoszlása

Az eljárás ellenőrzéséhez a maradó teljes szerves ^{14}C aktivitás (TOA) rutinvizsgálatait ki kell egészíteni a tömegkiegyenlítés-mérésekkel, amelyek magukban foglalják a képződő, abszorbenssel megkötött $^{14}CO_2$ direkt meghatározását is (lásd 3. melléklet). A pozitív $^{14}CO_2$ termelődés önmagában közvetlen bizonyíték a biológiai lebontásra, szemben az abiotikus lebontással, vagy más anyagvesztési mechanizmussal, mint a volatilizáció és a szorpció. A biológiai lebontási viselkedést jellemző hasznos többletinformáció nyerhető a részecskék membránszűréssel vagy centrifugálással történő eltávolítását követően, az oldat fázis (oldott szerves ^{14}C aktivitás, DOA) és a szuszpenzió fázis (szuszpendált szerves ^{14}C aktivitás, POA) közötti TOA megoszlásának méréséből. A POA a mikrobiális biomasszára és más részecskékre kitapadt vizsgálati anyagból, és e mellett a vizsgálati anyag széntartalmának azon részéből áll, amely a szaporodó sejtek anyagának szintézisére fordítódik, és így beépül a szuszpendált biomassza frakcióba. Az oldott ^{14}C szerves anyag képződése DOA-ként mérhető a biológiai lebontás végén (a degradáció-idő görbe telítési szakasza).

Számítsuk ki a maradó ^{14}C fázismegoszlását a kiválasztott, 0,22–0,45 μm-es szűrőkön átszűrt mintákban. A szűrő anyaga nem adszorbeálhat jelentősebb mennyiségű vizsgálati anyagot (a polikarbonát filterek megfelelőek lehetnek). Ha a vizsgálati anyag szorpciója a filteren túl nagy mértékű (a kísérletet megelőzően tesztelni kell), használatát mellőzzük, helyette nagysebességű centrifugálás (2 000 g; 10 perc) használható.

A szűrlettel vagy a centrifugált mintával járjunk el a 3. melléklet szűretlen mintákra leírt módszere szerint. Oldjuk fel a membránfiltert a megfelelő szcintillációs folyadékban, és mérjük a beütésszámot a szokott módon, a kioltás korrigálására normálisan a külső standard-arány módszert, vagy mintaoxidálást használva. Ha centrifugálást használtunk, reszuszpendáljuk a részecskéket tartalmazó fázist 1–2 ml desztillált vízben, és juttassuk szcintillációs üvegcsébe. Ezt követően mossuk még kétszer, 1–1 ml desztillált vízzel, és a mosóvizet is juttassuk az üvegcsébe. Ha szükséges, a folyadékszcintillációs méréshez a szuszpenzió gélbe is ágyazható.

▼M1

2. melléklet

Félfolyamatos eljárás

A nehezen bomló anyagok megfelelő lebontásának eléréséhez meghosszabbított, több hónapos inkubáció is szükséges lehet. A tesztidőszak hossza normál esetben nem haladhatja meg a 60 napot, hacsak az eredeti vízminta jellemzőinek fenntartása nem a tesztszuszpenzió lecserélésével történik. Mindamellett a tesztperiódust ki lehet terjeszteni maximum 90 napra a tesztszuszpenzió lecserélése nélkül is, ha a vizsgálati anyag lebontása az első 60 napon belül megkezdődött.

Hosszú idejű inkubáció során a mikrobiális populáció diverzitása különböző anyagvesztési mechanizmusok, valamint a vízminta alapvető ásványisó-tartalmának és elsődleges széntartalmú szubsztrátjainak kimerülése miatt lecsökkenhet. A lassan bomló anyagok esetében a lebontási sebesség pontos meghatározásához ezért a félfolyamatos vizsgálat alkalmazása ajánlott. Ha az előzetes tapasztalatok alapján a vizsgálati anyag 20 %-os lebontásának eléréséhez egy három hónapos inkubáció várható, a vizsgálatot a félfolyamatos eljárással kell elősegíteni. A másik megoldás az lehet, hogy ha a vizsgálati anyag lebontása egymenetes körülmények között körülbelül 60 nap alatt nem történik meg, akkor a normál egymenetes vizsgálatot a félfolyamatos vizsgálatra váltjuk. A félfolyamatos eljárás is leállítható és egymenetes kísérletként folytatható, ha jellemző lebontás történik (pl. > 20 %).

A félfolyamatos vizsgálatban a vizsgálati szuszpenzió térfogatának körülbelül harmadát kéthetente a kiindulási koncentrációra beállított, vizsgálati anyaggal ellátott, frissen vett vízzel cseréljük le. Ha a választható lebegő üledék vizsgálatot hajtjuk végre, akkor üledéket adunk ugyanígy cserevízhez, a kezdeti koncentrációt (0,01 és 1 g/l között) hozva létre. A lebegő üledék vizsgálat kivitelezése során fontos, hogy a rendszert teljesen felszuszpendáljuk a vízcseréhez is, valamint hogy a tartózkodási időnek azonosnak kell lennie a szilárd anyagokra és a vízre, mivel egyébként a kívánt hasonlóságot a homogén vizes rendszerekkel elveszthetjük. Ezen okok miatt a félfolyamatos eljárás alkalmazása során a lebegő üledék kezdeti koncentrációjának a megadott intervallum alsó tartományába kell esnie.

A vizsgálati anyag előírt hozzáadásába beleértendő, hogy a vizsgálati anyag kezdeti koncentrációját a tesztszuszpenzió részleges megújításával nem lépjük túl, ennélfogva az adaptáció jelensége, ami a vizsgálati anyag magas koncentrációinál gyakran fellép, kiküszöbölődik. Mivel az eljárás mind re-inokulációval, mind a kimerülő ásványi anyagok és elsődleges szubsztrátok pótlásával jár, a vizsgálat hossza alapjában véve korlátlanul megnyújtható. Fontos megjegyezni, hogy félfolyamatos eljárás alkalmazása esetén a vizsgálati anyag maradó koncentrációját korrigálni kell az egyes cserék során hozzáadott és eltávolított vizsgálati anyag-mennyiséggel. A teljes és az oldott vizsgálati anyag-koncentráció a csekély mértékben adszorbeálódó vegyületek esetében felcserélhető egymással. A szorpció az adott körülmények között (0,1–1 g szilárd anyag/l) a log K_{ow} < 3 értékű (neutrális, lipofil vegyületekre érvényes) anyagokra vonatkozóan elhanyagolható (< 5 %). Ezt a következő számítási példán keresztül mutatjuk be. 0,1 g/l szilárd anyag durván 10 mg szénnek felel meg literenként (szénfrakció, f_C = 0,01). Ha feltételezzük, hogy:

Log K_{ow} (vizsgálati anyag) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

Megoszlási koefficiens, $K_d = f_C \times K_{oc}$

akkor a teljes koncentráció oldott frakciója (C-víz (C_w)/C-teljes (C_t):

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

3. melléklet

A $^{14}CO_2$ meghatározása

Indirekt $^{14}CO_2$ meghatározás

Rutinmérésekhez az indirekt módszer általában a legkevésbé időigényes és legpontosabb módszer, ha a vizsgálati anyag nem illékony és nem alakul át illékony transzformációs termékekké. Egyszerűen juttassuk a szűretlen mintákat, pl. 5 ml térfogatú szcintillációs üvegcsékbe. Kezdetben a megfelelő aktivitás a mintákban 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq), és a minimum kezdeti aktivitás kb. 1 000 dpm. Az egy-két csepp tömény H_3PO_4-val vagy HCl-val pH 2–3-ra történő savanyítás után a CO_2-t ki kell űzni a rendszerből. Ez kb. fél-egy órán át tartó levegő-átbuborékoltatással történhet. Más megoldásként az üvegcsék intenzíven rázathatók 1–2 óráig (például mikrotányéros rázón), vagy óvatosabb rázatás mellett egy éjszakán keresztül. A CO_2 kiűzésének hatásfokát ellenőrizni kell (a levegőztetés vagy a rázatási periódus meghosszabbításával). Ezután a vizes minták beütésszámának meghatározására alkalmas szcintillációs folyadékot adunk a rendszerbe, majd a minta vortexes homogenizálása után a radioaktivitás folyadék szcintillációs méréssel, a vizsgálat vakok (F_B) háttéraktivitásának kivonásával meghatározható. Hacsak a tesztvíz nem nagyon színes, vagy nem tartalmaz nagy koncentrációban részecskéket, a minták rendes körülmények között egységes kioltást mutatnak, és elegendő külső standard alkalmazásával kioltási korrekciót végezni. Ha a tesztvíz nagyon színes, a kioltási korrekciót belső standard hozzáadása révén szükséges kalkulálni. Ha részecske-koncentráció magas, nem mindig lehetséges homogén oldathoz vagy gélhez jutni, vagy nagy lehet a kioltás eltérése a minták között. Ilyen esetekben az alábbiakban bemutatott tesztzagy-mérési módszert kell alkalmazni. Ha a vizsgálat mint lebegő üledék vizsgálatot végezzük el, a $^{14}CO_2$ mérést indirekt módon kell elvégezni egy homogén 10 ml-es tesztvíz/szuszpenzió mintából, ahol a fázisokat megfelelő sebességű (pl. 40 000 m/s^2-en 15 percig) centrifugálással szeparáltuk. Ezután a vizes fázissal a fentiek szerint járunk el. A ^{14}C aktivitás mérése a lebegő részecskéket tartalmazó fázisból (POA) úgy történik, hogy az üledéket kevés vízben reszuszpendáljuk, majd szcintillációs üvegcsékbe juttatjuk és szcintillációs folyadékot adunk hozzá, hogy gél jöjjön létre (erre a célra speciális szcintillációs folyadékok szerezhetőek be). A részecskék természetétől (pl. szervesanyag-tartalmuk) függően megvalósítható lehet a minták szövet-szolubilizálóval történő, egy éjszakán keresztüli emésztése, majd a szcintillációs folyadék hozzáadását megelőző vortexes homogenizálása. Más megoldásként a POA oxigénfeleslegben, mintaoxidálóval történő hevítés segítségével is meghatározható. A mérés során mindig használni kell belső standardokat, valamint szükséges lehet kioltási korrekciókat végrehajtani belső standard hozzáadásával, minden egyes egyedi mintára vonatkozóan.

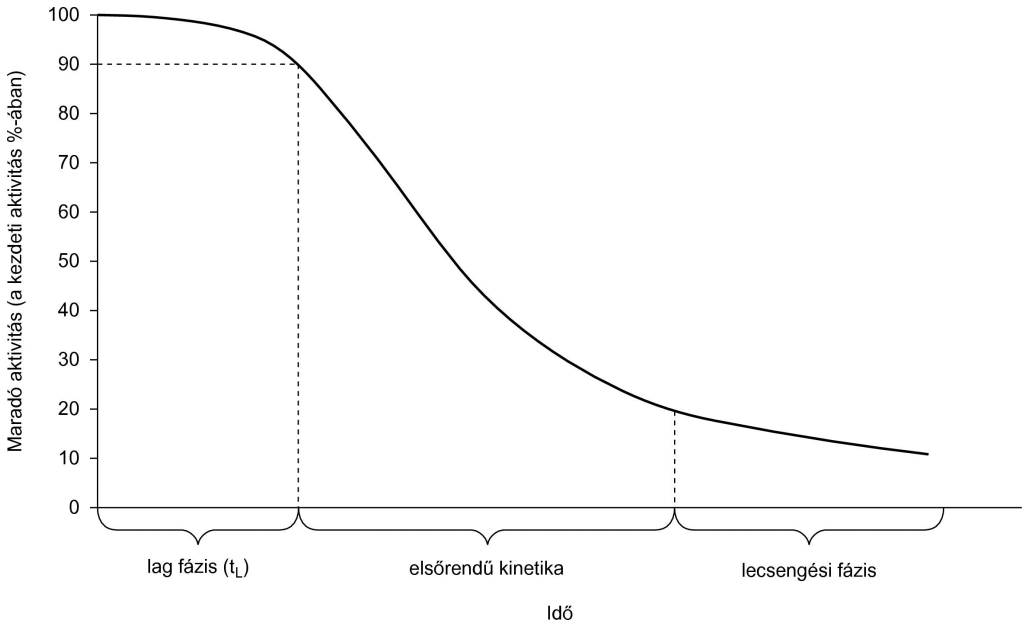
Direkt $^{14}CO_2$ meghatározás

Ha a képződő $^{14}CO_2$-t közvetlenül mérjük, akkor a vizsgálat kezdetekor több lombikot kell beállítani, majd begyűjtéskor a vzsgálati lombikokat pH 2–3 közé kell savanyítani minden egyes mérési pontnál, és a $^{14}CO_2$-t fel kell fogni egy (a vizsgálat kezdetekor minden egyes vizsgálati lombikba behelyezett) belső vagy külső abszorberrel. Az abszorbeáló anyag lehet lúg (pl. 1 N NaOH oldat, vagy NaOH golyó), etanolamin vagy egy etanolamin-alapú, kereskedelmi forgalomból beszerezhető abszorber. A $^{14}CO_2$ direkt méréséhez a lombikokat le kell zárni pl. butilgumi szeptummal.

▼M1

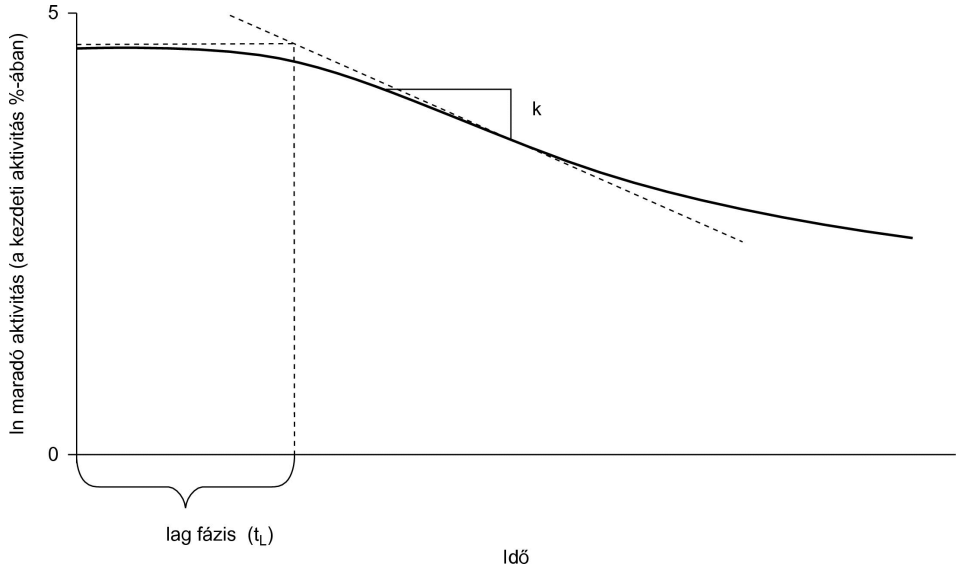
1a. ábra

Példa az adatok grafikus ábrázolására (maradó aktivitás az idő függvényében)



1b. ábra

Példa az adatok fél-logaritmikus ábrázolására (ln maradó aktivitás az idő függvényében)



▼M1

C.26. *LEMNA* SP. NÖVEKEDÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

A módszer egyenértékű az OECD TG 221 (2006) jelű vizsgálatával (1). Az európai uniós hatóságok széles körben egyetértenek abban, hogy az erősen színezett anyagok esetében a Lemna-vizsgálat megfelelő módon helyettesíti az algákon végzett vizsgálatot (2)(3).

1.1. BEVEZETÉS

Ez a vizsgálati módszer különböző anyagok által a *Lemna* (békalencse) nemzetséghez tartozó édesvízi növényekre kifejtett toxikus hatás meghatározására szolgál. A módszer meglévő iránymutatásokon (4)-(5)(6)(7)(8)(9) alapul, de azoktól több kulcsfontosságú kérdés tekintetében, a legfrissebb kutatási eredmények és szakmai egyeztetések figyelembevétele érdekében eltér. A javasolt módszer validálása nemzetközi körvizsgálattal (10) történt.

A vizsgálati módszer *Lemna gibba* és *Lemna minor* felhasználásával végzendő toxicitási vizsgálatot ír le; mindkét fajon számos vizsgálatot végeztek, és a fent említett szabványosított vizsgálatok is ezekre vonatkoznak. A *Lemna* nemzetség rendszertana nehezen leírható, amit tovább bonyolít a létező fenotípusok nagy száma. Bár a *Lemna* nemzetségben a genetikai eltérések a toxikus anyagokkal szembeni viselkedés változatosságát eredményezhetik, erről a változóról egyelőre kevés adat áll rendelkezésre ahhoz, hogy az ismertetendő eljárás keretében konkrét klón használatát ajánlhassunk. Megjegyzendő, hogy a vizsgálat nem steril körülmények között zajlik, de az eljárás egyes szakaszaiban erőfeszítéseket kell tenni annak érdekében, hogy más élő szervezetek zavaró hatása a lehető legkisebb legyen.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a vizsgálati oldat cseréjével végzett (félstatikus és átfolyásos) és a vizsgálati oldat cseréje nélkül végzett (statikus) vizsgálatokat. A vizsgálat céljától és a jogszabályi követelményektől függően a félstatikus és az átfolyásos vizsgálat alkalmazását például az oldatból gyorsan eltávozó (illékony, fény hatására lebomló, kicsapódó vagy biológiailag lebomló) anyagok esetén érdemes megfontolni. További iránymutatást a (11) irodalom tartalmaz.

1.2. FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Az eljárás alkalmazásában:

Élőanyag-tömeg: a populációban lévő élő anyag száraz tömege. A vizsgálat során az élőanyag-tömeg helyett jellemzően helyettesítő mennyiségeket, például levélszámot vagy levélterületet mérünk, és ezekre a helyettesítő mennyiségekre is „élőanyag-tömegként” hivatkozunk.

Klorózis: a levélszövet sárgulása.

Klón: egy adott egyedből ivartalan szaporodással létrejövő szervezet vagy sejt. Az azonos klónhoz tartozó egyedek tehát genetikai szempontból azonosak.

Telep: egymáshoz kapcsolódó anya- és leánylevelek (általában 2–4) összessége. Néha növénynek is nevezik.

▼M1

EC_x: a vizsgálati oldatban feloldott vizsgált anyag azon koncentrációja, amely adott expozíciós idő alatt a *Lemna* növekedésének x %-os (például 50 %-os) csökkenését okozza (az expozíciós időt külön meg kell adni, ha eltér a vizsgálat rendes vagy teljes időtartamától). Hogy egyértelmű legyen, hogy az EC értékét a növekedési sebességből vagy a kihozatalból nyertük-e, növekedési sebesség esetén „E_rC”-t, kihozatal esetén „E_yC”-t írunk, majd ezt követően megadjuk a mérési változót, például: „E_rC (levélszám)”.

Átfolyásos vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot folyamatosan cseréljük.

Levél: a békalencse növény egyetlen különálló, „levélszerű” struktúrája. Ez a szaporodásra képes legkisebb egység (egyed).

Púposság: púpos vagy duzzadt megjelenést mutató levelek.

Növekedés: a vizsgálat ideje alatt a mérési változóban (például a levélszámban, a száraz tömegben, a nedves tömegben vagy a levélterületben) bekövetkező növekedés.

Növekedési sebesség (átlagos fajlagos növekedési sebesség): az élőanyag-tömeg logaritmikus növekedése az expozíciós idő alatt.

Észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC): az a legkisebb vizsgált koncentráció, amely mellett adott expozíciós idő alatt az anyag statisztikailag szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkenti a növekedést a kontrolltenyészethez képest. Az LOEC felett ugyanakkor minden koncentrációnak legalább akkora káros hatást kell eredményeznie, mint amelyet az LOEC okoz. Ha ez a két feltétel nem elégíthető ki, az LOEC (és így az NOEC) megválasztását részletesen indokolni kell.

Mérési változók: minden olyan változó, amelyet a vizsgálat végpontjának egy vagy több különböző hatásváltozó segítségével történő kifejezése érdekében mérünk. Ebben az eljárásban mérési változó a levélszám, a levélterület, a nedves tömeg és a száraz tömeg.

Monokultúra: egyetlen növényfajból álló tenyészet.

Nekrózis: elhalt (például fehér vagy vízzel átitatott) levélszövet.

Észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC): az a vizsgált koncentráció, amely közvetlenül az LOEC alatt helyezkedik el.

Fenotípus: az élőlény észlelhető, génjei és a környezet kölcsönhatása által meghatározott jellemzői.

Hatásváltozók: a toxikus hatás becslésére szolgáló, az élőanyag-tömeget leíró mérési változókból különböző számítási módszerekkel származtatott változók. Ebben az eljárásban hatásváltozó a növekedési sebesség és a kihozatal, amelyeket a levélszámból, a levélterületből, a nedves tömegből és a száraz tömegből mint mérési változókból származtatunk.

Félstatikus (oldatcserés) vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot bizonyos időközönként lecseréljük.

Statikus vizsgálat: olyan vizsgálat, amelynek során a vizsgálati oldatot nem cseréljük le.

▼M1

A vizsgálat végpontja: az az általános jellemző, amelyre a vizsgálat irányul, és amely a vizsgált vegyület hatására a kontrolltenyészethez képest megváltozik. Ebben az eljárásban a vizsgálat végpontja a növekedésgátlás, amely különböző, egy vagy több mérési változóból származtatott hatásváltozók segítségével fejezhető ki.

Vizsgálati oldat: az a teljes, szintetikus tápoldat, amelyben a vizsgált növények a vizsgált anyag jelenlétében növekednek. A vizsgált anyag általában oldott formában van jelen a vizsgálati oldatban.

Kihozatal: az élőanyag-tömeget leíró mérési változó értéke az expozíciós idő végén, mínusz ugyanezen változó értéke az expozíciós idő kezdetén.

1.3. A VIZSGÁLAT ELVE

Exponenciálisan növekedő, a *Lemna* nemzetséghez tartozó növénytenyészeteket monokultúraként hét napig növekedni hagyunk a vizsgált anyag különböző koncentrációinak jelenlétében. A vizsgálat célja: a vizsgálat időtartama alatt a vizsgált anyag vegetatív növekedésre gyakorolt hatásának számszerű kifejezése alkalmasan megválasztott mérési változók értékelése alapján. Elsődleges mérési változóként a levélszám szolgál. Emellett legalább még egy mérési változót (a levelek összterületét, a száraz tömeget vagy a nedves tömeget) is mérni kell, mert bizonyos anyagok más mérési változókat sokkal inkább befolyásolnak, mint a levélszámot. A vizsgált anyag hatásainak számszerű kifejezése érdekében a vizsgálati oldatban bekövetkező növekedést összehasonlítjuk a kontrolltenyészetben bekövetkező növekedéssel, és meghatározzuk azt az EC_x (például EC_{50}) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.

A vizsgálat végpontjaként a növekedésgátlás szolgál, amelyet a mérési változóban az expozíciós idő alatt bekövetkező logaritmikus növekedéssel (az átlagos fajlagos növekedési sebességgel) fejezünk ki. A vizsgálati oldatokra egyenként kiszámított átlagos fajlagos növekedési sebességek alapján meghatározzuk azt az E_rC_x (például E_rC_{50}) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.

Az eljárás másik hatásváltozója a kihozatal, amelyre bizonyos országok esetében a jogszabályi követelmények teljesítéséhez lehet szükség. A kihozatal a mérési változóknak az expozíciós idő végén érvényes értéke és az expozíciós idő kezdetén érvényes értéke közötti különbséget jelenti. A vizsgálati oldatokra egyenként kiszámított kihozatalok alapján meghatározzuk azt az E_yC_x (például E_yC_{50}) koncentrációt, amely egy adott x %-os (például 50 %-os) növekedésgátlást idéz elő.

Statisztikai eljárással meghatározható továbbá az észlelhető hatást okozó legkisebb koncentráció (LOEC) és az észlelhető hatást még nem okozó koncentráció (NOEC) értéke is.

1.4. A VIZSGÁLT ANYAG ADATAI

Rendelkezésre kell állnia egy olyan analitikai eljárásnak, amellyel a vizsgálati oldatban lévő anyag mennyisége kellő pontossággal meghatározható.

▼M1

A vizsgálati körülmények rögzítése érdekében célszerű lehet tájékozódni többek között a vizsgált anyag szerkezeti képletéről, tisztaságáról, vízben való oldhatóságáról, vízben és fény hatására tanúsított stabilitásáról, pK_a és K_{ow} értékéről, gőznyomásáról és biológiai lebonthatóságáról. A vízben való oldhatóságból és a gőznyomásból meghatározható a Henry-állandó, amely megmutatja, mennyire kell arra számítani, hogy a vizsgálat során a vizsgált anyag jelentős mennyiségben eltávozik. Ennek alapján eldönthető, kell-e külön gondoskodni az így adódó veszteségek ellensúlyozásáról. Ha a vizsgált anyag oldhatóságára és stabilitására vonatkozó információk bizonytalanok, célszerű ezeket a vizsgálat körülményei, azaz a vizsgálati oldat, hőmérséklet és fényviszonyok mellett meghatározni.

Ha különösen fontos a vizsgálati oldat pH-értékének szabályozása, például könnyen hidrolizálódó fémek vagy egyéb anyagok vizsgálata esetén, akkor ajánlatos a vizsgálati oldatot pufferrel kiegészíteni (lásd az 1.7.4. szakasz első bekezdését). A (11) irodalom további iránymutatást ad olyan anyagok vizsgálatához, amelyek fizikai-kémiai jellegzetességeiknél fogva nehezen vizsgálhatók.

1.5. REFERENCIAANYAG

A vizsgálati eljárás referenciaanyag(ok), mint például a nemzetközi körvizsgálatban (10) alkalmazott 3,5-diklór-fenol segítségével ellenőrizhető. Referenciaanyaggal legalább évente kétszer (ha ennél ritkábban végzünk vizsgálatot, akkor a vizsgált anyag toxicitásának meghatározásával párhuzamosan mindig) ajánlott vizsgálatot végezni.

1.6. A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

A vizsgálat akkor érvényes, ha a kontrolltenyészetben a levélszám megkettőződési ideje 2,5 napnál (60 óránál) kisebb, ami hét nap alatt körülbelül hétszeres növekedést, illetve 0,275 1/nap átlagos fajlagos növekedési sebességet jelent. A jelen módszerben ismertetett vizsgálati oldat és vizsgálati körülmények alkalmazása esetén ez a feltétel statikus vizsgálattal kielégíthető (8). Várható, hogy a feltétel félstatikus és átfolyásos vizsgálat esetén is kielégíthető. A megkettőződési idő számítását a 2.1. szakasz ismerteti.

1.7. A MÓDSZER LEÍRÁSA

1.7.1. **Eszközök**

Minden, a vizsgálati oldattal érintkező eszköz üvegből vagy más, kémiailag semleges anyagból legyen. A tenyésztés és a vizsgálat céljára felhasznált üvegeszközök sterilek legyenek, és meg kell őket tisztítani minden olyan kémiai szennyeződéstől, amely a vizsgálati oldatba bemosódhatna. A vizsgálati edények legyenek kellően szélesek ahhoz, hogy a kontrolltenyészetekben a különböző telepek levelei a vizsgálat végéig átfedésmentesen növekedhessenek. Nem jelent problémát, ha a gyökér az edény alját éri, de ajánlatos legalább 20 mm mélységű és legalább 100 ml térfogatú vizsgálati edényeket alkalmazni. Ha ezek a feltételek teljesülnek, a vizsgálati edények megválasztása nem kritikus. A korábbiakban a kellő méretű üveg főzőpoharak, kristályosító tégelyek és üveg Petri-csészék egyaránt alkalmasnak bizonyultak. A vizsgálati edényeket a párolgás és a véletlen szennyeződések megakadályozása érdekében le kell fedni oly módon, hogy a levegő cserélődhessen. A vizsgálati edény, különösen pedig a fedő lehetőleg ne keltsen árnyékot vagy okozza a fény spektrális jellemzőinek módosulását.

▼M1

A tenyészeteket és a vizsgálati edényeket ne tartsuk együtt. A legjobb megoldás, ha külön környezeti növesztőkamrákat, inkubátorokat vagy helyiségeket veszünk igénybe. A fényviszonyok és a hőmérsékletek szabályozhatók legyenek, és állandó szinten kell őket tartani (lásd az 1.7.8. szakaszt).

1.7.2. **Vizsgált szervezet**

A vizsgálat során *Lemna gibba* vagy *Lemna minor* egyedeket kell használni. A toxicitási vizsgálatokhoz korábban már felhasznált békalencsefajok rövid leírását az 1. függelék adja meg. A növényanyag törzsgyűjteményből, más laboratóriumból vagy a terepről nyerhető. A terepről származó növényanyag tenyészetét felhasználás előtt legalább nyolc hétig a vizsgálat során alkalmazandóval megegyező tápoldatban kell tartani. A tenyészet kialakításához a növényanyagot nyilvánvaló szennyeződéstől mentes helyszínről kell begyűjteni. A más laboratóriumból vagy törzsgyűjteményből származó növényanyagot legalább három hétig kell hasonló körülmények között tartani. A mérési jegyzőkönyvben mindig rögzíteni kell a növényanyag eredetét és a vizsgálathoz felhasznált fajt és klónt (ha ismert).

Olyan monokultúrát használjunk, amelyet más élő szervezetek, például algák vagy egysejtűek szemmel érzékelhető módon nem szennyeznek. Az egészséges *L. minor* növények kettő–öt levélből állnak, míg a *L. gibba* egészséges telepei akár hét levelet is tartalmazhatnak.

A vizsgálat során felhasznált növények minősége és egységessége jelentősen befolyásolja a vizsgálat eredményeit, ezért megválasztásuk során kellő gondossággal kell eljárni. Fiatal, gyorsan növekvő, látható sérüléstől és fakulástól (klorózistól) mentes egyedeket kell felhasználni. A jó minőségű tenyészetet az jellemzi, hogy nagy arányban tartalmaz legalább két levélből álló telepeket. A sok egyedülálló levél kedvezőtlen környezeti körülményekre, például tápanyaghiányra utal, ezért ilyen tenyészetekből vett egyedeket nem szabad a vizsgálatban felhasználni.

1.7.3. **Tenyésztés**

Az átoltás gyakoriságának csökkentése érdekében (például ha egy ideig előreláthatóan nem végzünk *Lemna*-vizsgálatokat) a tenyészet csökkentett fényviszonyok mellett és hőmérsékleten (4–10 °C) tartható. A tenyésztés körülményeit részletesen a 2. függelék ismerteti. Ha olyan nyilvánvaló jeleket figyelünk meg, amelyek algák vagy más élő szervezetek okozta szennyeződésre utalnak, akkor a *Lemna*-levelek egy részét felületi sterilizálásnak kell alávetni, majd másik oldatba kell áthelyezni (lásd a 2. függeléket), a fennmaradó szennyezett tenyészetet pedig hulladékként el kell távolítani.

A vizsgálatok előtt legalább hét nappal elegendő mennyiségű telepet csíramentesen friss, steril oldatba kell áthelyezni, majd hét–tíz napon át a vizsgálatnak megfelelő körülmények között tartani.

1.7.4. **Vizsgálati oldat**

Lemna minor és *Lemna gibba* esetén eltérő oldatot ajánlott alkalmazni az alábbiak szerint. Kellő körültekintéssel meg kell fontolni pH-puffer alkalmazását a vizsgálati oldatban (MOPS (4-morfolinpropánszulfonsav, CAS-szám: 1132–61–2; EINECS-szám: 214–478–5 a *L. minor* és $NaHCO_3$ a *L. gibba* vizsgálati oldatában), ha gyanítható, hogy az oldat reakcióba léphet a vizsgált anyaggal és befolyásolhatja a toxikus hatást. Az érvényességi kritériumok betartása mellett Steinberg-féle tápoldat (12) is alkalmazható.

▼M1

A *L. minor* tenyésztése és vizsgálata során a svéd szabvány (SIS) szerinti *Lemna*-tápoldat módosított változatát ajánlott alkalmazni. E tápoldat összetételét a 3. függelék ismerteti.

A *L. gibba* tenyésztése és vizsgálata során a 3. függelék szerinti 20X–AAP tápoldatot ajánlott alkalmazni.

A 3. függelék szerinti Steinberg-féle tápoldat ugyancsak alkalmas *L. minor* esetén, és az érvényességi kritériumok betartása mellett *L. gibba* esetén is alkalmazható.

1.7.5. **Vizsgálati oldatok**

A vizsgálati oldatokat általában törzsoldat hígításával állítjuk elő. A vizsgált anyag törzsoldatait általában úgy készítjük, hogy az anyagot tápoldatban feloldjuk.

A vizsgált anyag legnagyobb vizsgálati koncentrációja általában ne haladja meg az anyag vizsgálati körülmények között érvényes vízben való oldhatóságát. Megjegyzendő azonban, hogy a *Lemna* nemzetség egyedei a víz felszínén úsznak, ezért olyan anyagok hatásának is ki lehetnek téve, amelyek jellemzően a víz és a levegő határfelületén fordulnak elő (például vízben nehezen oldódó vagy víztaszító anyagok, felületaktív anyagok). Ilyenkor az expozíció nem a vizsgálati oldatban lévő anyag következtében áll elő, és a vizsgálati koncentráció a vizsgált anyag jellemzőitől függően meghaladhatja a vízben való oldhatóságot. Vízben kismértékben oldódó vizsgált anyag esetén szükséges lehet szerves oldó- vagy diszpergálószer alkalmazásával nagy koncentrációjú törzsoldatot vagy -diszperziót készíteni annak érdekében, hogy könnyebb legyen a vizsgálati anyagból a pontos mennyiséget a vizsgálati oldathoz adagolni, és könnyebben végbemenjen az oldódás vagy a diszperzióképződés. Ilyen anyag alkalmazását lehetőség szerint kerülni kell. A segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása nem járhat fitotoxikus hatással. A széles körben alkalmazott oldószerek közül például az aceton vagy a dimetilformamid 100 µl/l koncentrációig nem okoz fitotoxikus hatást. Az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer végső koncentrációja – amelyet a mérési jegyzőkönyvben rögzíteni kell – a lehető legkisebb legyen (legfeljebb 100 µl/l), és az oldó- vagy diszpergálószert a vizsgálathoz és a kontrolltenyészet esetében azonos koncentrációban kell alkalmazni. A (11) irodalom bővebb iránymutatást ad a diszpergálószerekre vonatkozóan.

1.7.6. **Vizsgálati csoportok és kontrollcsoportok**

A vizsgált anyag *Lemna*-fajokra gyakorolt toxikus hatásának előzetes ismerete alapján, amely származhat például koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatból, megválaszthatók az alkalmas vizsgálati koncentrációk. A végleges toxicitási vizsgálatnak általában öt, egymással mértani sorozatot alkotó vizsgálati koncentrációra kell kiterjednie. A koncentrációk sorozatának hányadosa általában ne legyen 3,2-nél nagyobb, de lapos koncentráció–hatás görbe esetén ennél nagyobb érték lehet indokolt. Ötnél kevesebb koncentráció alkalmazását indokolni kell. Minden koncentrációval legalább három párhuzamos tenyészetet kell megvizsgálni.

A vizsgálati koncentrációk tartományának kijelölése során (akár a koncentrációtartomány-meghatározási vizsgálatot, akár a végleges vizsgálatot megelőzően) a következőket célszerű megfontolni.

▼M1

— EC_x meghatározása esetén a kellő konfidenciaszint biztosítása érdekében a vizsgálati koncentrációknak közre kell fogniuk az EC_x értékét. Ha például az EC_{50} értéket kívánjuk meghatározni, akkor a legnagyobb vizsgálati koncentrációnak nagyobbnak kell lennie EC_{50}-nél. Ha az EC_{50} kívül esik a vizsgálati koncentrációk tartományán, akkor a kiadódó konfidenciaintervallumok szélesek lesznek, és előfordulhat, hogy nem végezhető el a modell statisztikai illesztése.

— LOEC és/vagy NOEC meghatározása esetén a legkisebb vizsgálati koncentráció legyen elegendően kicsiny ahhoz, hogy a növekedési sebesség ne legyen jelentősen kisebb, mint a kontrollcsoportban. A legnagyobb koncentráció ugyanakkor legyen elegendően nagy ahhoz, hogy a növekedési sebesség jelentősen kisebb legyen, mint a kontrollcsoportban. Ha ez nem teljesül, a vizsgálatot más koncentrációtartománnyal meg kell ismételni (kivéve akkor, ha a legnagyobb koncentráció megegyezik az oldhatósági határral vagy az előírt maximális határkoncentrációval, például 100 mg/l-rel).

Az egyes vizsgálatok mellett kontrolltenyészeteket is kell vizsgálni a vizsgálati edényekével megegyező táptalaj, levél- és telepszám, környezeti körülmények és eljárások alkalmazásával, de a vizsgált anyag nélkül. Segédoldószer vagy -diszpergálószer alkalmazása esetén egy további kontrolltenyészet is szükséges, amelyben az oldó- vagy diszpergálószer azonos koncentrációban van jelen, mint a vizsgálati edényekben. Legalább a koncentrációnként alkalmazott edényszámmal megegyező, ideális esetben kétszer annyi párhuzamos kontrolltenyészetet (illetőleg szükség szerint oldószeres edényt) kell alkalmazni.

Ha nem kívánjuk meghatározni az NOEC értékét, a vizsgálati terv módosítható oly módon, hogy több koncentrációt, de koncentrációnként kevesebb párhuzamos tenyészetet tartalmazzon. A párhuzamos kontrolltenyészetek száma azonban ilyenkor is legalább három legyen.

1.7.7. **Expozíció**

Kettő–négy látható levélből álló telepeket a kiindulási tenyészetből csíramentesen a kísérleti edényekbe helyezünk, véletlenszerűen elosztva. A kísérleti edényekbe egyenként összesen 9–12 levél kerüljön. Minden kísérleti edényben azonos számú levél és telep legyen. A módszer alkalmazása és a körvizsgálat során szerzett tapasztalatok azt mutatják, hogy a készítmények közötti, a növekedési sebesség alapján meghatározott növekedésgátlás 4–7 %-os értékének (a kihozatal alapján meghatározott növekedésgátlás 10–15 %-os értékének) megfelelő nagyságú növekedéskülönbség kimutatásához elegendő, ha készítményenként három párhuzamos tenyészetet és edényenként 9–12 kiindulási levelet alkalmazunk (10).

Az inkubátorban a kísérleti edényeket véletlenszerű elrendezésben kell elhelyezni annak érdekében, hogy a fényerősség és a hőmérséklet térbeli változatossága minél kisebb hatást gyakoroljon a vizsgálatokra. A megfigyelések végzésekor (vagy gyakrabban) az edényeket véletlenszerűen vagy blokkonkénti kiosztási terv alapján át kell rendezni.

▼M1

Ha az előzetesen elvégzett stabilitásvizsgálatok azt jelzik, hogy a vizsgált anyag koncentrációja a vizsgálat időtartama (7 nap) alatt nem tartható fenn (azaz a mért koncentráció a kezdeti mért koncentráció 80 %-a alá csökken), akkor félstatikus vizsgálatot ajánlatos végezni. Ennek keretében a telepeket a vizsgálat során legalább két alkalommal (a 3. és az 5. napon) friss vizsgálati és kontrolloldatokba kell helyezni. A friss oldatba helyezés gyakorisága a vizsgált anyag stabilitásától függ; nagymértékben instabil vagy illékony anyagok esetén a közel állandó koncentráció fenntartása gyakoribb oldatcserét igényelhet. Bizonyos esetekben átfolyásos vizsgálatot célszerű végezni (11)(13).

Ez az eljárás nem tartalmazza a levélre történő felvitellel (permetezéssel) megvalósuló expozíciót; erről lásd a (14) irodalmat.

1.7.8. **Inkubációs körülmények**

Folyamatos meleg- vagy hidegfehér fluoreszcens megvilágítást alkalmazzunk oly módon, hogy a fotoszintetikusan aktív sugárzásban (400–700 nm), a fényforrástól a *Lemna*-levelekkel megegyező távolságban lévő pontokban mért fényintenzitás a 85–135 $\mu E/m^2s$ tartományban előzetesen felvett értéknek feleljen meg (ez 6 500–10 000 lux értéket jelent). A vizsgálat területén a fényintenzitás az előzetesen felvett értéktől legfeljebb ±15 %-kal térhet el. A fényerősség érzékelésére és mérésére szolgáló módszer, különösen pedig a fényérzékelő befolyásolja a mért értéket. A gömbérzékelők (amelyek a mérési sík alatt és felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) és a „koszinuszos” érzékelők (amelyek csak a mérési sík felett tetszőleges irányból érkező fény mérésére alkalmasak) előnyben részesítendők az egytengelyű érzékelőkkel szemben, mert a jelen módszerben előírt többpontos fényforrás esetén nagyobb értékeket szolgáltatnak.

A vizsgálati edényekben a hőmérséklet 24 ± 2 °C legyen. A vizsgálat során a kontrolltenyészet tápoldatának pH-értéke nem növekedhet 1,5-nél nagyobb mértékben. Az 1,5-nél nagyobb eltérés ugyanakkor nem teszi érvénytelenné a vizsgálatot, ha kimutatható, hogy az érvényességi feltételek teljesülnek. A pH-érték eltolódása egyes különleges esetekben, például instabil anyag vagy fém vizsgálata esetén fokozott körültekintést tesz szükségessé. További iránymutatást a (11) irodalom tartalmaz.

1.7.9. **A vizsgálat időtartama**

A vizsgálat a növények vizsgálati edényekbe helyezése után 7 nappal fejeződik be.

1.7.10. **Mérések és analitikai vizsgálatok**

A vizsgálat kezdetén meg kell számlálni a vizsgálati edényekben lévő leveleket, és az értéket fel kell jegyezni a mérési jegyzőkönyvben; a számlálás során ügyelni kell arra, hogy a kiálló, vizuálisan elkülönülő leveleket vegyük figyelembe. A szabályszerűnek vagy rendellenesnek tűnő levelek számát a vizsgálat kezdetén, az expozíció időtartama alatt legalább háromnaponta (azaz a hét nap során legalább kétszer), valamint a vizsgálat végén kell meghatározni. Fel kell jegyezni a növények fejlődésében beálló változásokat, például a levélméret vagy a megjelenés változásait, a nekrózisra, a klorózisra vagy a púposságra utaló jeleket, a telepek felbomlását vagy az úszóképesség megszűnését, a gyökerek hosszának vagy megjelenésének megváltozását. Fel kell továbbá jegyezni a vizsgálati oldat jellegzetességeit (például oldatlan anyag jelenléte, algaképződés a vizsgálati edényben) is.

▼M1

A vizsgálat során a levélszám mellett a vizsgált anyagnak a következő mérési változók közül legalább egy továbbira gyakorolt hatását is meg kell határozni:

i. a levelek összterülete;

ii. száraz tömeg;

iii. nedves tömeg.

A levelek összterülete azért előnyös mérési változó, mert a vizsgálat kezdetén, folyamán és végén minden vizsgálati és kontrolltenyészetre külön-külön meghatározható. A száraz és a nedves tömeget a vizsgálat elején a vizsgálatban alkalmazandó kiindulási tenyészet szempontjából reprezentatív mintán, majd a vizsgálat végén az egyes vizsgálati és kontrolltenyészetek növényanyagán kell meghatározni. Ha a levélterületet nem mérjük, a száraz tömeg mérését előnyben kell részesíteni a nedves tömeg mérésével szemben.

A levelek összterülete, a száraz tömeg és a nedves tömeg a következőképpen határozható meg:

i. A levelek összterülete. A telepekben előforduló levelek összterülete meghatározható képelemzés segítségével. Videokamerával (például az edényt világító testre helyezve) rögzíthetők a vizsgálati edény és a növények körvonalai, majd a kiadódó kép digitalizálható. Ismert területű síkidomokhoz hasonlítva meghatározható a vizsgálati edényekben lévő levelek összterülete. Kellő gondossággal ki kell küszöbölni a vizsgálati edény pereme miatti zavarás hatását. Másik, munkaigényesebb lehetőség, ha a vizsgálati edényeket és a növényeket lefényképezzük, a kiadódó körvonalak mentén kivágjuk az alakokat, majd levélterület-elemzővel vagy milliméterpapíron meghatározzuk a levélterületet. Egyéb technikák (például a papírból kivágott terület egységnyi területű idomokhoz hasonlítása a tömegek összevetése alapján) ugyancsak megoldást jelenthetnek.

ii. Száraz tömeg. A telepeket összegyűjtjük a vizsgálati edényekből, desztillált vagy ionmentesített vízzel leöblítjük őket, leitatjuk a felesleges vizet, és a telepeket 60 °C-on tömegállandóságig hevítjük. A kapcsolódó gyökereket nem távolítjuk el. A száraz tömeget legalább 0,1 mg pontossággal kell kifejezni.

iii. Nedves tömeg. A telepeket előzetesen megmért tömegű, kerek aljukon kis (1 mm-es) lyukakkal ellátott polisztirol (vagy más kémiailag semleges anyagból készült) csövekbe helyezzük. A csöveket ezt követően 3 000 1/perc fordulatszámon, szobahőmérsékleten 10 percig centrifugáljuk. Megmérjük a most már szárított telepeket tartalmazó csövek tömegét, és a nedves tömeget az üres csövek tömegének levonásával nyerjük.

1.7.10.1. *A mérések és az analitikai vizsgálatok gyakorisága*

Statikus vizsgálat esetén a vizsgálat elején és végén megmérjük az egyes készítmények pH-értékét. Félstatikus vizsgálat esetén a pH-értéket minden oldatcsere alkalmával meghatározzuk mind a friss, mind az elhasznált oldaton.

▼M1

A fényintenzitást a növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben a fényforrástól a *Lemna*-levelekkel megegyező távolságban elhelyezkedő pontokban mérjük. Fényintenzitást a vizsgálat során legalább egyszer kell mérni. A növesztőkamrában, az inkubátorban vagy a vizsgálati helyiségben azonos körülmények között külön erre a célra tartott edényben legalább naponta mérjük a tápoldat hőmérsékletét.

A vizsgálat során alkalmas időközönként meg kell határozni a vizsgált anyag koncentrációját. Statikus vizsgálat esetén a koncentrációt legalább a vizsgálat elején és végén kell meghatározni.

Félstatikus vizsgálat esetén, ha a vizsgált anyag koncentrációja várhatóan nem marad a névleges koncentráció ± 20 %-os környezetében, akkor minden friss vizsgálati oldatot elkészítésekor, továbbá minden lecserélt oldatot analitikai vizsgálatnak kell alávetni (lásd az 1.7.7. szakasz harmadik bekezdését). Olyan vizsgálatok esetén ugyanakkor, amelyekben a vizsgált anyag mért kezdeti koncentrációja ugyan nem a névleges koncentráció ± 20 %-os környezetében van, de adatokkal kellően bizonyítható, hogy a kezdeti koncentrációk megismételhetők és stabilak (azaz a kezdeti koncentráció 80–120 %-os környezetében vannak), akkor az analitikai vizsgálatokat elegendő csak a legkisebb és a legnagyobb vizsgálati koncentráción elvégezni. Az oldatcsere előtt a vizsgált anyag koncentrációját minden esetben elegendő vizsgálati koncentrációnként egy párhuzamos oldaton (vagy az edények párhuzamos tenyészetenként egyesített tartalmán) elvégezni.

Átfolyásos vizsgálat esetén a félstatikus vizsgálathoz hasonló rendben, így a vizsgálat elején, felénél és végén kell mintákat venni, de ilyenkor nincs értelme az „elhasznált” oldat vizsgálatának. Átfolyásos vizsgálat esetén naponta ellenőrizni kell az oldószer és a vizsgált anyag vagy a vizsgált anyag törzsoldata adagolási sebességét.

Ha kimutatható, hogy a vizsgált anyag koncentrációját a vizsgálat időtartama alatt sikerült a névleges vagy a mért kezdeti koncentráció ± 20 %-os környezetében tartani, akkor az eredmények a névleges vagy mért kezdeti értékek alapján elemezhetők. Ha a névleges vagy a mért kezdeti koncentrációtól való eltérés meghaladja a ± 20 %-ot, akkor az eredményeket az expozíció idején érvényes koncentrációértékek mértani középértéke vagy a vizsgált anyag koncentrációjának csökkenését leíró modellek alapján kell elemezni (11).

1.7.11. **Határérték-vizsgálat**

Egyes esetekben, például ha előzetesen elvégzett vizsgálatok azt jelzik, hogy a vizsgált anyag 100 mg/l koncentrációig vagy az adott vizsgálati oldatban való oldhatósági határig (a kettő közül a kisebbikig) nem okoz toxikus hatást, akkor egy kontrollcsoport és egyetlen (100 mg/l koncentrációnak vagy az adott vizsgálati oldatban való oldhatósági határhoz tartozó koncentrációnak megfelelő) expozíciónak kitett csoport összehasonlításával úgynevezett határérték-vizsgálat végezhető. A vizsgálat során fokozottan ajánlatos elemezni az expozíció koncentrációját. A határérték-vizsgálat során biztosítani kell valamennyi fent leírt vizsgálati körülmény fennállását és érvényességi feltétel teljesülését azzal az eltéréssel, hogy kétszer annyi párhuzamos készítményt kell vizsgálni. A kontrollcsoportban és az expozíciónak kitett csoportban tapasztalt növekedés olyan statisztikai próbával (például a Student-féle t-próbával) elemezhető, amely a középértékek összehasonlításán alapul.

▼M1

2. **ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS**

2.1. MEGKETTŐZŐDÉSI IDŐ

A vizsgálat során a levélszám megkettőződéséhez szükséges T_d idő meghatározásához és az erre vonatkozó érvényességi feltétel (lásd az 1.6. szakaszt) ellenőrzéséhez a kontrolltenyészetek adataira a következő összefüggést kell alkalmazni:

$$T_d = \ln 2/\mu,$$

ahol μ a 2.2.1. szakasz első és második bekezdése szerint meghatározott átlagos fajlagos növekedési sebesség.

2.2. HATÁSVÁLTOZÓK

A vizsgálat célja annak meghatározása, milyen hatást gyakorol a vizsgált anyag a *Lemna*-telepek vegetatív növekedésére. Ez a vizsgálati módszer két hatásváltozót tartalmaz, mert a tagállamok igényei és a tagállamokban érvényes szabályozás eltérő. Hogy a vizsgálati eredmények valamennyi tagállamban elfogadhatók legyenek, a hatást mindkét alábbi hatásváltozó alapján meg kell határozni:

a) átlagos fajlagos növekedési sebesség: ezt a hatásváltozót a levélszám logaritmusának, valamint egy további mért paraméter (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) logaritmusának napi változása alapján számítjuk a kontrolltenyészetek és az egyes expozíciónak kitett tenyészetek figyelembevételével. Ezt a mennyiséget relatív növekedési sebességnek is nevezik (15);

b) kihozatal: ezt a hatásváltozót a levélszám, valamint egy további mért paraméter (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) értékének napi változása alapján számítjuk a kontrolltenyészetek és az egyes expozíciónak kitett tenyészetek figyelembevételével.

Megjegyzendő, hogy a két hatásváltozó alapján számított toxicitásértékek nem hasonlíthatók egymáshoz, és a vizsgálatok eredményeinek felhasználása során erre a különbségre tekintettel kell lenni. A jelen vizsgálati módszerben előírt vizsgálati körülmények betartása mellett a két számítási eljárás matematikai háttere következtében az átlagos fajlagos növekedési sebességen alapuló EC_x értékek (E_rC_x) általában nagyobbra adódnak, mint a kihozatalon alapuló EC_x értékek (E_yC_x). Ezt az eltérést nem szabad úgy értelmezni, hogy egyik hatásváltozó érzékenyebb lenne a másiknál; egyszerűen arról van szó, hogy a két érték matematikailag mást jelent. Az átlagos fajlagos növekedési sebesség a békalencse korlátozatlan tenyészetekben tanúsított általános exponenciális növekedési mintáján alapul, és a toxicitást a növekedési sebességre kifejtett hatás alapján, a kontrolltenyészetekben tapasztalható növekedési sebesség abszolút nagyságától, a koncentráció–hatás görbe meredekségétől és a vizsgálat időtartamától függetlenül becsli. A kihozatalból származtatott eredmények ezzel szemben mindezektől a változóktól is függnek. Az E_yC_x függ a békalencse egyes vizsgálatokban felhasznált egyedeinek fajlagos növekedési sebességétől és a legnagyobb fajlagos növekedési sebességtől, amely fajonként, sőt klónonként is eltérő lehet. Ez a hatásváltozó nem alkalmas az egyes békalencsefajok vagy klónok toxikus hatással szembeni érzékenységében fennálló különbségek megítélésére. Bár tudományos szempontból a toxikus hatást indokoltabb az átlagos fajlagos növekedési sebességből meghatározni, ez a vizsgálati módszer a kihozatalon alapuló toxicitásszámítást is tartalmazza, mert egyes országok hatályos jogszabályi követelményei ezt is szükségessé teszik.

▼M1

A toxicitást a levélszám és egy további mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) alapján is meg kell határozni, mert bizonyos anyagok egy másik mérési változót sokkal erősebben befolyásolhatnak, mint a levélszámot. Ez a hatás nem volna kimutatható, ha csak a levélszámból indulnánk ki.

A levélszám, valamint a többi feljegyzett mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) értékét az egyes mérések alkalmával a koncentrációértékek szerint táblázatba kell rendezni. A további adatelemzés, azaz az LOEC, az NOEC vagy az EC_x meghatározása során a párhuzamos tenyészetek külön-külön vett adataiból, nem pedig az egyes csoportok középértékéből kell kiindulni.

2.2.1. **Átlagos fajlagos növekedési sebesség**

Az adott időszakhoz tartozó átlagos fajlagos növekedési sebességet a növekedést leíró változók (levélszám, valamint egy további mérési változó: a levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg) logaritmusának növekedéseként számítjuk a vizsgálati és a kontrolltenyészetek minden egyes példányára külön-külön, a következő összefüggés szerint:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

ahol:

– μ_{i-j}: az átlagos fajlagos növekedési sebesség az „i”-től a „j” időpillanatig

– N_i: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolltenyészetben az „i” időpillanatban

– N_j: a mérési változó értéke a vizsgálati vagy a kontrolltenyészetben a „j” időpillanatban

– t: az „i”-től „j”-ig terjedő időtartam.

A vizsgálati és a kontrollcsoportok mindegyikére meg kell határozni a növekedési sebesség középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét.

Az átlagos fajlagos növekedési sebességet a vizsgálat teljes időtartamára (tehát úgy, hogy a fenti összefüggésben „i” a vizsgálat kezdetét, „j” a vizsgálat végét jelöli) kell meghatározni. Minden egyes vizsgálati koncentrációra és kontrollcsoportra meg kell határozni az átlagos fajlagos növekedési sebesség középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Emellett (például a növekedési görbék logaritmikus transzformáltjának szemügyre vételével) becslést adunk a növekedési sebesség szakaszonkénti értékére is annak érdekében, hogy megítélhető legyen a vizsgált anyag által az expozíciós időszak folyamán kifejtett hatás. Ha a szakaszonkénti növekedési sebesség és az átlagos növekedési sebesség között nagy különbséget tapasztalunk, az azt jelenti, hogy a növekedés mintája erősen eltér az állandó kitevőjű exponenciális növekedéstől és különösen ajánlott a növekedési görbék részletes vizsgálata. Ilyenkor a biztonság javára járunk el, ha az összehasonlítást a legnagyobb gátlás időszakában a vizsgált tenyészetekben és az ugyanebben az időszakban a kontrolltenyészetekben tapasztalt fajlagos növekedési sebesség között végezzük.

▼M1

A növekedési sebesség I_r százalékos gátlását ezután koncentrációnként (készítménycsoportonként) a következő összefüggésből kell meghatározni:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

ahol:

– % I_r: vaz átlagos fajlagos növekedési sebesség százalékos gátlása

– μ_C: a μ középértéke a kontrollcsoportban

– μ_T: a μ középértéke a vizsgált csoportban.

2.2.2. **Kihozatal**

A kihozatalra gyakorolt hatást vizsgálati edényenként, két mérési változó: a levélszám és egy további mérési változó (a levelek összterülete, a száraz tömeg vagy a nedves tömeg) vizsgálat kezdetén és vizsgálat végén mért értékéből számítjuk. A száraz tömeg és a nedves tömeg esetében a kezdeti élőanyag-tömeget a vizsgálati edények tartalmának összeállításához (lásd az 1.7.3. szakasz második bekezdését) használt tételből származó levelekből vett mintán határozzuk meg. Minden egyes vizsgálati koncentráció és kontrollcsoport esetén kiszámítjuk a kihozatal középértékét és tapasztalati szórásnégyzetét. Az átlagos százalékos kihozatalgátlás (% I_y) készítménycsoportonként határozható meg a következő összefüggésből:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

ahol:

– % I_y: a kihozatal százalékos csökkenése

– b_C: az élőanyag-tömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a kontrollcsoportban

– b_T: az élőanyag-tömeg végső értéke és kiindulási értéke közötti különbség a vizsgált csoportban.

2.2.3. **A koncentráció–hatás görbék elkészítése**

El kell készíteni a hatásváltozóhoz tartozó átlagos százalékos gátlás értékét (a 2.2.1., illetve a 2.2.2. szakasz utolsó bekezdésében meghatározott I_r vagy I_y értéket) a vizsgálati koncentráció logaritmusa függvényében ábrázoló koncentráció–hatás görbéket.

2.2.4. **Az EC_x becslése**

Az EC_x (például EC_{50}) becslését mind az átlagos fajlagos növekedési sebesség (E_rC_x), mind a kihozatal (E_yC_x) alapján el kell végezni, amelyeket viszont a levélszámból és egy további mérési változóból (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg) egyaránt ki kell számítani. Ez azért szükséges, mert egyes vizsgálati anyagok a levélszámra és a második mérési változóra eltérő hatást gyakorolnak. Ennek megfelelően tehát minden x gátlási szinthez négy EC_x toxicitási paramétert állítunk elő: E_rC_x (levélszám); E_rC_x (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg); E_yC_x (levélszám); és E_yC_x (levelek összterülete, száraz tömeg vagy nedves tömeg).

▼M1

2.3. STATISZTIKAI SZÁMÍTÁSOK

A statisztikai számítások célja, hogy regressziószámítással kvantitatív koncentráció–hatás összefüggést állítsunk elő. Lehetőség van arra, hogy a hatásadatok – például probit-, logit- vagy Weibull-modell (16) szerinti – linearizációs transzformálását követően súlyozott lineáris regressziót végezzünk, de előnyösebb inkább nemlineáris regressziót alkalmazni, mert ez jobban kezeli az adatok elkerülhetetlen irregularitását és a sima eloszlástól való eltérést. A nulla és a teljes gátlás környezetében az irregularitást a transzformáció felnagyíthatja, ami a számítás szempontjából előnytelen (16). Megjegyzendő, hogy a probit-, logit- vagy Weibull-transzformáltat alkalmazó szokásos számítási módszerek elsősorban kvantált (például elhalálozás kontra túlélés) adatok feldolgozására alkalmasak, így módosítást igényelnek, ha a növekedési sebességre vagy a kihozatalra kívánjuk őket alkalmazni. Az EC_x-értékek folytonos adatokból való számítására alkalmas módszereket a (17), (18) és (19) irodalom ismertet.

Az egyes hatásváltozók elemzéséhez a koncentráció–válasz összefüggésből állítsuk elő az EC_x egyes pontokban becsült értékét. Ha lehetséges, meg kell határozni az egyes becslések 95 %-os konfidenciahatárát. A hatásadatok regressziós modellhez illeszkedésének jóságát grafikus vagy statisztikai módszerrel kell megállapítani. A regressziószámítást az egyes vizsgálati edényeken nyert értékekkel, nem pedig a vizsgálati csoportok középértékével kell elvégezni.

Ha a rendelkezésre álló regressziós modellek/módszerek nem alkalmasak a konkrét adatok elemzésére, az EC_{50}-re vonatkozó becsléseket és a konfidenciahatárokat „bootstrap” technikával együtt alkalmazott lineáris interpolációval (20) is előállíthatjuk.

Az LOEC, és így az NOEC becsült értékének előállítása érdekében varianciaanalízis (ANOVA) segítségével összevetjük az egyes készítményekhez tartozó középértékeket. Az egyes koncentrációkhoz tartozó középértékeket ezután alkalmasan megválasztott többszörös összehasonlító módszerrel vagy trendpróbával a kontrollcsoporton nyert középértékhez hasonlítjuk. Hasznos lehet a Dunnett- és a Williams-próba alkalmazása (21)(22)(23)(24). Lényeges ellenőrizni, hogy fennáll-e az ANOVA-nak a szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevése. Ezt az ellenőrzést grafikusan vagy formális próbával (25) végezhetjük. Erre a célra a Levene- és a Bartlett-próba alkalmas. A szórásnégyzetek homogenitására vonatkozó feltevés nem teljesülése gyakran kiküszöbölhető az adatok logaritmikus transzformálásával. Ha a szórásnégyzetek heterogenitása túlságosan szélsőségesnek bizonyul, és transzformációval nem javítható, akkor célszerű megfontolni például a lépésenkénti Jonkheere-trendpróba alkalmazását. Az NOEC meghatározásához további útmutatást ad a (19) irodalom.

A legújabb kutatási eredmények alapján az az ajánlás fogalmazható meg, hogy az NOEC kiszámítása helyett célszerűbb az EC_x értékét becsülni pontonkénti regresszióval. A jelen *Lemna*-vizsgálathoz egyelőre nem áll rendelkezésre alkalmas x érték, bár a 10 és 20 % közötti tartomány megfelelőnek látszik (a választott hatásváltozótól függően), és ajánlott mind az EC_{10}, mind az EC_{20} értéket jegyzőkönyvbe foglalni.

3. JEGYZŐKÖNYVEZÉS

3.1. VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

A vizsgálati jegyzőkönyv tartalmazza a következő információkat:

Vizsgált anyag:

— fizikai jelleg és fizikokémiai tulajdonságok, vízben való oldhatósági határ,

▼M1

— kémiai azonosító adatok (pl. CAS-szám), tisztaság.

Vizsgált faj:

— tudományos név, klón (ha ismert) és eredet.

Vizsgálati körülmények:

— alkalmazott vizsgálati eljárás (statikus, félstatikus vagy átfolyásos),

— a vizsgálat megkezdésének időpontja és időtartama,

— vizsgálati oldat,

— a kísérleti terv ismertetése: vizsgálati edények és fedők, oldattérfogatok, telep- és levélszámok vizsgálati edényenként a vizsgálat megkezdésekor,

— vizsgált koncentrációk (szükség szerint névleges és mért értékek) és a párhuzamos tenyészetek száma koncentrációnként,

— a törzs- és a vizsgálati oldatok elkészítésének módszere, az esetleg alkalmazott oldó- vagy diszpergálószer,

— hőmérséklet a vizsgálat folyamán,

— fényforrás, a fény intenzitása és homogenitása,

— a vizsgálati és a kontrolloldatok pH-értékei,

— a vizsgált anyag koncentrációi és az analízis módszere a megfelelő minőség-ellenőrzési adatokkal együtt (az érvényesség vizsgálata, a szórás vagy az analízis konfidenciahatára),

— a levélszám és a további mérési változók (száraz tömeg, nedves tömeg vagy levélterület) meghatározásának módszere,

— a jelen vizsgálati módszertől való esetleges eltérések.

Eredmények:

— nyers mérési adatok: levélszám és a további mérési változók minden egyes vizsgálati és kontrolltenyészetben minden adatfelvételkor és analízis alkalmával,

— az egyes mérési változók középértékei és szórásai,

— növekedési görbék minden egyes koncentrációra (logaritmikusan transzformált mérési változókkal ajánlott megadni, lásd a 2.2.1. szakasz második bekezdését),

— megkettőződési idő, illetve növekedési sebesség a kontrolltenyészetben, a levélszám alapján,

— hatásváltozók számított értéke minden párhuzamos tenyészetre, továbbá vizsgálati csoportonként a középérték és a szórásnégyzet,

— a koncentráció–hatás összefüggés grafikus formában,

— a hatásváltozók toxikus végpontjának becsült értékei, például EC_{50}, EC_{10}, EC_{20} és a hozzájuk tartozó konfidenciaintervallumok. Ha kiszámítottuk, az LOEC, illetve az NOEC értéke, továbbá a számításhoz alkalmazott statisztikai módszer,

▼M1

— ANOVA alkalmazása esetén a hatás kimutatásának mérethatára (például a legkisebb szignifikáns különbség),

— a vizsgálatok során észlelt esetleges növekedésserkentés,

— fitotoxicitásra utaló esetleges látható jelek, valamint a vizsgálati oldatokkal kapcsolatos észrevételek,

— az eredmények szöveges összefoglalása és értékelése, ezen belül a jelen vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálati eredményekre gyakorolt hatásának elemzése.

4. **IRODALOM**

(1) OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test

(2) A Lemna-vizsgálat színezett anyagokra való alkalmazását az EU Manual of Decisions (2006. július) 13.5.3. szakasza tárgyalja: 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:

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 – Svéd Szabványügyi Intézet. (1995). Vízminőség. A növekedésgátlás meghatározása (7-d) *Lemna minor*, békalencse. SS 02 82 13. 15pp. (svéd nyelven).

(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

1. függelék

A *Lemna* nemzetség leírása

A *Lemna* nemzetséghez tartozó, békalencseként közismert vízinövények a *Lemnaceae* családba tartoznak, amelynek négy nemzetsége számos világszerte elterjedt fajt felölel. Különböző megjelenésüket és rendszertanukat a szakirodalom kimerítően ismerteti (1)(2). A *Lemna gibba* és a *L. minor* a mérsékelt éghajlati övezet jellegzetes képviselői; a toxicitási vizsgálatokban többnyire ezeket alkalmazzák. Mindkét fajnak úszó vagy alámerülő, korong alakú levelei és nagyon vékony, az egyes levelek alsó felszínének közepéről eredő gyökerei vannak. A *Lemna*-fajok többnyire nem virágzanak, a szaporodás érdekében a növények vegetatív úton új leveleket hoznak létre (3). Az idősebb növényekhez képest a fiatalabbak általában halványabbak, rövidebb gyökereik vannak és két-három, különböző méretű levélből állnak. A *Lemna*-növények kis mérete, egyszerű struktúrája, ivartalan szaporodása és rövid generációs ideje a nemzetség fajait különösen alkalmassá teszi laboratóriumi vizsgálatokra (4)(5).

Mivel az egyes fajok előreláthatóan eltérő mértékben lesznek érzékenyek a különböző behatásokra, az érzékenységet kizárólag fajon belül szabad összehasonlítani.

Példák a vizsgálatokban korábban már alkalmazott *Lemna*-fajokra, fajonként szakirodalmi hivatkozásokkal

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). Vízminőség. A növekedésgátlás meghatározása (7-d) *Lemna minor*, békalencse. SS 02 82 13. 15pp. (svéd nyelven).

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.

A *Lemna*-fajok beszerzési forrásai

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2

Tel. +1-416-978-3641
Fax.+1-416-978-5878
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
United States
phone 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 STOCKHOLM
SWEDEN
Tel. +46 8 674 7240
Fax +46 8 674 7636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
Germany
e-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Irodalom

(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

2. függelék

A törzstenyészetek tartása

A törzstenyészetek alacsony hőmérsékleteken (4–10 °C) hosszabb ideig átoltás nélkül is fenntarthatók. A *Lemna* tápoldata megegyezhet a vizsgálatok során alkalmazottal, de a törzstenyészetek más, tápanyagokban gazdag oldatban is tarthatók.

Időről időre néhány fiatal, világoszöld növényt csíramentes eljárással friss tápoldatot tartalmazó növesztőedénybe helyezünk. A javasolt hűvösebb körülmények között elegendő lehet akár háromhavonta is átoltást végezni.

Kémiailag tiszta (savval lemosott) és steril üveg növesztőedényeket alkalmazunk, és a kezelés során biztosítsunk csíramentes körülményeket. A törzskultúra (például algával vagy gombákkal történő) fertőződése esetén meg kell kísérelni a szennyező organizmusok eltávolítását. Algák és a legtöbb más szennyező organizmus esetén ez felületi fertőtlenítéssel valósítható meg. A fertőződött növényanyagból mintát veszünk, és a gyökereket levágjuk. A növényeket ezután tiszta vízben intenzíven megrázzuk, majd 30 másodperc és 5 perc közötti időtartamra 0,5 térfogatszázalékos nátrium-hipoklorit-oldatba merítjük. A növényanyagot ezután steril vízben átöblítjük, majd több részletben friss tápoldatot tartalmazó növesztőedényekbe helyezzük. A kezelés eredményeképpen számos levél elhal, különösen hosszabb expozíciós idő esetén, de a fennmaradók közül néhány általában fertőzésmentes lesz. Ez a tenyészet a későbbiekben újabbak leoltására használható fel.

▼M1

3. függelék

Tápoldatok

L. minor és *L. gibba* esetén eltérő tápoldatot ajánlott alkalmazni. *L. minor* esetén a svéd szabvány (SIS) szerinti tápoldat módosított változatát, míg *L. gibba* esetén a 20X–AAP tápoldatot javasoljuk. Az alábbiakban megadjuk minkét tápoldat összetételét. A tápoldatok elkészítése során reagens vagy analitikai tisztaságú vegyületeket és ionmentesített vizet kell alkalmazni.

Svéd szabvány (SIS) szerinti Lemna-tápoldat

— Az I–V. törzsoldatot autoklávozással (120 °C, 15 perc) vagy membránszűréssel (körülbelül 0,2 μm pórusméret) sterilizáljuk.

— A VI. (és szükség esetén a VII.) törzsoldatot kizárólag membránszűréssel sterilizáljuk, autoklávozás nem alkalmazható.

— A steril törzsoldatokat hideg, sötét helyen tároljuk. Az I–V. törzsoldatot hat hónap elteltével ki kell önteni, míg a VI. (és szükség esetén a VII.) törzsoldat eltarthatósági ideje egy hónap.

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/l)	Koncentráció a kész tápoldatban (mg/l)	Kész tápoldat	
				Kémiai elem	Koncentráció (mg/l)
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 (puffer)	490	490	—	—

— Egy liter SIS szerinti tápoldat elkészítéséhez 900 ml ionmentesített vízhez a következőket adagoljuk:

— 10 ml az I. törzsoldatból,

— 5 ml a II. törzsoldatból,

— 5 ml a III. törzsoldatból,

— 5 ml a IV. törzsoldatból,

▼M1

— 1 ml az V. törzsoldatból,

— 5 ml a VI. törzsoldatból,

— 1 ml a VII. törzsoldatból (ha szükséges).

Megjegyzés: A VII. törzsoldatot (MOPS puffer) bizonyos vizsgált anyagok esetében kell alkalmazni (lásd az 1.4. szakasz utolsó bekezdését).

— A pH-értéket 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával 6,5 ± 0,2 értékre állítjuk, majd a térfogatot ionmentesített víz hozzáadásával egy literre kiegészítjük.

20X–AAP tápoldat

A törzsoldatokat steril desztillált vagy ionmentesített vízzel készítjük.

A steril törzsoldatokat hideg, sötét helyen tároljuk. Ilyen körülmények között eltarthatósági idejük legalább 6–8 hét.

A 20X–AAP tápoldat előállításához öt, tápanyagokat tartalmazó törzsoldatot (A1., A2., A3., B és C) készítünk reagens minőségű vegyületek felhasználásával. A tápoldat előállításához kb. 850 ml ionmentesített vízhez 20 ml-t adunk minden törzsoldatból. A pH-értéket 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával 7,5 ± 0,1 értékre állítjuk, majd a térfogatot ionmentesített víz hozzáadásával egy literre kiegészítjük. Ezután a tápoldatot egy kb. 0,2 μm pórusméretű membránszűrőn át steril edénybe szűrjük.

A vizsgálatok céljára szánt tápoldatot egy-két nappal a felhasználás előtt kell elkészíteni annak érdekében, hogy pH-értékük stabilizálódhasson. A tápoldat pH-értékét felhasználás előtt ellenőrizni kell, és szükség esetén 0,1 vagy 1 mol HCl vagy NaOH hozzáadásával a fentieknek megfelelően újra be kell állítani.

Törzsoldat száma	Anyag	Koncentráció a törzsoldatban (g/l) (1)	Koncentráció a kész tápoldatban (mg/l) (*)	Kész tápoldat	
				Kémiai elem	Koncentráció (mg/l) (*)
A1.	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2•6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2•2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2.	$MgSO_4•7H_2O$	15	290	S	38,22
A3.	$K_2HPO_4•3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B.	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2•4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3•6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA•2H_2O$	0,30	6,0	–	–
	$ZnCl_2$	3,3 mg/l	66 μg/l	Zn	31 μg/l
	$CoCl_2•6H_2O$	1,4 mg/l	29 μg/l	Co	7,1 μg/l
	$Na_2MoO_4•2H_2O$	7,3 mg/l	145 μg/l	Mo	58 μg/l
	$CuCl_2•2H_2O$	0,012 mg/l	0,24 μg/l	Cu	0,080 μg/l
C.	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Eltérő előírás hiányában.

▼M1

Lábjegyzet: Az elméletileg szükséges hidrogén-karbonát-koncentráció (amely mellett nincs szükség a pH-érték jelentős mértékű utánállítására) 15 mg/l, nem 300 mg/l. A 20X–AAP tápoldattal végzett korábbi vizsgálatok és a jelen módszerhez kapcsolódó körvizsgálat azonban egyaránt 300 mg/l-en alapult. [I. Sims, P. Whitehouse and 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-féle tápoldat (az ISO 20079 szerint)

Koncentrációk és törzsoldatok

— A módosított Steinberg-féle tápoldatot az ISO 20079 kizárólag *Lemna minor* esetére írja elő (mert a szabvány csak *Lemna minor* alkalmazását engedélyezi), de korábbi vizsgálatok *Lemna gibba* esetén is kedvező eredményekre vezettek.

— A tápoldat készítése során reagens vagy analitikai tisztaságú anyagokat és ionmentesített vizet kell alkalmazni.

— A tápoldatot elkészíthetjük törzsoldatokból vagy a tízszeres töménységű oldatból, amely maximális oldatkoncentrációt tesz lehetővé kicsapódás nélkül.

1. táblázat

pH-stabilizált STEINBERG-féle tápoldat (Altenburger szerint módosítva)

Anyag		Tápoldat	
Makroelemek	móltömeg	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
Mikroelemek	móltömeg	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
Dinátrium-EDTA-dihidrát	372,24	1 500,00	4,03

▼M1

2. táblázat

Törzsoldatok (makroelemek)

1. **Makroelemek (50-szeres töménységű)**	g/l
1. törzsoldat:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
2. törzsoldat:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
3. törzsoldat:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

3. táblázat

Törzsoldatok (mikroelemek)

2. **Mikroelemek (1 000-szeres töménységű)**	mg/l
4. törzsoldat:	
H_3BO_3	120,0
5. törzsoldat:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
6. törzsoldat:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
7. törzsoldat:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
8. törzsoldat:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
Dinátrium-EDTA-dihidrát	1 500,00

— A 2. és 3., illetve külön a 4–7. törzsoldat egyesíthető (a kívánt koncentrációk figyelembevételével).

— A hosszabb eltarthatóság érdekében kezeljük a törzsoldatokat autoklávban 121 °C-on 20 percig, vagy végezzünk membránszűréses (0,2 μm) sterilizálást. A 8. törzsoldat esetében fokozottan ajánlott membránszűréses (0,2 μm) sterilizálást végezni.

A végleges koncentrációjú (módosított) STEINBERG-féle tápoldat elkészítése

— A kicsapódás elkerülése érdekében mintegy 900 ml ionmentesített vízhez adjunk az 1., 2. és 3. törzsoldatból (2. táblázat) egyaránt 20 ml-t.

— Az oldathoz adjunk a 4., 5., 6., 7. és 8. törzsoldatból (3. táblázat) egyaránt 1,0 ml-t.

— A pH-érték 5,5 ± 0,2 legyen (ezt az értéket minél kevesebb NaOH-oldat vagy HCl hozzáadásával állítsuk be).

▼M1

— Víz hozzáadásával egészítsük ki az oldat térfogatát 1 000 ml-re.

— Ha a törzsoldatok sterilizáltak és megfelelő minőségű vizet alkalmazunk, akkor további sterilizálás nem szükséges. Ha a végleges tápoldatot sterilizáljuk, a 8. törzsoldatot az autoklávozás (121 °C-on 20 percig) után kell hozzáadni.

A 10-szeres töménységű (módosított) STEINBERG-féle tápoldat elkészítése ideiglenes tárolásra

— A kicsapódás elkerülése érdekében mintegy 30 ml vízhez adjunk az 1., 2. és 3. törzsoldatból (2. táblázat) egyaránt 20 ml-t.

— Az oldathoz adjunk a 4., 5., 6., 7. és 8. törzsoldatból (3. táblázat) egyaránt 1,0 ml-t. Víz hozzáadásával egészítsük ki az oldat térfogatát 1 000 ml-re.

— Ha a törzsoldatok sterilizáltak és megfelelő minőségű vizet alkalmazunk, akkor további sterilizálás nem szükséges. Ha a végleges tápoldatot sterilizáljuk, a 8. törzsoldatot az autoklávozás (121 °C-on 20 percig) után kell hozzáadni.

— A (végleges koncentrációjú) tápoldat pH-értéke 5,5 ± 0,2 legyen.

▼M4

C.27. SZENNYEZETT ÜLEDÉKKEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 218. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer célja a kétszárnyúak rendjébe tartozó édesvízi üledéklakó árvaszúnyoglárvák vegyi anyagoknak való tartós kitettsége hatásainak az értékelése. A *Chironomus riparius* és *Chironomus tentans* árvaszúnyog fajokkal végzett toxicitás vizsgálati protokollokon alapul, amelyeket Európában (1)(2)(3) és Észak-Amerikában (4)(5)(6)(7)(8) dolgoztak ki, és körvizsgálatnak vetettek alá (1)(6)(9). Más jól dokumentált árvaszúnyog fajok, például *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) is használhatók.

2. A vizsgálati módszer által alkalmazott expozíciós forgatókönyv az üledék szennyezése a vizsgált anyaggal. A megfelelő expozíciós forgatókönyv a vizsgálat tervezett felhasználásától függ. Az üledékszennyezési forgatókönyv az üledékben tartósan jelen lévő vegyi anyagok felhalmozódását hivatott szimulálni. Ennél az expozíciós elrendezésnél a szennyezett üledék egy üledékből és vízből álló vizsgálati elrendezés részét képezi.

3. Az anyagok, amelyek üledéklakó organizmusokra gyakorolt hatását vizsgálni kell, általában hosszú ideig maradnak ebben a környezetben. Az üledéklakó organizmusok többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága és a teljes toxikus hatás egyes expozíciós útvonalaknak tulajdonítható részének kialakulásához szükséges időtartam az érintett vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól függ. Az erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok esetében fontos expozíciós útvonal lehet a szennyezet táplálék megemésztése. Az erősen lipofil anyagok toxicitása alulbecsülésének elkerülése érdekében megfontolandó, hogy a táplálékot a vizsgált anyaggal való szennyezést megelőzően az üledékbe keverjük. Az itt bemutatott vizsgálati módszer a tartós kitettségre épül, amely azt a célt szolgálja, hogy valamennyi lehetséges expozíciós útvonal figyelembe vehető legyen. A vizsgálat időtartama a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 20–28 nap, a *C. tentans* esetében 28–65 nap. Ha egy meghatározott célra – például egy instabil vegyület hatásainak a vizsgálatára – rövid távú adatok kellenek, a felesleges ismétlések tíz nap után eltávolíthatók.

4. A mért végpontok a kikelt kifejlett példányok száma és a kikeléshez szükséges idő. Ha kiegészítő rövid távú adatokra van szükség, akkor a lárvák túlélésének és fejlődésének mérését csak a tíznapos időszak eltelte után ajánlott megkezdeni, megfelelő számú ismétlést alkalmazva.

5. Mesterséges üledék használata ajánlott. A mesterséges üledék számos előnnyel rendelkezik a természetes üledékkel szemben:

   — a kísérlet változékonysága kisebb, mivel a mesterséges üledék egy reprodukálható „szabványosított közeget” biztosít, és nem kell szennyezésmentes, tiszta üledékforrást keresni,

   — a vizsgálatok bármikor elkezdhetők anélkül, hogy a vizsgálathoz használt üledék szezonális változékonyságát figyelembe kellene venni, és az üledéket nem kell előzetes kezelésnek alávetni a honos fauna eltávolítása végett; a mesterséges üledék alkalmazása a rutinvizsgálatokhoz szükséges mennyiségű üledék terepen történő gyűjtésével kapcsolatos költségeket is csökkenti,

   — a mesterséges üledék alkalmazása lehetővé teszi a különböző anyagok toxicitásának összehasonlítását és ennek megfelelő rangsorolását.

6. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

▼M4

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Első fejlődési szakaszban lévő árvaszúnyoglárvákat teszünk ki a vizsgált vegyi anyag különböző koncentrációinak üledék-víz elrendezésekben. Az üledéket a vizsgált anyaggal szennyezzük, majd első fejlődési szakaszban lévő lárvákat helyezünk a kísérleti edényekbe, amelyekben az üledék és víz koncentrációját előzőleg stabilizáltuk. Az árvaszúnyoglárvák kikelésének és fejlődésének ütemét a vizsgálat végén mérjük. Szükség esetén 10 nap elteltével is mérhetjük a lárvák túlélését és súlyát (megfelelő számú ismétlést alkalmazva). A kapott adatokból regressziós modell segítségével megbecsüljük azt a koncentrációt, amely a kikelésnek vagy a lárvák túlélésének, illetve fejlődésének x %-os csökkenését okozná (például EC_{15}, EC_{50}, stb.), vagy statisztikai hipotézisvizsgálattal meghatározzuk a megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt, illetve a megfigyelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (NOEC/LOEC). Az utóbbi esetben a hatást okozó értékeket statisztikai vizsgálatok segítségével össze kell hasonlítani a kontroll értékekkel.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldékonyságát, páranyomását, mért vagy számított megoszlását az üledékben, valamint stabilitását vízben és az üledékben. Rendelkezni kell egy megbízható analitikai módszerrel a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásához a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben, amelynek pontossága és kimutatási határa ismert és dokumentált. Hasznos információ a vizsgált anyag szerkezeti képlete és kémiai tisztasága. Ugyancsak hasznos információ, hogy milyen kémiai folyamatokon megy keresztül a vizsgált anyag (például disszipáció, nem biológiai és biológiai lebomlás, stb.). A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező anyagok vizsgálatára vonatkozóan a szakirodalom (12) nyújt további tájékoztatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. A vizsgálati protokoll és a vizsgálati körülmények megbízhatóságának megerősítése céljából rendszeres időközönként érdemes referencia-vegyianyagokkal elvégezni a vizsgálatot. Körvizsgálatokban és validálási vizsgálatokban eredményesen használt mérgező referenciaanyagok például a következők: lindane, trifluralin, pentaklórfenol, kadmium-klorid és a kálium-klorid (1)(2)(5)(6)(13).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

10. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat érvényes legyen:

— A lárvák kikelésének aránya a kontroll edényekben legalább 70 % a vizsgálat végén (1)(6).

— A kontroll edényekben 12–23 nappal a behelyezést követően kell megjelenniük a kifejlett C. riparius és C. yoshimatsui példányoknak; a C. tentans esetében ehhez 20–65 nap szükséges.

— A vizsgálat végén mindegyik edényben meg kell mérni a pH-t és az oldott oxigén koncentrációját. Az oxigénkoncentrációnak a levegő alkalmazott hőmérséklet melletti telítettségi értéke (ASV) legalább 60 százalékának kell lennie, a fedővíz pH-értékének pedig minden edényben a 6–9 tartományon belülre kell esnie.

— a víz hőmérséklete legfeljebb ± 1,0 °C-kal változhat. A vízhőmérséklet szabályozásának egyik lehetséges módja, hogy a vizsgálatot állandó hőmérsékletű helyiségben végezzük, amely esetben a helyiség hőmérsékletét megfelelő időközönként ellenőrizni kell.

▼M4

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények

11. A vizsgálatot 600 ml-es üvegedényekben végezzük, amelyek átmérője 8 cm. Amennyiben az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége biztosított, ettől eltérő edények is alkalmazhatók. Lárvánként 2–3 cm^2 nagyságú üledékfelületet kell biztosítani. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya 1:4 legyen. A vizsgálati edényeknek és a vizsgálati elrendezéssel érintkező egyéb készülékeknek teljes mértékben üvegből vagy más kémiailag semleges anyagból (például teflon) kell készülniük.

A fajok kiválasztása

12. A vizsgálatot lehetőleg a *Chironomus riparius* fajjal végezzük. Chironomus tentans is alkalmazható, de nehezebben kezelhető, és hosszabb vizsgálati időszakot igényel. Chironomus yohimatsui szintén használható. A 2. függelékben részletezett tenyésztési módszerek a Chironomus riparius fajra vonatkoznak. A szakirodalomban más fajok – úgymint a Chironomus tentans (4) és a Chironomus yoshimatsui (11) – tenyésztési körülményeire vonatkozó tudnivalók is megtalálhatók. A vizsgálat megkezdése előtt ellenőrzésképpen fajmeghatározást kell végezni, de ha a példányok saját tenyészetből származnak, akkor ezt nem szükséges minden vizsgálat előtt megtenni.

Üledék

13. Lehetőleg mesterséges üledék (más néven formulázott, kevert vagy műüledék) használata ajánlott. Ha azonban mégis természetes üledéket használunk, akkor azt jellemezni kell (legalább a pH-t és a szerves széntartalmat meg kell határozni, de más paraméterek, például a C/N arány és a szemcseszerkezet vizsgálata is ajánlott), és mentesnek kell lennie mindenféle szennyezéstől, valamint az árvaszúnyoggal versengő vagy az azt fogyasztó egyéb organizmusoktól. Az árvaszúnyoglárvákkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott továbbá a természetes üledéket az elkövetkező vizsgálat során uralkodókkal megegyező körülmények között hét napon keresztül kondicionálni. E vizsgálat során az alábbi, a C.8. vizsgálati módszerben (14) alkalmazott mesterséges talajon alapuló mesterséges üledék alkalmazása ajánlott (1)(15)(16):

a) 4–5 % (száraz tömeg) tőzeg, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5–6,0 értékhez; fontos, hogy por alakú, finomra őrölt (részecskeméret ≤ 1 mm) és kizárólag levegőn szárított tőzeget használjunk.

b) 20 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinit tartalommal).

c) 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (túlnyomó részben finom homok, amely részecskéinek több mint 50 százaléka 50 és 200 μm közötti szemcsemérettel rendelkezik).

d) Annyi ionmentesített víz, amely ahhoz szükséges, hogy végtermékként 30-50 % nedvességtartalmú keveréket kapjunk.

e) A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának 7,0 ± 0,5 értékre történő beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonát ($CaCO_3$). A végtermékként kapott keveréknek 2 % (± 0,5 %) szerves széntartalommal kell rendelkeznie, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával érünk el.

14. A tőzegnek, a kaolinagyagnak és a homoknak ismert forrásból kell származnia. Ellenőrizni kell, hogy az üledék összetevőiben nem fordulnak elő kémiai szennyeződések (például nehézfémek, szerves klórvegyületek, szerves foszforvegyületek, stb.) A mesterséges üledék elkészítésének egy példáját a 3. függelék mutatja be. Száraz összetevők keverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionáltuk.

▼M4

Víz

15. Az elfogadható hígítóvíz 2. és 4. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságaival rendelkező bármely víz alkalmas a vizsgálathoz. Tenyésztővízként és kísérleti vízként bármely alkalmas víz, természetes víz (felszíni vagy talajvíz), mesterséges víz (lásd a 2. függeléket) vagy klórtalanított csapvíz elfogadható, amelyben az árvaszúnyoglárvák a tenyésztés és a vizsgálat időszaka alatt életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. A vizsgálat kezdetén a vizsgálathoz alkalmazott víz pH-értékének 6 és 9 között kell lennie, keménysége pedig nem haladhatja meg a 400 mg/l $CaCO_3$ értéket. Ennél lágyabb vizet kell azonban alkalmazni akkor, ha gyanítható, hogy a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között kölcsönhatás alakul ki (és ezért ebben az esetben az Elendt-féle M4 közeg nem alkalmazható). A vizsgálat teljes időtartama alatt ugyanazt a víztípust kell használni. A 4. függelékben felsorolt vízminőségi jellemzőket évente legalább kétszer kell mérni, illetve minden olyan alkalommal, amikor fennáll a gyanúja annak, hogy e jellemzők jelentős mértékben megváltoztak.

Törzsoldatok – szennyezett üledékek

16. A választott koncentrációjú szennyezett üledéket általában úgy készítjük, hogy a vizsgált anyag oldatát közvetlenül az üledékhez adjuk. A vizsgált anyag ionmentesített vízben oldott törzsoldatát hengerszék vagy tápkeverő segítségével vagy kézzel elkeverjük a mesterséges üledékkel. Ha a vizsgált anyag rosszul oldódik vízben, akkor a célnak megfelelő, lehető legkisebb mennyiségű szerves oldószerben (például hexán, aceton vagy kloroform) oldhatjuk. Ezt követően az oldatot vizsgálati edényenként 10 g finom kvarchomokkal elkeverjük. Az oldószert hagyjuk elpárologni, hogy teljes mértékben eltávozzon a homokból; majd a homokot összekeverjük a vizsgálati edényenként szükséges megfelelő mennyiségű üledékkel. A vizsgált anyag oldódásának megkönnyítéséhez, diszpergálásához vagy emulgeálásához csak gyorsan párolgó szer használható. Nem szabad elfelejteni, hogy az üledék elkészítése során a vizsgált anyag és a homok keverékéből származó homokot is figyelembe kell venni (azaz az üledéket kevesebb homokkal kell készíteni). Biztosítani kell az üledékhez adott vizsgált anyag egyenletes eloszlását az üledékben. Szükség esetén részminták analizálásával határozzuk meg a homogenitás fokát.

A VIZSGÁLAT MEGTERVEZÉSE

17. A vizsgálat megtervezése a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkkal használt edények számának, valamint a lárvák edényenkénti számának a megválasztását jelenti. Ideális esetben a vizsgálatot az alábbiakra tekintettel kell megtervezni. Az EC pontnak és a NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálatnak a megtervezését ismertetjük.

A regressziós analízis megtervezése

18. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{15}, EC_{50}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. A hatáskoncentráció becsléseknek (EC_x) a pontossága és különösképpen az érvényessége általában jobb, ha a hatáskoncentráció a vizsgált koncentrációtartományon belül helyezkedik el. A lehető legkisebb pozitív koncentrációnál jóval alacsonyabb és a legnagyobb koncentrációnál jóval magasabb értékek extrapolálását kerülni kell. Az alkalmazandó koncentrációtartomány kiválasztásához hasznos lehet előzetes behatároló vizsgálatot végezni (lásd 27. bekezdés).

▼M4

19. Az EC_x becsléséhez legalább öt koncentrációt kell vizsgálni, és mindegyik koncentráció esetében három ismétlést kell alkalmazni. A jó modellbecslés lehetővé tétele érdekében minden esetben tanácsos elegendő vizsgálati koncentrációt használni. A rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek (kivételt képeznek azok az esetek, amikor a dózis-válasz görbe lapos). Az eltérő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelkedése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám csökkenthető. Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentráció intervallum szűkítése általában a konfidencia intervallum csökkenéséhez vezet. A lárvák tíznapos túlélési arányának és fejlődési sebességének a becslése esetén további ismétlések szükségesek.

A NOEC/LOEC becslésének megtervezése

20. A LOEC vagy a NOEC becsléséhez öt koncentrációt kell vizsgálni legalább négy ismétlést alkalmazva úgy, hogy a rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek. Az ismétlések számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel kimutasson egy statisztikai próba. A fejlődési ütem esetében általában varianciaanalízist (ANOVA), például Dunnett vagy Williams próbát (17)(18)(19)(20) lehet alkalmazni. Ha a kikelési arányt vizsgáljuk, akkor a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni-féle korrekcióval) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk.

Határérték-vizsgálat

21. Határérték-vizsgálatot akkor lehet végezni (egy vizsgálati és egy kontroll koncentrációval), ha az előzetes behatároló vizsgálat során nem voltak megfigyelhető hatások. A határérték-vizsgálat célja annak a koncentrációnak a meghatározása, amely elég nagy ahhoz, hogy az elvégzett vizsgálat lehetővé tegye a döntéshozók számára a vizsgált anyag lehetséges toxikus hatásainak a kizárását, és annak a határértéknek a megállapítását, amelyen túli koncentrációknak az előfordulása semmilyen esetben sem várható. Az ajánlott koncentráció 1 000 mg/kg (száraz tömeg). Általában mind a kezelés, mind a kontroll esetében legalább hat ismétlés szükséges. Bizonyítni kell, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel képes kimutatni egy statisztikai próba. Metrikus válasz (fejlődési ütem és súly) esetén alkalmas statisztikai módszer a t-próba, ha az adatok az alkalmazási feltételeknek (normalitás, szóráshomogenitás) megfelelnek. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba vagy egy nemparaméteres próba, például a Wilcoxon-Mann-Whithey próba alkalmazható. A kikelési arány esetében a Fisher-féle egzakt próba a megfelelő.

ELJÁRÁS

Expozíciós körülmények

A szennyezett üledék – víz elrendezés előállítása

22. Az üledék vizsgált anyaggal való szennyezését a „C.8: Toxicitás földigilisztákra” című vizsgálati módszernél leírt eljárás szerint ajánlott elvégezni (14). A szennyezett üledéket elhelyezzük az edényekben, majd felöntjük vízzel úgy, hogy az üledék és a fedővíz mennyiségének az aránya 1:4 legyen (lásd a 11. és a 15. bekezdést). Az üledékrétegnek 1,5–3 cm mélynek kell lennie. Annak elkerülése érdekében, hogy a vizsgálathoz használt víz hozzáadása során az üledék összetevőire essen szét, és a finom anyag a vízrétegben felkavarodjon, az üledéket letakarhatjuk egy műanyag lappal, miközben a vizet ráöntjük, amelyet közvetlenül a felöntést követően eltávolítunk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek.

23. A vizsgálati edényeket le kell fedni (például üveglappal). Az eredeti vízszint fenntartása érdekében a vizsgálat során pótoljuk az elpárolgott vizet, ha szükséges. A sófelhalmozódás elkerülése végett desztillált vagy ionmentesített vizet használjunk.

▼M4

Stabilizálódás

24. A vízzel fedett szennyezett üledék előállítását követően hagyjuk, hogy a vizsgált anyag a vízfázisból az üledékbe kerüljön, és abban eloszoljon (3)(4)(6)(13). Ez lehetőleg a vizsgálat során alkalmazottal megegyező hőmérsékleti és levegőztetési viszonyok mellett történjen. Az ekvilibrációs idő üledék és vegyi anyag specifikus, tartama óráktól napokig terjedhet, de ritka esetekben több (4–5) hetet is igénybe vehet. Mivel ez alatt az idő alatt számos vegyi anyag lebomolhat, az egyensúlyi állapot beálltának megvárása helyett 48 órás ekvilibrációs időszak alkalmazása ajánlott. Ezen ekvilibrációs idő elteltével mérjük meg a vizsgált anyagnak legalább a legnagyobb és a legalacsonyabb koncentrációját a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben (38. bekezdés). Ezek a vizsgált anyagra vonatkozó analitikai meghatározások lehetővé teszik a tömegegyensúly kiszámítását és az eredmények mért koncentrációk alapján történő kifejezését.

A vizsgálathoz használt organizmusok hozzáadása

25. A vizsgálathoz használt organizmusok vizsgálati edényekbe történő behelyezése előtt négy-öt nappal helyezzük a tenyészetből gyűjtött petecsomókat tenyésztőközeget tartalmazó kisméretű edényekbe. A törzstenyészetből vett vagy frissen készített tenyésztőközeg egyaránt használható. Ez utóbbi használata esetén adjunk a tenyésztőközeghez kis mennyiségű táplálékot, például zöldalgát és/vagy finomra őrölt pehely formájú haleledelből készített szuszpenzió szüredékéből néhány cseppet (lásd a 2. függeléket). Csak frissen lerakott petecsomókat szabad használni. A lárvák általában néhány nappal a peterakást követően kezdenek kikelni (a *Chironomus riparius* esetében ez 20 °C-on 2–3 nap, a *Chironomus tentans* és a *Chironomus yoshimatui* esetében pedig 23 °C-on, illetve 25 °C-on 1–4 nap). A lárvák fejlődése négy, egyenként 4–8 napig tartó szakaszra osztható. A vizsgálathoz az első fejlődési szakaszban lévő lárvákat kell gyűjteni (2–3 vagy 1–4 nappal a kikelést követően). Az árvaszúnyoglárvák fejlődési szakaszát a fejszélesség alapján ellenőrizhetjük (6).

26. Mindegyik szennyezett üledéket és vizet tartalmazó vizsgálati edénybe húsz darab, tetszőlegesen kiválasztott lárvát helyezünk egy tompa végű pipetta segítségével. A lárvák vizsgálati edénybe helyezésének ideje alatt állítsuk le a víz levegőztetését, és a behelyezést követő 24 órás időszakon keresztül hagyjuk így (lásd a 25. és a 32. bekezdést). Az alkalmazott vizsgálati tervnek (lásd a 19. és a 20. bekezdést) megfelelően az EC pont becsléséhez legalább 60, a NOEC meghatározásához 80 lárvát használjunk koncentrációnként.

A vizsgálathoz használt koncentrációk

27. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációk meghatározásához hasznos lehet behatároló vizsgálatot végezni. E célra a vizsgált anyag koncentrációinak nagy osztásközű sorozatát használjuk. Annak érdekében, hogy az egy árvaszúnyoglárvára jutó felület megfeleljen a vizsgálat végleges változatában alkalmazandó lárvasűrűségnek, a lárvákat annyi ideig tesszük ki a vizsgált anyag egyes koncentrációinak, amely lehetővé teszi a megfelelő vizsgálati koncentrációk becslését anélkül, hogy ismétlésekre lenne szükség.

28. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációkat a behatároló vizsgálat eredménye alapján határozzuk meg. Legalább öt, a 18–20. bekezdésben leírt módszerrel kiválasztott koncentrációt kell használni.

▼M4

Kontroll edények

29. A vizsgálat során a megfelelő ismétlésszám (lásd a 19–20. bekezdést) biztosításához szükséges számú – a vizsgált anyaggal nem szennyezett üledéket tartalmazó – kontroll edényt kell alkalmazni. Ha a vizsgált anyag bevitele oldószer segítségével történt (lásd a 16. bekezdést), akkor az oldószer hatásainak az ellenőrzése céljára külön kontroll edények szükségesek.

Vizsgálati elrendezés

30. Statikus elrendezést alkalmazunk. Kivételes esetekben – például ha a vízminőségi jellemzők nem felelnek meg a vizsgálathoz használt organizmusoknak, vagy befolyásolják a kémiai egyensúlyt (például túlságosan lecsökken az oldott oxigénszint, túlságosan megnő a kiválasztási termékek koncentrációja, vagy ásványi anyagok lúgozódnak ki az üledékből és hatást gyakorolnak a víz pH-jára és/vagy keménységére) – félstatikus vagy átfolyó rendszerű, a fedővíz szakaszos vagy folyamatos cseréjét lehetővé tévő vizsgálati elrendezések is alkalmazható. Mindazonáltal a fedővíz minőségének javítására szolgáló módszerek, így például a levegőztetés, általában elégségesek, és előnyben részesítendők.

Táplálék

31. A lárvákat lehetőség szerint naponta vagy legalább hetente háromszor kell etetni. Az első 10 napban a fiatal lárvák számára megfelelőnek tűnik naponta lárvánként 0,25–0,5 mg (a *C. yoshimatui* esetében 0,35–0,5 mg) haleledelt adni (amely lehet vizes szuszpenzió vagy finomra őrölt eledel, például Tetra-Min vagy Tetra-Phyll; a részleteket lásd a 2. függelékben). Az idősebb lárváknak valamivel több táplálékra lehet szükségük: a vizsgálat hátralevő részében lárvánként naponta 0,5–1 mg mennyiségnek elegendőnek kell lennie. Gombaképződés vagy a lárvák pusztulása esetén a táplálékadagot valamennyi kísérleti és kontroll edényben csökkenteni kell. Ha a gombák szaporodása nem állítható meg, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni. Erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok vizsgálata esetén az organizmusok túlélésének és természetes fejlődésének biztosításához szükséges mennyiségű táplálékot még a stabilizálódás időszaka előtt a mesterséges üledékbe keverhetjük. Erre a célra haleledel helyett növényi anyagot használjunk (például 0,5 % (száraz tömeg) finomra őrölt nagy csalán (*Urtica dioica*), fehér eperfa (*Morus alba*), fehér here (*Trifolium repens*), paraj (*Spinacia oleracea*) levelet vagy más növényi anyagot (*Cerophyl* vagy alfa-cellulóz) adhatunk az üledékhez).

Inkubációs körülmények

32. A lárvák vizsgálati edényekbe történő behelyezését követően lehetőleg 24 órán keresztül finoman levegőztessük a fedővizet, és a vizsgálat egész időtartama alatt biztosítsunk gyenge levegőztetést (ügyelve arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne süllyedjen a levegő telítettségi érték (ASV) 60 százaléka alá. A levegőt az üledékréteg fölött 2–3 cm-rel rögzített üveg Pasteur pipettán keresztül vezessük be (másodpercenként egy vagy néhány buborék). Illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén megfontolandó, hogy az üledék-víz elrendezés levegőztetésétől eltekintsünk.

33. A vizsgálatot 20 °C (± 2 °C) állandó hőmérséklet mellett hajtsuk végre. *C. tentans* használata esetén 23 °C, a *C. yoshimatui* esetében pedig 25 °C az ajánlott hőmérséklet (± 2 °C). 16 órás fényperiódust alkalmazzunk, 500–1 000 lux fényintenzitással.

▼M4

Expozíciós időtartam

34. A kitétel a lárvák szennyezett üledéket tartalmazó, illetve kontroll edényekbe történő behelyezésekor veszi kezdetét. A maximális expozíciós időtartam a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 28 nap, *C. tentans* használata esetén 65 nap. Ha az árvaszúnyogok előbb kikelnek, akkor a vizsgálatot legalább öt nappal azt követően lehet befejezni, hogy a kontroll edényekben az utolsó kifejlett példány megjelent.

Megfigyelések

Kikelés

35. Meg kell határozni a fejlődési időt és a kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számát. A hímek tollas csápjukról könnyen felismerhetők

36. A kísérleti edényekben legalább hetente háromszor kell ellenőrizni a kontroll edényekben megfigyelhetőhöz képest rendellenesnek értékelhető viselkedést (például üledék elhagyása, szokatlan úszás). A kikelés várható időszaka alatt naponta meg kell számolni a kikelt árvaszúnyogokat. Naponta fel kell jegyezni a kikelt kifejlett egyedek nemét és számát. Az azonosítást követően az árvaszúnyogokat ki lehet engedni az edényekből. A vizsgálat befejezése előtt lerakott petecsomókat dokumentálni kell, és az új lárvák üledékbe kerülésének megelőzése érdekében el kell távolítani. Fel kell jegyezni továbbá a ki nem kelt bábok megfigyelhető számát. A kikelés méréséhez az 5. függelék nyújt útmutatást.

Fejlődés és túlélés

37. Ha a lárvák 10 napos túlélési és fejlődési adatait is be kell mutatni, akkor már a vizsgálat kezdetétől fogva a későbbiekben használható kiegészítő kontroll edényeket kell alkalmazni. Az ezekből származó üledéket átszitáljuk egy 250 μm-es szitán, amelyen a lárvák fennmaradnak. Az elhullás kritériumai a mozdulatlanság, illetve a mechanikai ingerekre adott válasz hiánya. A hiányzó lárvákat is elhullottnak kell tekinteni (a vizsgálat elején elpusztult lárvákat a mikroorganizmusok már lebonthatták). Meghatározzuk a túlélő lárvák edényenkénti (elhullott lárvák maradványai nélküli) száraz tömegét, majd kiszámítjuk az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét. A túlélő lárvák fejlődési szakaszának a meghatározása is hasznos; ezt a fejszélesség mérése segítségével tehetjük meg.

Analitikai mérések

A vizsgált anyag koncentrációja

38. A vizsgálat megkezdése (azaz a lárvák behelyezése) előtt kezelésenként legalább egy edényből vegyünk ömlesztett üledék mintát a vizsgált anyag koncentrációjának analitikai meghatározásához az üledékben. A fedővíz, a pórusvíz és az üledék legnagyobb és legkisebb koncentrációnál vett mintáit ajánlott legalább a vizsgálat kezdetén és végén analizálni (lásd a 24. bekezdést). A vizsgált anyag így meghatározott koncentrációja tájékoztatást nyújt a vizsgált anyag viselkedéséről/megoszlásáról a víz-üledék elrendezésben.

39. Ha a vizsgálat közben is végzünk méréseket (például a 7. napon), és az analízishez nagy minták szükségesek, amelyek nem gyűjthetők a kísérleti edényekből anélkül, hogy a mintavétel a vizsgálati elrendezésre hatással lenne, az analitikai meghatározásokat ugyanolyan kezelésnek alávetett (a vizsgálathoz használt organizmusokat is beleértve), de a biológiai megfigyelések céljára nem használt, külön vizsgálati edényekből származó mintákon kell elvégezni

▼M4

40. A pórusvíz elkülönítésére ajánlott módszer például a 10 000 g intenzitással történő centrifugálás 4 °C-on 30 percig. Szűrést is lehet alkalmazni, amennyiben bizonyított, hogy szűrő nem adszorbeálja a vizsgált anyagot. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a koncentráció a pórusvízben.

Fizikai és kémiai paraméterek

41. A kísérleti edények pH-ját és hőmérsékletét megfelelő módon kell mérni (lásd a 10. bekezdést). A vizsgálat kezdetén és végén a legnagyobb koncentrációnál meg kell mérni a víz keménységét és ammónia tartalmát a kontroll edényekben és egy kísérleti edényben.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

42. E vizsgálat célja a vizsgált anyag kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számára és fejlődési ütemére, illetve 10 napos vizsgálat esetében a lárvák túlélésére és súlyára gyakorolt hatásainak a meghatározása. Ha semmi nem utal a nemek statisztikailag eltérő érzékenységére, akkor a hímekre és a nőstényekre vonatkozó eredmények a statisztikai elemzés céljára összevonhatók. Az érzékenység nemek közötti különbségének statisztikai megítélésére például a χ^2-r x 2 próba alkalmazható. Szükség esetén 10 nap elteltével meg kell határozni a lárvák túlélését és az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét.

43. A száraz tömeg alapján meghatározott és kifejezett hatáskoncentrációkat lehetőleg a vizsgálat kezdetén mért üledékkoncentrációk alapján kell kiszámítani (lásd a 38. bekezdést).

44. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x pontbecsléséhez az edényenkénti statisztikákat valódi ismétléseknek kell tekinteni. Bármely EC_x konfidencia intervallumának a kiszámítása során vagy figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, vagy ki kell mutatni, hogy az eltérés elhanyagolható mértékű. Ha a modell mérési pontokhoz illesztéséhez a legkisebb négyzetek módszerét használjuk, akkor a szóráshomogenitás javítása érdekében az edényenkénti statisztikákat transzformálni kell. Az EC_x értékeket az eredeti válaszértékekre való visszatranszformálás után kell kiszámítani.

45. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC hipotézisvizsgálattal történő meghatározása, az edények közötti eltérések figyelembevételére például hierarchikus varianciaanalízist (nested ANOVA) kell végezni. Alternatívaként ennél robosztusabb próbák (21) is helyénvalók lehetnek olyan esetekben, amikor az ANOVA szokásos alapfeltevései nem teljesülnek.

Kikelési arány

46. A kikelési arányok kvantális adatok, amelyek a Cochran-Armitage próbával elemezhetők a lefelé lépegető eljárást alkalmazva, amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és az adatok ennek az elvárásnak megfelelnek. Ha ez nem így van, akkor a Fisher-féle egzakt próbát vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk a p-értékek Bonferroni- vagy Holm-féle eljárással történő korrekciójával. Ha az ugyanazon koncentrációhoz tartozó ismétlések közötti eltérések bizonyítottan nagyobbak, mint amit a binomiális eloszlás indokolna (amelyet gyakran „extra-binomiális” variációnak neveznek), akkor egy robusztus Cochran-Armitage vagy Fisher-féle egzakt próbát kell alkalmazni, mint amilyet például a (21) javasol.

▼M4

Meg kell határozni az egy edényre jutó kikelt árvaszúnyogok számát (ne), majd el kell osztani a behelyezett lárvák számával (na):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

ahol:

ER = kikelési arány

n_e = kikelt árvaszúnyogok egy edényre jutó száma

n_a = behelyezett lárvák egy edényre jutó száma

47. Egy másik, legfőképp nagy minták és extra-binomiális variáció esetén alkalmazható lehetőség, hogy a kikelési arányt folyamatos változóként kezeljük, és amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és ez az elvárás összhangban áll a kapott ER adatokkal, a Williams próbához hasonló eljárást alkalmazunk. Ha a monotonitás nem áll fenn, a Dunnett próbát lehet alkalmazni. A nagy mintát itt úgy értelmezzük, hogy az egy ismétlésre (edényre) jutó kikelt és nem kikelt árvaszúnyogok száma egyaránt meghaladja az ötöt.

48. Az ANOVA módszerek alkalmazásához az ER értékeket először négyzetgyök arkusz-szinusz vagy Freeman-Tukey transzformáció segítségével átalakítjuk, hogy a normálishoz közeli eloszlást kapjunk, és a szórásokat kiegyenlítsük. Abszolút gyakoriságok esetén a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk. A négyzetgyök arkusz-szinusz transzformáció az ER négyzetgyökének az arkusz szinuszát ($\sin^{-1}$) adja.

49. A kikelési arányok meghatározásához regressziós analízissel (vagy például probit (22), logit, Weibull, kereskedelmi forgalomban kapható megfelelő szoftverrel stb.) számítjuk ki az EC_x értékeket. Ha a regressziós analízis alkalmatlannak bizonyul (például kettőnél kevesebb részleges válasz esetén), más nemparaméteres módszert, például mozgóátlag-módszert vagy egyszerű interpolációt használunk.

Fejlődési ütem

50. Az átlagos fejlődési idő a lárvák kísérleti edényekbe történő behelyezésétől (a vizsgálat 0. napjától) az árvaszúnyogok kikeléséig tartó átlagos időtartamot jelenti. (A valódi fejlődési idő kiszámításához figyelembe kell venni a lárvák életkorát a behelyezés időpontjában). A fejlődési ütem a fejlődési idő reciproka (egysége: 1/nap), és a lárvafejlődés egy napra eső részét fejezi ki. Az ilyen jellegű üledék-toxicitási vizsgálatok értékeléséhez inkább a fejlődési ütemet használjuk, mivel kisebb a szórása, homogénebb és a normálishoz közelebb álló eloszlást mutat, mint a fejlődési idő. Ennélfogva a fejlődési ütem hatásosabb paraméteres vizsgálati eljárások alkalmazását teszi lehetővé, mint a fejlődési idő. A folyamatos változónak tekintett fejlődési ütemhez tartozó EC_x értékek becslésére regressziós analízist használunk (például (23), (24)).

51. A következő statisztikai próbákhoz feltételezzük, hogy az x. ellenőrzési napon megfigyelt számú árvaszúnyog az x. nap és az x–1. nap (l = az ellenőrzések közötti intervallum hossza, általában 1 nap) közötti időintervallum közepén kelt ki. Az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütemet a következő képlet szerint számítjuk ki:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

ahol:

$\bar{x}$: egy edényre jutó átlagos fejlődési ütem

i: ellenőrzési intervallum indexe

m: ellenőrzési intervallumok maximális száma

f_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok száma

n_e: kikelt árvaszúnyogok száma összesen a kísérlet végén ($= \sum f_i$)

x_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok fejlődési üteme

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

ahol:

day_i: ellenőrzési nap (a behelyezés óta eltelt napok száma)

l_i: az i ellenőrzési intervallum hossza (napokban kifejezve, általában 1 nap)

Vizsgálati jegyzőkönyv

52. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok (vízoldékonyság, páranyomás, talajra (vagy ha rendelkezésre áll, az üledékre) vonatkozó megoszlási hányados, stabilitás vízben, stb.),

— kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám, stb.,) beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásának analitikai módszerét.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— a vizsgálathoz felhasznált állatok: faj, tudományos elnevezés, az organizmusok származása és tenyésztési körülményei,

— a petecsomók és a lárvák kezelésére vonatkozó információk,

— a vizsgálathoz felhasznált állatok életkora az edényekbe történő behelyezésükkor.

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott üledék, azaz természetes vagy mesterséges üledék,

— természetes üledék esetén az üledékminta gyűjtésének helye és a mintavételi hely leírása, beleértve lehetőség szerint a szennyezés történetét; jellemzők: pH, szerves széntartalom, C/N arány és szemcseszerkezet (ha indokolt),

— a mesterséges üledék előállítása: összetevők és jellemzők (szerves széntartalom, pH, nedvességtartalom, stb. a vizsgálat kezdetén),

— a vizsgálathoz használt víz előállítása (mesterségesen készített víz esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, vezetőképesség, keménység, stb. a vizsgálat kezdetén),

— az üledék és a fedővíz mélysége,

— a fedővíz és a pórusvíz mennyisége; a nedves üledék tömege pórusvízzel és pórusvíz nélkül,

▼M4

— vizsgálati edények (anyag és méret),

— az üledékszennyezés módszere: alkalmazott vizsgálati koncentrációk, ismétlésszám és esetlegesen használt oldószer,

— a szennyezett üledék-víz elrendezés stabilizálódása és egyensúlyi fázisa: időtartam és körülmények,

— inkubációs körülmények: hőmérséklet, fényciklus és intenzitás, levegőztetés (gyakoriság és intenzitás),

— a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét.

Eredmények:

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért vizsgálati koncentrációk és a kísérleti edények vizsgált anyag koncentrációjának a meghatározására használt analízisek eredményei,

— a víz minősége a vizsgálati edényekben, azaz pH, hőmérséklet, oldott oxigén, vízkeménység és ammóniatartalom,

— az elpárolgott víz pótlása a vizsgálati edényekben, ha pótoljuk,

— a kikelt hím és nőstény árvaszúnyogok egy edényre és napra eső száma,

— ki nem kelt lárvák egy edényre jutó száma,

— a lárvák egy edényre és – adott esetben – egy fejlődési szakaszra jutó átlagos száraz tömege,

— ismétlésenkénti és vizsgálati koncentrációnkénti százalékos kikelés (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— kikelt kifejlett árvaszúnyogok ismétlésenkénti és kezelési arányonkénti átlagos fejlődési üteme (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— toxicitási végpontok – például EC_x (és a hozzá tartozó konfidencia intervallum), NOEC és/vagy LOEC – becsült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek,

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In 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, and 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. Kultúra 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) E melléklet C.8. vizsgálati módszere: Toxicitás földigilisztákra.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

(16) Naylor C and 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 and 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 and 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**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

E vizsgálati módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Mesterséges üledék vagy formulázott, kevert vagy műüledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek az imitálására használt anyagok keveréke.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledék felé kerülő víz.

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett üledék: a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett üledék.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

Ajánlások a *Chironomus riparius* tenyésztéséhez

1. Az árvaszúnyoglárvákat kristályosító csészékben vagy nagyobb edényekben tenyésztjük. Az edény aljára szórjunk vékony réteg (kb. 5–10 mm) kvarchomokot. A szilikagél (például Merck, cikkszám: 8117) is megfelelő szubsztrátumnak bizonyult (ebből vékonyabb, pár milliméternyi réteg is elegendő). Ezt követően töltsünk néhány centiméternyi megfelelő vizet az edénybe. A vízszint fenntartása és a kiszáradás megelőzése érdekében szükség szerint pótoljuk az elpárolgott vizet. Cserélhetjük is a vizet, ha kell. Biztosítsunk gyenge levegőztetést. A lárvatenyésztő edényeket tartsuk egy megfelelő ketrecben, amelyből a kikelő kifejlett példányok nem tudnak kiszökni. A ketrecben legyen elég hely a kikelt kifejlett példányoknak a mozgásra, mert ellenkező esetben nem fognak párosodni (minimum kb. 30 × 30 × 30 cm).

2. A ketreceket tartsuk szobahőmérsékleten vagy 20 ± 2 °C állandó hőmérsékletű helyiségben, 16 órán keresztül világosban (fényintenzitás kb. 1 000 lux) és 8 órán keresztül sötétben. Dokumentálták, hogy a 60 % RH alatti légnedvesség gátolhatja a szaporodást.

Hígítóvíz

3. Bármilyen alkalmas természetes vagy művíz használható. Általában kútvizet, klórtalanított csapvizet vagy mesterséges közeget (például Elendt-féle M4 vagy M7 közeget, lásd lentebb) használunk. Használat előtt a vizet levegőztetni kell. Szükség esetén cserélhetjük a tenyésztéshez használt vizet. Ehhez a használt vizet öntsük le vagy szívjuk ki a tenyésztő edényekből ügyelve arra, hogy a lárvák által épített lakócsöveket el ne pusztítsuk.

A lárvák táplálása

4. Az árvaszúnyoglárvákat pehely formájú haleledellel (Tetra Min®, Tetra Phyll® vagy hasonló, védett márkájú haltáppal) etessük, amelyből naponta körülbelül 250 mg-ot adjunk minden edényhez porrá őrölve szárazon vagy vizes szuszpenzióban, amelynek az elkészítéséhez 1,0 g pehely formájú haleledelt keverjünk el 20 ml hígítóvízben úgy, hogy homogén keveréket kapjunk. Ebből a készítményből naponta 5 ml-t adjunk minden edényhez (használat előtt felrázandó). Az idősebb lárvák kaphatnak ennél többet.

5. A táplálék mennyiségét a vízminőséghez kell igazítani. Ha a tenyésztőközeg zavarossá válik, akkor csökkenteni kell a mennyiséget. Az adott táplálék mennyiségét szigorú ellenőrzés alatt kell tartani. Ha túl kevés a táplálék, akkor a lárvák a vízrétegbe vándorolnak, ha túl sok, akkor fokozódik a mikrobatevékenység és csökken az oxigénkoncentráció. Mindkét körülmény a fejlődési ütem lassulását okozhatja.

6. Az újonnan létesített tenyésztő edényekhez zöldalga (például *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) sejtek is adhatók.

A kikelt kifejlett példányok táplálása

7. Egyes kísérletek szerint a kikelt kifejlett példányok számára egy telített cukoroldatba mártott vattakorong szolgálhat táplálékként.

▼M4

Kikelés

8. 20 ± 2 °C hőmérsékleten a kifejlett példányok körülbelül 13–15 nap elteltével kezdenek megjelenni a lárvatenyésztő edényekben. A hímek tollas csápjuk alapján könnyen megkülönböztethetők.

Petecsomók

9. Miután a kifejlett példányok megjelentek a tenyésztőketrecben, a lárvatenyésztő edényekben hetente háromszor ellenőrizni kell a lerakott zselatinszerű petecsomókat, amelyeket gondosan el kell távolítani, és át kell helyezni egy tenyésztővíz-mintát tartalmazó kisméretű edénybe. A petecsomókat új tenyészetek létrehozására (például 2–4 petecsomó/edény) vagy toxicitási vizsgálatok céljára használjuk fel.

10. Az első fejlődési szakaszban lévő lárváknak 2–3 napon belül kell kikelniük.

Új tenyészetek létesítése

11. A stabil tenyészetekből hetente vagy – a vizsgálati követelményektől függően – ritkábban friss lárvatenyészetek hozhatók létre, miközben a régebbi edényeket a kifejlett árvaszúnyogok megjelenését követően eltávolítjuk. Ezzel a rendszerrel minimális kezelést igénylő módon biztosítható a kifejlett példányok rendszeres utánpótlása.

A vizsgálathoz használt »M4« és »M7« oldatok előállítása

12. Az »M4« közeg leírása Elendt (1990) munkájában megtalálható. Az »M7« közeg ugyanúgy készül, mint az »M4«, azzal a különbséggel, hogy az 1. táblázatban feltüntetett anyagok koncentrációja az »M7« esetében négyszer alacsonyabb, mint az »M4« készítésekor. Az »M7« közegről szóló publikáció előkészületben van (Elendt, személyes közlés). A vizsgálathoz használt oldatot azért nem Elendt és Bias (1990) szerint kell előállítani, mert a törzsoldatok elkészítéséhez megadott NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 és K2HPO4 koncentrációk nem megfelelők.

Az »M7« közeg előállítása

13. Az (I) törzsoldatok mindegyikét külön kell elkészíteni, majd az (I) törzsoldatokból egy (II) kombinált törzsoldatot készítünk (lásd az 1. táblázatot). Az »M7« közeg előállításához a (II) kombinált törzsoldat 50 ml-ét és az egyes makrotápanyagok törzsoldatainak a 2. táblázatban megadott mennyiségeit ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk. Vitamin-törzsoldatot készítünk, amelyhez három vitamint ionmentesített vízhez adunk a 3. táblázatban meghatározottak szerint, majd röviddel a felhasználás előtt az »M7« közeghez adunk 0,1 ml-t a kombinált vitamin törzsoldatból. (A vitamin-törzsoldatot kis aliquot részekben, fagyasztott állapotban kell tartani). A közeget levegőztetni és stabilizálni kell.

SZAKIRODALOM

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

▼M4

1. táblázat

Nyomelemek törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

(I) törzsoldatok	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A (II) kombinált törzsoldat előállításához az (I) törzsoldatok következő mennyiségeit (ml) elegyítjük és ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk		Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt oldatban (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
KI	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) Ezeknek az anyagoknak az esetében a fent jelzett módon eltér az M4 és az M7.
(2) Ezeket az oldatokat külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.

2. táblázat

Makrotápanyagok törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Makrotápanyagok törzsoldatainak M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (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**

3. táblázat

Vitamin-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez. A három vitaminoldatból egyetlen kombinált vitamin-törzsoldatot készítünk

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Vitamin- törzsoldat M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

SZAKIRODALOM

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* Kultúrad in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Kultúra Conditions on LIFE History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3. függelék

MESTERSÉGES ÜLEDÉK KÉSZÍTÉSE

Az üledék összetétele

A mesterséges üledék összetétele a következő:

Összetevő	Jellemzők	Üledék száraz tömegének %-a
Tőzeg	Tőzegmoha, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5-6,0 értékhez, és nem tartalmaz látható növény-maradványokat, finomra őrölve (részecskeméret ≤ 1 mm) és levegőn szárítva	4 - 5
Kvarchomok	Szemcseméret: a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban	75 - 76
Kaolinit agyag	Kaolinit tartalom ≥ 30 %	20
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	2 (± 0,5)
Kalcium-karbonát	Porított, vegytiszta $CaCO_3$	0,05 - 0,1
Víz	Vezetőképesség ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Elkészítés

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őröljük. Nagyteljesítményű homogenizáló készülék segítségével ionmentesített vízzel szuszpenziót készítünk a szükséges mennyiségű tőzegporból. A szuszpenzió pH-ját $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 5,5 ± 0,5 értékre. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása végett 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk a szuszpenziót. Az ezt követően ismét megmért pH-nak 6,0 ± 0,5 értéket kell mutatnia. Ezek után a szuszpenziót összekeverjük a többi összetevővel (homok és kaolinagyag), valamint az ionmentesített vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjunk. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételten megmérjük, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 6,5–7,5 értékre. Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ezt követően az árvaszúnyogokkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott a mesterséges üledéket hét napig a vizsgálatban használni kívántakkal megegyező körülmények között kondicionálni.

Tárolás

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az összeállított (nedves) üledék a vizsgálatban való felhasználás előtt nem tárolható. Az előállításának záró lépését képező 7 napos kondicionálási időszakot követően azonnal fel kell használni.

SZAKIRODALOM

E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

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

4. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

Anyag	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 μg/l
Keménység $CaCO_3$ koncentrációban kifejezve	< 400 mg/l (*)
Maradék klór	< 10 μg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

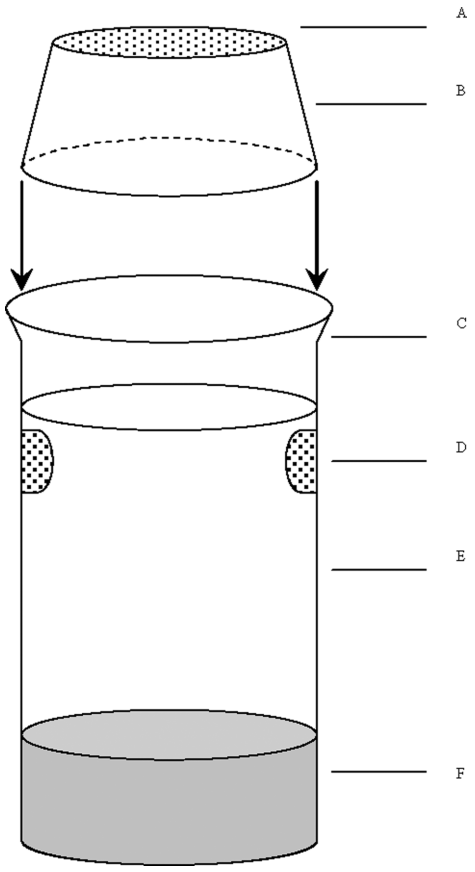
(*) Meg kell azonban jegyezni, hogy ha a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között gyaníthatóan kölcsönhatás alakul ki, akkor lágyabb vizet kell alkalmazni (és ezért az Elendt-féle M4 közeg ilyen esetben nem alkalmazható).

▼**M4**

5. függelék

Útmutató az árvaszúnyoglárvák kikelésének figyelemmel kíséréséhez

A vizsgálati edényekre csapdákat helyezünk a kikelt példányok számára. A csapdák a 20. naptól a vizsgálat végéig szükségesek. Ezek egy példáját mutatja be az alábbi ábra:



A: nylon háló

B: fejjel lefelé fordított műanyagpohár

C: vizsgálati edény, kiöntő nélkül

D: hálós vízcserélő nyílás

E: víz

F: üledék

▼M4

C.28. SZENNYEZETT VÍZZEL VÉGZETT ÜLEDÉK-VÍZ TOXICITÁSI VIZSGÁLAT ÁRVASZÚNYOGLÁRVÁKKAL

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 219. vizsgálati iránymutatásában (2004) leírt módszerrel. E vizsgálati módszer célja a kétszárnyúak rendjébe tartozó édesvízi üledéklakó árvaszúnyoglárvák vegyi anyagoknak való tartós kitettsége hatásainak az értékelése. Főként a BBA mesterséges talajjal és vízoszlopban való expozíciós forgatókönyvvel végzett üledék-víz vizsgálati elrendezésre vonatkozó iránymutatásán alapul (1). Figyelembe veszi továbbá a *Chironomus riparius* és *Chironomus tentans* árvaszúnyog fajokkal végzett toxicitás vizsgálati protokollokat, amelyeket Európában és Észak-Amerikában (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8) dolgoztak ki, és körvizsgálatnak vetettek alá (1)(6)(9). Más jól dokumentált árvaszúnyog fajok, például *Chironomus yoshimatsui* (10)(11) is használhatók.

2. A vizsgálati módszer által alkalmazott expozíciós forgatókönyv a víz szennyezése. A megfelelő expozíciós forgatókönyv a vizsgálat tervezett felhasználásától függ. A vízoszlopban való expozíción alapuló forgatókönyv a vízoszlop szennyezését foglalja magában, amely a növényvédő szerek permetezéssel történő vízbe jutását hivatott szimulálni, és a pórusvízben mérhető kezdeti csúcskoncentrációkra terjed ki. A vizsgálat időtartamánál hosszabb ideig tartó felhalmozódással járó folyamatok kivételével más típusú expozíciók (többek között a vegyi anyagok kiömlése) esetén is hasznos.

3. Az anyagok, amelyek üledéklakó organizmusokra gyakorolt hatását vizsgálni kell, általában hosszú ideig maradnak ebben a környezetben. Az üledéklakó organizmusok többféle módon lehetnek kitéve ezeknek az anyagoknak. Az egyes expozíciós útvonalak viszonylagos fontossága és a teljes toxikus hatás egyes expozíciós útvonalaknak tulajdonítható részének kialakulásához szükséges időtartam az érintett vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól függ. Az erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok esetében fontos expozíciós útvonal lehet a szennyezet táplálék megemésztése. Az erősen lipofil anyagok toxicitása alulbecsülésének elkerülése érdekében megfontolandó, hogy a táplálékot a vizsgált anyaggal való szennyezést megelőzően az üledékbe keverjük. Az itt bemutatott vizsgálati módszer a tartós kitettségre épül, amely azt a célt szolgálja, hogy valamennyi lehetséges expozíciós útvonal figyelembe vehető legyen. A vizsgálat időtartama a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 20–28 nap, a *C. tentans* esetében 28–65 nap. Ha egy meghatározott célra – például instabil vegyületek hatásainak a vizsgálatára – rövid távú adatok kellenek, a felesleges ismétlések tíz nap után eltávolíthatók.

4. A mért végpontok a kikelt kifejlett példányok száma és a kikeléshez szükséges idő. Ha kiegészítő rövid távú adatokra van szükség, akkor a lárvák túlélésének és fejlődésének mérését csak a tíznapos időszak eltelte után ajánlott megkezdeni, megfelelő számú ismétlést alkalmazva.

5. Mesterséges üledék használata ajánlott. A mesterséges üledék számos előnnyel rendelkezik a természetes üledékkel szemben:

— a kísérlet változékonysága kisebb, mivel a mesterséges üledék egy reprodukálható „szabványosított közeget” biztosít, és nem kell szennyezésmentes, tiszta üledékforrást keresni,

— a vizsgálatok bármikor elkezdhetők anélkül, hogy a vizsgálathoz használt üledék szezonális változékonyságát figyelembe kellene venni, és az üledéket nem kell előzetes kezelésnek alávetni a honos fauna eltávolítása végett; a mesterséges üledék alkalmazása a rutinvizsgálatokhoz szükséges mennyiségű üledék terepen történő gyűjtésével kapcsolatos költségeket is csökkenti,

▼M4

— a mesterséges üledék alkalmazása lehetővé teszi a különböző anyagok toxicitásának összehasonlítását és ennek megfelelő rangsorolását: a természetes és a mesterséges üledékkel végzett vizsgálatokból származó toxicitási adatok számos vegyi anyag esetében összehasonlíthatók voltak (2).

6. A használt fogalmak meghatározását az 1. függelék tartalmazza.

A VIZSGÁLAT ELVE

7. Első fejlődési szakaszban lévő árvaszúnyoglárvákat teszünk ki a vizsgált anyag különböző koncentrációinak üledék-víz elrendezésekben. A vizsgálat kezdetén első fejlődési szakaszban lévő lárvákat helyezünk az üledék-víz elrendezést tartalmazó vizsgálati edényekbe, majd ezt követően a vizsgált anyaggal szennyezzük a vizet. Az árvaszúnyoglárvák kikelésének és fejlődésének ütemét a vizsgálat végén mérjük. Szükség esetén 10 nap elteltével is mérhetjük a lárvák túlélését és súlyát (megfelelő számú ismétlést alkalmazva). A kapott adatokból regressziós modell segítségével megbecsüljük azt a koncentrációt, amely a kikelésnek vagy a lárvák túlélésének, illetve fejlődésének x %-os csökkenését okozná (például EC_{15}, EC_{50}, stb.), vagy statisztikai hipotézisvizsgálattal meghatározzuk a megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt, illetve a megfigyelhető hatást okozó legkisebb koncentrációt (NOEC/LOEC). Az utóbbi esetben a hatást okozó értékeket statisztikai vizsgálatok segítségével össze kell hasonlítani a kontroll értékekkel.

A VIZSGÁLT ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

8. Ismerni kell a vizsgált anyag vízoldékonyságát, páranyomását, mért vagy számított megoszlását az üledékben, valamint stabilitását vízben és az üledékben. Rendelkezni kell egy megbízható analitikai módszerrel a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásához a fedővízben, a pórusvízben és az üledékben, amelynek pontossága és kimutatási határa ismert és dokumentált. Hasznos információ a vizsgált anyag szerkezeti képlete és kémiai tisztasága. Ugyancsak hasznos információ, hogy milyen kémiai folyamatokon megy keresztül a vizsgált anyag (például disszipáció, nem biológiai és biológiai lebomlás, stb.). A vizsgálat elvégzését megnehezítő fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező anyagok vizsgálatára vonatkozóan a szakirodalom (12) nyújt további tájékoztatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

9. A vizsgálati protokoll és a vizsgálati körülmények megbízhatóságának megerősítése céljából rendszeres időközönként érdemes referencia-vegyianyagokkal elvégezni a vizsgálatot. Körvizsgálatokban és validálási vizsgálatokban eredményesen használt mérgező referenciaanyagok például a következők: lindane, trifluralin, pentaklórfenol, kadmium-klorid és a kálium-klorid (1)(2)(5)(6)(13).

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

10. A következő feltételeknek kell teljesülniük ahhoz, hogy a vizsgálat érvényes legyen:

— A lárvák kikelésének aránya a kontroll edényekben legalább 70 % a vizsgálat végén (1)(6).

— A kontroll edényekben 12–23 nappal a behelyezést követően kell megjelenniük a kifejlett *C. riparius* és *C. yoshimatsui* példányoknak; a *C. tentans* esetében ehhez 20–65 nap szükséges.

— A vizsgálat végén mindegyik edényben meg kell mérni a pH-t és az oldott oxigén koncentrációját. Az oxigénkoncentrációnak a levegő alkalmazott hőmérséklet melletti telítettségi értéke (ASV) legalább 60 %-ának kell lennie, a fedővíz pH-értékének pedig minden edényben a 6–9 tartományon belülre kell esnie.

▼M4

— a víz hőmérséklete legfeljebb ± 1,0 °C-kal változhat. A vízhőmérséklet szabályozásának egyik lehetséges módja, hogy a vizsgálatot állandó hőmérsékletű helyiségben végezzük, amely esetben a helyiség hőmérsékletét megfelelő időközönként ellenőrizni kell.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Vizsgálati edények

11. A vizsgálatot 600 ml-es üvegedényekben végezzük, amelyek átmérője 8 cm. Amennyiben az üledék és a fedővíz megfelelő mélysége biztosított, ettől eltérő edények is alkalmazhatók. Lárvánként 2–3 cm^2 nagyságú üledékfelületet kell biztosítani. Az üledékréteg és a fedővíz mélységének aránya 1:4 legyen. A vizsgálati edényeknek és a vizsgálati elrendezéssel érintkező egyéb készülékeknek teljes mértékben üvegből vagy más kémiailag semleges anyagból (például teflon) kell készülniük.

A fajok kiválasztása

12. A vizsgálatot lehetőleg a *Chironomus riparius* fajjal végezzük. *Chironomus tentans* is alkalmazható, de nehezebben kezelhető, és hosszabb vizsgálati időszakot igényel. *Chironomus yohimatsui* szintén használható. A 2. függelékben részletezett tenyésztési módszerek a *Chironomus riparius* fajra vonatkoznak. A szakirodalomban más fajok – úgymint a *Chironomus tentans* (4) és a *Chironomus yoshimatsui* (11) – tenyésztési körülményeire vonatkozó tudnivalók is megtalálhatók. A vizsgálat megkezdése előtt ellenőrzésképpen fajmeghatározást kell végezni, de ha a példányok saját tenyészetből származnak, akkor ezt nem szükséges minden vizsgálat előtt megtenni.

Üledék

13. Lehetőleg mesterséges üledék (más néven formulázott, kevert vagy műüledék) használata ajánlott. Ha azonban mégis természetes üledéket használunk, akkor azt jellemezni kell (legalább a pH-t és a szerves széntartalmat meg kell határozni, de más paraméterek, például a C/N arány és a szemcseszerkezet vizsgálata is ajánlott), és mentesnek kell lennie mindenféle szennyezéstől, valamint az árvaszúnyoggal versengő vagy az azt fogyasztó egyéb organizmusoktól. Az árvaszúnyoglárvákkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott továbbá a természetes üledéket az elkövetkező vizsgálat során uralkodókkal megegyező körülmények között hét napon keresztül kondicionálni. E vizsgálat során az alábbi, a C.8. vizsgálati módszerben (14) alkalmazott mesterséges talajon alapuló mesterséges üledék alkalmazása ajánlott (1)(15)(16):

a) 4–5 % (száraz tömeg) tőzeg, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5–6,0 értékhez; fontos, hogy por alakú, finomra őrölt (részecskeméret ≤ 1 mm) és kizárólag levegőn szárított tőzeget használjunk.

b) 20 % (száraz tömeg) kaolinagyag (lehetőleg 30 % feletti kaolinit tartalommal).

c) 75–76 % (száraz tömeg) kvarchomok (túlnyomó részben finom homok, amely részecskéinek több mint 50 %-a 50 és 200 μm közötti szemcseméretttel rendelkezik).

d) Annyi ionmentesített víz, amely ahhoz szükséges, hogy végtermékként 30-50 % nedvességtartalmú keveréket kapjunk.

e) A végtermékként kapott üledékkeverék pH-jának 7,0 ± 0,5 értékre történő beállításához szükséges mennyiségű vegytiszta minőségű kalcium-karbonát ($CaCO_3$).

f) A végtermékként kapott keveréknek 2 % (±0,5 %) szerves széntartalommal kell rendelkeznie, amelyet az a) és c) pont szerinti megfelelő mennyiségű tőzeg és homok hozzáadásával érünk el.

▼M4

14. A tőzegnek, a kaolinagyagnak és a homoknak ismert forrásból kell származnia. Ellenőrizni kell, hogy az üledék összetevőiben nem fordulnak elő kémiai szennyeződések (például nehézfémek, szerves klórvegyületek, szerves foszforvegyületek, stb.) A mesterséges üledék elkészítésének egy példáját a 3. függelék mutatja be. Száraz összetevők keverése is elfogadott, amennyiben bizonyítható, hogy a fedővíz hozzáadását követően az üledék nem esik szét összetevőire (például a vízben lebegő tőzegrészecskékre), és a tőzeget vagy az üledéket megfelelően kondicionáltuk.

Víz

15. Az elfogadható hígítóvíz 2. és 4. függelékben felsorolt kémiai tulajdonságaival rendelkező bármely víz alkalmas a vizsgálathoz. Tenyésztővízként és kísérleti vízként bármely alkalmas víz, természetes víz (felszíni vagy talajvíz), mesterséges víz (lásd a 2. függeléket) vagy klórtalanított csapvíz elfogadható, amelyben az árvaszúnyoglárvák a tenyésztés és a vizsgálat időszaka alatt életben maradnak anélkül, hogy stressz jeleit mutatnák. A vizsgálat kezdetén a vizsgálathoz alkalmazott víz pH-értékének 6 és 9 között kell lennie, keménysége pedig nem haladhatja meg a 400 mg/l $CaCO_3$ értéket. Ennél lágyabb vizet kell azonban alkalmazni akkor, ha gyanítható, hogy a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között kölcsönhatás alakul ki (és ezért ebben az esetben az Elendt-féle M4 közeg nem alkalmazható). A vizsgálat teljes időtartama alatt ugyanazt a víztípust kell használni. A 4. függelékben felsorolt vízminőségi jellemzőket évente legalább kétszer kell mérni, illetve minden olyan alkalommal, amikor fennáll a gyanúja annak, hogy e jellemzők jelentős mértékben megváltoztak.

Törzsoldatok – szennyezett víz

16. A vizsgálathoz használt koncentrációk kiszámítása a vízoszlopban, azaz az üledék feletti vízrétegben mérhető koncentrációk alapján történik. A vizsgálathoz használt, választott koncentrációjú oldatokat általában törzsoldat hígításával készítjük. A törzsoldatokat lehetőség szerint a vizsgált anyag vizsgálathoz használt közegben való feloldásával kell elkészíteni. Egyes esetekben oldószer vagy diszpergálószer használatára lehet szükség a megfelelő töménységű törzsoldat előállításához. Alkalmas oldószerek például a következők: aceton, etanol, metanol, etilénglikol-dimetiléter, dimetilformamid és trietilén-glikol. A felhasználható diszpergálószerek: Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulóz (0,01 %-os) és HCO-40. Az oldódást segítő szer csak minimális (azaz $\leq$ 0,1 ml/l) koncentrációban lehet jelen a végtermékként kapott, vizsgálathoz használandó közegben, és minden kezeléshez ugyanazt a szert kell használni. Az oldódást segítő szer nem lehet jelentős hatással a túlélésre, és nem lehet látható hátrányos hatása az árvaszúnyoglárvákra a csak oldószerrel kezelt kontrollcsoporttal végzett vizsgálat által feltártak alapján.

A VIZSGÁLAT MEGTERVEZÉSE

17. A vizsgálat megtervezése a vizsgálat során alkalmazott koncentrációk számának és osztásközének, az egyes koncentrációkkal használt edények számának, valamint a lárvák edényenkénti számának a megválasztását jelenti. Ideális esetben a vizsgálatot az alábbiakra tekintettel kell megtervezni. Az EC pontnak és a NOEC becslésének, valamint a határérték-vizsgálatnak a megtervezését ismertetjük. A hipotézisvizsgálat elsődleges módszere a regressziós analízis.

A regressziós analízis megtervezése

18. A vizsgálat során alkalmazott koncentrációknak le kell fedniük a hatáskoncentrációt (például EC_{15}, EC_{50}) és azt a koncentrációtartományt, amelyen belül a vizsgált anyag érdeklődésre számot tartó hatással rendelkezik. A hatáskoncentráció becsléseknek (EC_x) a pontossága és különösképpen az érvényessége általában jobb, ha a hatáskoncentráció a vizsgált koncentrációtartományon belül helyezkedik el. A lehető legkisebb pozitív koncentrációnál jóval

▼M4

alacsonyabb és a legnagyobb koncentrációnál jóval magasabb értékek extrapolálását kerülni kell. Az alkalmazandó koncentrációtartomány kiválasztásához hasznos lehet előzetes behatároló vizsgálatot végezni (lásd 27. bekezdés).

19. Az EC_x becsléséhez legalább öt koncentrációt kell vizsgálni, és mindegyik koncentráció esetében három ismétlést kell alkalmazni. A jó modellbecslés lehetővé tétele érdekében minden esetben tanácsos elegendő vizsgálati koncentrációt használni. A rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek (kivételt képeznek azok az esetek, amikor a dózis-válasz görbe lapos). Az eltérő választ kiváltó vizsgálati koncentrációk számának emelkedése esetén az egyes kezeléseknél alkalmazott ismétlésszám csökkenthető. Az ismétlésszám növelése vagy a vizsgálat során alkalmazott koncentráció intervallum szűkítése általában a konfidencia intervallum csökkenéséhez vezet. A lárvák tíznapos túlélési arányának és fejlődési sebességének a becslése esetén további ismétlések szükségesek.

A NOEC/LOEC becslésének megtervezése

20. A LOEC/NOEC becsléséhez öt koncentrációt kell vizsgálni legalább négy ismétlést alkalmazva úgy, hogy a rákövetkező koncentráció legfeljebb kétszerese legyen az előzőnek. Az ismétlések számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel kimutasson egy statisztikai próba. A fejlődési ütem esetében általában varianciaanalízist (ANOVA), például Dunnett vagy Williams próbát (17)(18)(19)(20) lehet alkalmazni. Ha a kikelési arányt vizsgáljuk, akkor a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni-féle korrekcióval) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk.

Határérték-vizsgálat

21. Határérték-vizsgálatot akkor lehet végezni (egy vizsgálati és egy kontroll koncentrációval), ha az előzetes behatároló vizsgálat során nem voltak megfigyelhető hatások. A határérték-vizsgálat célja annak jelzése, hogy a vizsgált anyagra vonatkozó toxikus érték nagyobb, mint a vizsgált koncentrációs határérték. Ennél a vizsgálati módszernél nem lehet meghatározni az ajánlott koncentrációt; ez a szabályozók megítélésétől függ. Általában mind a kezelés, mind a kontroll esetében legalább hat ismétlés szükséges. Bizonyítni kell, hogy a kontrollhoz viszonyított 20 %-os különbséget 5 %-os szignifikancia-szint (p = 0,05) mellett megfelelő valószínűséggel képes kimutatni egy statisztikai próba. Metrikus válasz (fejlődési ütem és súly) esetén alkalmas statisztikai módszer a t-próba, ha az adatok az alkalmazási feltételeknek (normalitás, szóráshomogenitás) megfelelnek. Ha a feltételek nem teljesülnek, akkor a nem egyenlő szórásnégyzeteket feltételező t-próba vagy egy nemparaméteres próba, például a Wilcoxon-Mann-Whithey próba alkalmazható.

ELJÁRÁS

Expozíciós körülmények

A szennyezett víz – üledék elrendezés előállítása

22. A vizsgálati edényekbe megfelelő mennyiségű mesterséges üledéket (lásd a 3. függelék 13–14. bekezdéseit) helyezünk úgy, hogy az üledékréteg legalább 1,5 cm legyen. 6 cm mélységig vizet adunk hozzá (lásd a 15. bekezdést). Az üledékréteg és a víz mélységének az aránya legfeljebb 1:4 lehet, és az üledékréteg mélysége nem haladhatja meg a 3 cm-t. A vizsgálathoz használt organizmusok behelyezése előtt hét napon keresztül finoman levegőztessük az üledék-víz elrendezés (lásd a 14. bekezdést és a 3. függeléket). Annak elkerülése érdekében, hogy a vizsgálathoz használt víz hozzáadása során az üledék összetevőire essen szét, és a finom anyag a vízrétegben felkavarodjon, az üledéket letakarhatjuk egy műanyag lappal, miközben a vizet ráöntjük, amelyet közvetlenül a felöntést követően eltávolítunk. Erre a célra más eszközök is alkalmasak lehetnek.

▼M4

23. A vizsgálati edényeket le kell fedni (például üveglappal). Az eredeti vízszint fenntartása érdekében a vizsgálat során pótoljuk az elpárolgott vizet, ha szükséges. A sófelhalmozódás elkerülése végett desztillált vagy ionmentesített vizet használjunk.

A vizsgálathoz használt organizmusok hozzáadása

24. A vizsgálathoz használt organizmusok vizsgálati edényekbe történő behelyezése előtt négy-öt nappal helyezzük a tenyészetből gyűjtött petecsomókat tenyésztőközeget tartalmazó kisméretű edényekbe. A törzstenyészetből vett vagy frissen készített tenyésztőközeg egyaránt használható. Ez utóbbi használata esetén adjunk a tenyésztőközeghez kis mennyiségű táplálékot, például zöldalgát és/vagy finomra őrölt pehely formájú haleledelből készített szuszpenzió szüredékéből néhány cseppet (lásd a 2. függeléket). Csak frissen lerakott petecsomókat szabad használni. A lárvák általában néhány nappal a peterakást követően kezdenek kikelni (a *Chironomus riparius* esetében ez 20 °C-on 2–3 nap, a *Chironomus tentans* és a *Chironomus yoshimatui* esetében pedig 23 °C-on, illetve 25 °C-on 1–4 nap). A lárvák fejlődése négy, egyenként 4–8 napig tartó szakaszra osztható. A vizsgálathoz az első fejlődési szakaszban lévő lárvákat kell gyűjteni (2–3 vagy 1–4 nappal a kikelést követően). Az árvaszúnyoglárvák fejlődési szakaszát a fejszélesség alapján ellenőrizhetjük (6).

25. Mindegyik szennyezett üledéket és vizet tartalmazó vizsgálati edénybe húsz darab, tetszőlegesen kiválasztott lárvát helyezünk egy tompa végű pipetta segítségével. A lárvák vizsgálati edénybe helyezésének ideje alatt állítsuk le a víz levegőztetését, és a behelyezést követő 24 órás időszakon keresztül hagyjuk így (lásd a 24. és a 32. bekezdést). Az alkalmazott vizsgálati tervnek (lásd a 19. és a 20. bekezdést) megfelelően az EC pont becsléséhez legalább 60, a NOEC meghatározásához 80 lárvát használjunk koncentrációnként.

26. Huszonnégy órával a lárvák behelyezését követően a vizsgált anyaggal szennyezzük a fedővíz-réteget, és ismét gyenge levegőztetést biztosítunk. Pipettával kis mennyiséget juttatunk a vízfelszín alá a vizsgált anyag oldatából. Ezt követően a fedővizet gondosan megkeverjük, ügyelve arra, hogy az üledék ne kavarodjon fel.

A vizsgálathoz használt koncentrációk

27. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációk meghatározásához hasznos lehet behatároló vizsgálatot végezni. E célra a vizsgált anyag koncentrációinak nagy osztásközű sorozatát használjuk. Annak érdekében, hogy az egy árvaszúnyoglárvára jutó felület megfeleljen a vizsgálat végleges változatában alkalmazandó lárvasűrűségnek, a lárvákat annyi ideig tesszük ki a vizsgált anyag egyes koncentrációinak, amely lehetővé teszi a megfelelő vizsgálati koncentrációk becslését anélkül, hogy ismétlésekre lenne szükség.

28. A vizsgálat végleges változatában használt koncentrációkat a behatároló vizsgálat eredménye alapján határozzuk meg. Legalább öt, a 18–20. bekezdésben leírt módszerrel kiválasztott koncentrációt kell használni.

Kontroll edények

29. A vizsgálat során a megfelelő ismétlésszám (lásd a 19–20. bekezdést) biztosításához szükséges számú – csak üledéket, a vizsgált anyagot viszont nem tartalmazó – kontroll edényt kell alkalmazni. Ha a vizsgált anyag bevitele oldószer segítségével történt (lásd a 16. bekezdést), akkor az oldószer hatásainak az ellenőrzése céljára külön kontroll edények szükségesek.

▼M4

Vizsgálati elrendezés

30. Statikus elrendezést alkalmazunk. Kivételes esetekben – például ha a vízminőségi jellemzők nem felelnek meg a vizsgálathoz használt organizmusoknak, vagy befolyásolják a kémiai egyensúlyt (például túlságosan lecsökken az oldott oxigénszint, túlságosan megnő a kiválasztási termékek koncentrációja, vagy ásványi anyagok lúgozódnak ki az üledékből és hatást gyakorolnak a víz pH-jára és/vagy keménységére) – félstatikus vagy átfolyó rendszerű, a fedővíz szakaszos vagy folyamatos cseréjét lehetővé tévő vizsgálati elrendezések is alkalmazható. Mindazonáltal a fedővíz minőségének javítására szolgáló módszerek, így például a levegőztetés, általában elégségesek, és előnyben részesítendők.

Táplálék

31. A lárvákat lehetőség szerint naponta vagy legalább hetente háromszor kell etetni. Az első 10 napban a fiatal lárvák számára megfelelőnek tűnik naponta lárvánként 0,25–0,5 mg (a *C. yoshimatui* esetében 0,35–0,5 mg) haleledelt adni (amely lehet vizes szuszpenzió vagy finomra őrölt eledel, például Tetra-Min vagy Tetra-Phyll; a részleteket lásd a 2. függelékben). Az idősebb lárváknak valamivel több táplálékra lehet szükségük: a vizsgálat hátralevő részében lárvánként naponta 0,5–1 mg mennyiségnek elegendőnek kell lennie. Gombaképződés vagy a lárvák pusztulása esetén a táplálékadagot valamennyi kísérleti és kontroll edényben csökkenteni kell. Ha a gombák szaporodása nem állítható meg, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni. Erősen adszorbeálódó (például log K_{ow} > 5) vagy az üledékbe kovalens kötéssel beépülő anyagok vizsgálata esetén az organizmusok túlélésének és természetes fejlődésének biztosításához szükséges mennyiségű táplálékot még a stabilizálódás időszaka előtt a mesterséges üledékbe keverhetjük. Erre a célra haleledel helyett növényi anyagot használjunk (például 0,5 % finomra őrölt nagy csalán (*Urtica dioica*), fehér eperfa (*Morus alba*), fehér here (*Trifolium repens*), paraj (*Spinacia oleracea*) levelet vagy más növényi anyagot (*Cerophyl* vagy alfa-cellulóz) adhatunk az üledékhez).

Inkubációs körülmények

32. A lárvák vizsgálati edényekbe történő behelyezését követően lehetőleg 24 órán keresztül finoman levegőztessük a fedővizet, és a vizsgálat egész időtartama alatt biztosítsunk gyenge levegőztetést (ügyelve arra, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne süllyedjen a levegő telítettségi érték (ASV) 60 %-a alá. A levegőt az üledékréteg fölött 2–3 cm-rel rögzített üveg Pasteur pipettán keresztül vezessük be (másodpercenként egy vagy néhány buborék). Illékony vegyi anyagok vizsgálata esetén megfontolandó, hogy az üledék-víz elrendezés levegőztetésétől eltekintsünk.

33. A vizsgálatot 20 °C (± 2 °C) állandó hőmérséklet mellett hajtsuk végre. *C. tentans* használata esetén 23 °C, a *C. yoshimatui* esetében pedig 25 °C az ajánlott hőmérséklet (± 2 °C). 16 órás fényperiódust alkalmazzunk, 500–1 000 lux fényintenzitással.

Expozíciós időtartam

34. A kitétel a lárvák szennyezett vizet tartalmazó, illetve kontroll edényekbe történő behelyezésekor veszi kezdetét. A maximális expozíciós időtartam a *C. riparius* és a *C. yoshimatsui* esetében 28 nap, *C. tentans* használata esetén 65 nap. Ha az árvaszúnyogok előbb kikelnek, akkor a vizsgálatot legalább öt nappal azt követően lehet befejezni, hogy a kontroll edényekben az utolsó kifejlett példány megjelent.

MEGFIGYELÉSEK

Kikelés

35. Meg kell határozni a fejlődési időt és a kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számát. A hímek tollas csápjukról könnyen felismerhetők

▼M4

36. A kísérleti edényekben legalább hetente háromszor kell ellenőrizni a kontroll edényekben megfigyelhetőhöz képest rendellenesnek értékelhető viselkedést (például üledék elhagyása, szokatlan úszás). A kikelés várható időszaka alatt naponta meg kell számolni a kikelt árvaszúnyogokat. Naponta fel kell jegyezni a kikelt kifejlett egyedek nemét és számát. Az azonosítást követően az árvaszúnyogokat ki lehet engedni az edényekből. A vizsgálat befejezése előtt lerakott petecsomókat dokumentálni kell, és az új lárvák üledékbe kerülésének megelőzése érdekében el kell távolítani. Fel kell jegyezni továbbá a ki nem kelt bábok megfigyelhető számát. A kikelés méréséhez az 5. függelék nyújt útmutatást.

Fejlődés és túlélés

37. Ha a lárvák 10 napos túlélési és fejlődési adatait is be kell mutatni, akkor már a vizsgálat kezdetétől fogva a későbbiekben használható kiegészítő kontroll edényeket kell alkalmazni. Az ezekből származó üledéket átszitáljuk egy 250 μm-es szitán, amelyen a lárvák fennmaradnak. Az elhullás kritériumai a mozdulatlanság, illetve a mechanikai ingerekre adott válasz hiánya. A hiányzó lárvákat is elhullottnak kell tekinteni (a vizsgálat elején elpusztult lárvákat a mikroorganizmusok már lebonthatták). Meghatározzuk a túlélő lárvák edényenkénti (elhullott lárvák maradványai nélküli) száraz tömegét, majd kiszámítjuk az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét. A túlélő lárvák fejlődési szakaszának a meghatározása is hasznos; ezt a fejszélesség mérése segítségével tehetjük meg.

Analitikai mérések

A vizsgált anyag koncentrációja

38. A fedővíz, a pórusvíz és az üledék legnagyobb és legkisebb koncentrációnál vett mintáit legalább a vizsgálat kezdetén (lehetőleg egy órával a vizsgált anyaggal történő szennyezést követően) és végén analizálni kell. A vizsgált anyag így meghatározott koncentrációja tájékoztatást nyújt a vizsgált anyag viselkedéséről/megoszlásáról a víz-üledék elrendezésben. Mivel a vizsgálat kezdetén történő mintavétel az üledékből hatással lehet a vizsgálati elrendezésre (például a vizsgálathoz használt lárvák eltávolítása révén), külön kísérleti edényeket kell használni az analitikai meghatározások vizsgálat kezdetén és adott esetben a vizsgálat során (lásd a 39. bekezdést) történő elvégzéséhez. Az üledékre vonatkozó mérések nem feltétlenül szükségesek abban az esetben, ha a vizsgált anyag megoszlása a víz és az üledék között egyértelműen meghatározható egy – például az üledék vízhez viszonyított aránya, a szennyezés típusa, az üledék szerves széntartalma tekintetében – összehasonlítható körülmények között végzett víz/üledék vizsgálat segítségével.

39. Ha a vizsgálat közben is végzünk méréseket (például a 7. napon), és az analízishez nagy minták szükségesek, amelyek nem gyűjthetők a kísérleti edényekből anélkül, hogy a mintavétel a vizsgálati elrendezésre hatással lenne, az analitikai meghatározásokat ugyanolyan kezelésnek alávetett (a vizsgálathoz használt organizmusokat is beleértve), de a biológiai megfigyelések céljára nem használt, külön vizsgálati edényekből származó mintákon kell elvégezni

40. A pórusvíz elkülönítésére ajánlott módszer például a 10 000 g intenzitással történő centrifugálás 4 °C-on 30 percig. Szűrést is lehet alkalmazni, amennyiben bizonyított, hogy szűrő nem adszorbeálja a vizsgált anyagot. Ha a minta mérete túl kicsi, akkor előfordulhat, hogy nem analizálható a koncentráció a pórusvízben.

▼M4

Fizikai és kémiai paraméterek

41. A vizsgálathoz használt víz pH-ját és oldott oxigén koncentrációját, valamint a kísérleti edények hőmérsékletét megfelelő módon kell mérni (lásd a 10. bekezdést). A vizsgálat kezdetén és végén a legnagyobb koncentrációnál meg kell mérni a víz keménységét és ammónia tartalmát a kontroll edényekben és egy kísérleti edényben.

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

42. E vizsgálat célja a vizsgált anyag kikelt kifejlett hím és nőstény árvaszúnyogok összes számára és fejlődési ütemére, illetve 10 napos vizsgálat esetében a lárvák túlélésére és súlyára gyakorolt hatásainak a meghatározása. Ha semmi nem utal a nemek statisztikailag eltérő érzékenységére, akkor a hímekre és a nőstényekre vonatkozó eredmények a statisztikai elemzés céljára összevonhatók. Az érzékenység nemek közötti különbségének statisztikai megítélésére például a χ^2-r x 2 próba alkalmazható. Szükség esetén 10 nap elteltével meg kell határozni a lárvák túlélését és az egyedek egy edényre eső átlagos száraz tömegét.

43. A fedővízben mért koncentrációkként kifejezett hatáskoncentrációkat lehetőleg a vizsgálat kezdetén mért koncentrációk alapján kell kiszámítani (lásd a 38. bekezdést).

44. Az EC_{50} vagy bármely más EC_x pontbecsléséhez az edényenkénti statisztikákat valódi ismétléseknek kell tekinteni. Bármely EC_x konfidencia intervallumának a kiszámítása során vagy figyelembe kell venni az edények közötti eltéréseket, vagy ki kell mutatni, hogy az eltérés elhanyagolható mértékű. Ha a modell mérési pontokhoz illesztéséhez a legkisebb négyzetek módszerét használjuk, akkor a szóráshomogenitás javítása érdekében az edényenkénti statisztikákat transzformálni kell. Az EC_x értékeket az eredeti válaszértékekre való visszatranszformálás után kell kiszámítani.

45. Ha a statisztikai elemzés célja a NOEC/LOEC hipotézisvizsgálattal történő meghatározása, az edények közötti eltérések figyelembevételére például hierarchikus varianciaanalízist (nested ANOVA) kell végezni. Alternatívaként ennél robosztusabb próbák (21) is helyénvalók lehetnek olyan esetekben, amikor az ANOVA szokásos alapfeltevései nem teljesülnek.

Kikelési arány

46. A kikelési arányok kvantális adatok, amelyek a Cochran-Armitage próbával elemezhetők a lefelé lépegető eljárást alkalmazva, amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és az adatok ennek az elvárásnak megfelelnek. Ha ez nem így van, akkor a Fisher-féle egzakt próbát vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk a p-értékek Bonferroni- vagy Holm-féle eljárással történő korrekciójával. Ha az ugyanazon koncentrációhoz tartozó ismétlések közötti eltérések bizonyítottan nagyobbak, mint amit a binomiális eloszlás indokolna (amelyet gyakran „extra-binomiális” variációnak neveznek), akkor egy robusztus Cochran-Armitage vagy Fisher-féle egzakt próbát kell alkalmazni, mint amilyet például a (21) javasol.

47. Meg kell határozni az egy edényre jutó kikelt árvaszúnyogok számát (ne), majd el kell osztani a behelyezett lárvák számával (na):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

ahol:

ER = kikelési arány

n_e = kikelt árvaszúnyogok egy edényre jutó száma

n_a = behelyezett lárvák egy edényre jutó száma

48. Egy másik, legfőképp nagy minták és extra-binomiális variáció esetén alkalmazható lehetőség, hogy a kikelési arányt folyamatos változóként kezeljük, és amennyiben arra számítunk, hogy a dózis-válasz függvény monoton, és ez az elvárás összhangban áll a kapott ER adatokkal, a Williams próbához hasonló eljárást alkalmazunk. Ha a monotonitás nem áll fenn, a Dunnett próbát lehet alkalmazni. A nagy mintát itt úgy értelmezzük, hogy az egy ismétlésre (edényre) jutó kikelt és nem kikelt árvaszúnyogok száma egyaránt meghaladja az ötöt.

49. Az ANOVA módszerek alkalmazásához az ER értékeket először négyzetgyök arkusz-szinusz vagy Freeman-Tukey transzformáció segítségével átalakítjuk, hogy a normálishoz közeli eloszlást kapjunk, és a szórásokat kiegyenlítsük. Abszolút gyakoriságok esetén a Cochran-Armitage, a Fisher-féle egzakt (Bonferroni) vagy a Mantel-Haenszel próbát használhatjuk. A négyzetgyök arkusz-szinusz transzformáció az ER négyzetgyökének az arkusz szinuszát ($\sin^{-1}$) adja.

50. A kikelési arányok meghatározásához regressziós analízissel (vagy például probit (22), logit, Weibull, kereskedelmi forgalomban kapható megfelelő szoftverrel) számítjuk ki az EC_x értékeket. Ha a regressziós analízis alkalmatlannak bizonyul (például kettőnél kevesebb részleges válasz esetén), más nemparaméteres módszert, például mozgóátlag-módszert vagy egyszerű interpolációt használunk.

Fejlődési ütem

51. Az átlagos fejlődési idő a lárvák kísérleti edényekbe történő behelyezésétől (a vizsgálat 0. napjától) az árvaszúnyogok kikeléséig tartó átlagos időtartamot jelenti. (A valódi fejlődési idő kiszámításához figyelembe kell venni a lárvák életkorát a behelyezés időpontjában). A fejlődési ütem a fejlődési idő reciproka (egysége: 1/nap), és a lárvafejlődés egy napra eső részét fejezi ki. Az ilyen jellegű üledék-toxicitási vizsgálatok értékeléséhez inkább a fejlődési ütemet használjuk, mivel kisebb a szórása, homogénebb és a normálishoz közelebb álló eloszlást mutat, mint a fejlődési idő. Ennélfogva a fejlődési ütem hatásosabb paraméteres vizsgálati eljárások alkalmazását teszi lehetővé, mint a fejlődési idő. A folyamatos változónak tekintett fejlődési ütemhez tartozó EC_x értékek becslésére regressziós analízist használunk (például (23)(24)).

52. A következő statisztikai próbákhoz feltételezzük, hogy az x. ellenőrzési napon megfigyelt számú árvaszúnyog az x. nap és az x–1. nap (l = az ellenőrzések közötti intervallum hossza, általában 1 nap) közötti időintervallum közepén kelt ki. Az egy edényre jutó átlagos fejlődési ütemet (x) a következő képlet szerint számítjuk ki:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

ahol:

$\bar{x}$: egy edényre jutó átlagos fejlődési ütem

i: ellenőrzési intervallum indexe

m: ellenőrzési intervallumok maximális száma

▼M4

f_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok száma

n_e: kikelt árvaszúnyogok száma összesen a kísérlet végén (= $\sum f_i$)

x_i: az i ellenőrzési intervallumban kikelt árvaszúnyogok fejlődési üteme

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

ahol:

day_i: ellenőrzési nap (a behelyezés óta eltelt napok száma)

l_i: az i ellenőrzési intervallum hossza (napokban kifejezve, általában 1 nap)

Vizsgálati jegyzőkönyv

53. A vizsgálati jegyzőkönyvnek legalább a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— fizikai jelleg és adott esetben a fizikai és kémiai tulajdonságok (vízoldékonyság, páranyomás, talajra (vagy ha rendelkezésre áll, az üledékre) vonatkozó megoszlási hányados, stabilitás vízben, stb.),

— kémiai azonosító adatok (közönséges név, kémiai név, szerkezeti képlet, CAS-szám, stb.,) beleértve a kémiai tisztaságot és a vizsgált anyag mennyiségi meghatározásának analitikai módszerét.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— a vizsgálathoz felhasznált állatok: faj, tudományos elnevezés, az organizmusok származása és tenyésztési körülményei,

— a petecsomók és a lárvák kezelésére vonatkozó információk,

— a vizsgálathoz felhasznált állatok életkora az edényekbe történő behelyezésükkor.

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott üledék, azaz természetes vagy mesterséges üledék,

— természetes üledék esetén az üledékminta gyűjtésének helye és a mintavételi hely leírása, beleértve lehetőség szerint a szennyezés történetét; jellemzők: pH, szerves széntartalom, C/N arány és szemcseszerkezet (ha indokolt),

— a mesterséges üledék előállítása: összetevők és jellemzők (szerves széntartalom, pH, nedvességtartalom, stb. a vizsgálat kezdetén),

— a vizsgálathoz használt víz előállítása (mesterségesen készített víz esetén) és jellemzői (oxigénkoncentráció, pH, vezetőképesség, keménység, stb. a vizsgálat kezdetén),

— az üledék és a fedővíz mélysége,

— a fedővíz és a pórusvíz mennyisége; a nedves üledék tömege pórusvízzel és pórusvíz nélkül,

— vizsgálati edények (anyag és méret),

— a törzsoldatok előállításának módszere és a vizsgálathoz használt koncentrációk,

▼M4

— a vizsgált anyag bevitele: alkalmazott vizsgálati koncentrációk, ismétlésszám és esetlegesen használt oldószer,

— inkubációs körülmények: hőmérséklet, fényciklus és intenzitás, levegőztetés (gyakoriság és intenzitás),

— a táplálásra vonatkozó információk, beleértve a táplálék típusát, elkészítését, mennyiségét és a táplálás rendjét.

Eredmények:

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a mért vizsgálati koncentrációk és a kísérleti edények vizsgált anyag koncentrációjának a meghatározására használt analízisek eredményei,

— a víz minősége a vizsgálati edényekben, azaz pH, hőmérséklet, oldott oxigén, vízkeménység és ammóniatartalom,

— az elpárolgott víz pótlása a vizsgálati edényekben, ha pótoljuk,

— a kikelt hím és nőstény árvaszúnyogok egy edényre és napra eső száma,

— ki nem kelt lárvák egy edényre jutó száma,

— a lárvák egy edényre és – adott esetben – egy fejlődési szakaszra jutó átlagos száraz tömege,

— ismétlésenkénti és vizsgálati koncentrációnkénti százalékos kikelés (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— kikelt kifejlett árvaszúnyogok ismétlésenkénti és kezelési arányonkénti átlagos fejlődési üteme (hím és nőstény árvaszúnyogok együttesen),

— toxicitási végpontok – például EC_x (és a hozzá tartozó konfidencia intervallum), NOEC és/vagy LOEC – becsült értékei, valamint a meghatározásukhoz használt statisztikai módszerek,

— az eredmények szöveges elemzése, beleértve az e vizsgálati módszertől való eltérések vizsgálat kimenetelére gyakorolt hatását.

SZAKIRODALOM

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125–1241. In 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, 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. Kultúra 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) E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.

(16) Naylor C and 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 and 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 and 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**

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

E módszer alkalmazásában a következő fogalommeghatározások alkalmazandók:

Mesterséges üledék vagy formulázott, kevert vagy műüledék: a természetes üledék fizikai összetevőinek az imitálására használt anyagok keveréke.

Fedővíz: a vizsgálati edényben az üledék felé kerülő víz.

Pórusvíz vagy szemcseközi víz: az üledék és a talaj szemcséi közötti helyet kitöltő víz.

Szennyezett víz: a vizsgált vegyi anyaggal szennyezett víz.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

Ajánlások a *Chironomus riparius* tenyésztéséhez

1. Az árvaszúnyoglárvákat kristályosító csészékben vagy nagyobb edényekben tenyésztjük. Az edény aljára szórjunk vékony réteg (kb. 5–10 mm) kvarchomokot. A szilikagél (például Merck, cikkszám: 8117) is megfelelő szubsztrátumnak bizonyult (ebből vékonyabb, pár milliméternyi réteg is elegendő). Ezt követően töltsünk néhány centiméternyi megfelelő vizet az edénybe. A vízszint fenntartása és a kiszáradás megelőzése érdekében szükség szerint pótoljuk az elpárolgott vizet. Cserélhetjük is a vizet, ha kell. Biztosítsunk gyenge levegőztetést. A lárvatenyésztő edényeket tartsuk egy megfelelő ketrecben, amelyből a kikelő kifejlett példányok nem tudnak kiszökni. A ketrecben legyen elég hely a kikelt kifejlett példányoknak a mozgásra, mert ellenkező esetben nem fognak párosodni (minimum kb. 30 × 30 × 30 cm).

2. A ketreceket tartsuk szobahőmérsékleten vagy 20 ± 2 °C állandó hőmérsékletű helyiségben, 16 órán keresztül világosban (fényintenzitás kb. 1 000 lux) és 8 órán keresztül sötétben. Dokumentálták, hogy a 60 % RH alatti légnedvesség gátolhatja a szaporodást.

Hígítóvíz

3. Bármilyen alkalmas természetes vagy művíz használható. Általában kútvizet, klórtalanított csapvizet vagy mesterséges közeget (például Elendt-féle M4 vagy M7 közeget, lásd lentebb) használunk. Használat előtt a vizet levegőztetni kell. Szükség esetén cserélhetjük a tenyésztéshez használt vizet. Ehhez a használt vizet öntsük le vagy szívjuk ki a tenyésztő edényekből ügyelve arra, hogy a lárvák által épített lakócsöveket el ne pusztítsuk.

A lárvák táplálása

4. Az árvaszúnyoglárvákat pehely formájú haleledellel (Tetra Min®, Tetra Phyll® vagy hasonló, védett márkájú haltáppal) etessük, amelyből naponta körülbelül 250 mg-ot adjunk minden edényhez porrá őrölve szárazon vagy vizes szuszpenzióban, amelynek az elkészítéséhez 1,0 g pehely formájú haleledelt keverjünk el 20 ml hígítóvízben úgy, hogy homogén keveréket kapjunk. Ebből a készítményből naponta 5 ml-t adjunk minden edényhez (használat előtt felrázandó). Az idősebb lárvák kaphatnak ennél többet.

5. A táplálék mennyiségét a vízminőséghez kell igazítani. Ha a tenyésztőközeg zavarossá válik, akkor csökkenteni kell a mennyiséget. Az adott táplálék mennyiségét szigorú ellenőrzés alatt kell tartani. Ha túl kevés a táplálék, akkor a lárvák a vízrétegbe vándorolnak, ha túl sok, akkor fokozódik a mikrobatevékenység és csökken az oxigénkoncentráció. Mindkét körülmény a fejlődési ütem lassulását okozhatja.

6. Az újonnan létesített tenyésztő edényekhez zöldalga (például *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) sejtek is adhatók.

A kikelt kifejlett példányok táplálása

7. Egyes kísérletek szerint a kikelt kifejlett példányok számára egy telített cukoroldatba mártott vattakorong szolgálhat táplálékként.

▼M4

Kikelés

8. 20 ± 2 °C hőmérsékleten a kifejlett példányok körülbelül 13–15 nap elteltével kezdenek megjelenni a lárvatenyésztő edényekben. A hímek tollas csápjuk alapján könnyen megkülönböztethetők.

Petecsomók

9. Miután a kifejlett példányok megjelentek a tenyésztőketrecben, a lárvatenyésztő edényekben hetente háromszor ellenőrizni kell a lerakott zselatinszerű petecsomókat, amelyeket gondosan el kell távolítani, és át kell helyezni egy tenyésztővíz-mintát tartalmazó kisméretű edénybe. A petecsomókat új tenyészetek létrehozására (például 2–4 petecsomó/edény) vagy toxicitási vizsgálatok céljára használjuk fel.

10. Az első fejlődési szakaszban lévő lárváknak 2–3 napon belül kell kikelniük.

Új tenyészetek létesítése

11. A stabil tenyészetekből hetente vagy – a vizsgálati követelményektől függően – ritkábban friss lárvatenyészetek hozhatók létre, miközben a régebbi edényeket a kifejlett árvaszúnyogok megjelenését követően eltávolítjuk. Ezzel a rendszerrel minimális kezelést igénylő módon biztosítható a kifejlett példányok rendszeres utánpótlása.

A vizsgálathoz használt „M4” és „M7” oldatok előállítása

12. Az „M4” közeg leírása Elendt (1990) munkájában megtalálható. Az „M7” közeg ugyanúgy készül, mint az „M4”, azzal a különbséggel, hogy az 1. táblázatban feltüntetett anyagok koncentrációja az „M7” esetében négyszer alacsonyabb, mint az „M4” készítésekor. Az „M7” közegről szóló publikáció előkészületben van (Elendt, személyes közlés). A vizsgálathoz használt oldatot azért nem Elendt és Bias (1990) szerint kell előállítani, mert a törzsoldatok elkészítéséhez megadott NaSiO3 5 H_2O, NaNO3, KH2PO4 és K2HPO4 koncentrációk nem megfelelők.

Az „M7” közeg előállítása

13. Az (I) törzsoldatok mindegyikét külön kell elkészíteni, majd az (I) törzsoldatokból egy (II) kombinált törzsoldatot készítünk (lásd az 1. táblázatot). Az „M7” közeg előállításához a (II) kombinált törzsoldat 50 ml-ét és az egyes makrotápanyagok törzsoldatainak a 2. táblázatban megadott mennyiségeit ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk. Vitamin-törzsoldatot készítünk, amelyhez három vitamint ionmentesített vízhez adunk a 3. táblázatban meghatározottak szerint, majd röviddel a felhasználás előtt az „M7” közeghez adunk 0,1 ml-t a kombinált vitamin törzsoldatból. (A vitamin-törzsoldatot kis aliquot részekben, fagyasztott állapotban kell tartani). A közeget levegőztetni és stabilizálni kell.

1. táblázat

Nyomelemek törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

(I) törzsoldatok	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A (II) kombinált törzsoldat előállításához az (I) törzsoldatok következő mennyiségeit (ml) elegyítjük és ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk		Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt oldatban (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**

(I) törzsoldatok	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	A (II) kombinált törzsoldat előállításához az (I) törzsoldatok következő mennyiségeit (ml) elegyítjük és ionmentesített vízzel 1 literre hígítjuk		Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt oldatban (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
KI	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
Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Ezeknek az anyagoknak az esetében a fent jelzett módon eltér az M4 és az M7.
(2) Ezeket az oldatokat külön kell elkészíteni, majd összeönteni és azonnal autoklávban kezelni.

2. táblázat

Makrotápanyagok törzsoldatai az M4 és M7 közeghez

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Makrotápanyagok törzsoldatainak M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (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**

3. táblázat

Vitamin-törzsoldatok az M4 és M7 közeghez

A három vitaminoldatból egyetlen kombinált vitamin-törzsoldatot készítünk.

	Ion-mentesített vízzel 1 literre hígított mennyiség (mg)	Vitamin- törzsoldat M4 és M7 közeg előállításához használt mennyisége (ml/l)	Végleges koncentráció a vizsgálathoz használt M4 és M7 oldatban (mg/l)
Tiamin-hidroklorid	750	0,1	0,075
Cianokobalamin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotin	7,5	0,1	0,00075

SZAKIRODALOM

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Kultúrad in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Kultúra Conditions on LIFE History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157–1167.

▼M4

3. függelék

MESTERSÉGES ÜLEDÉK KÉSZÍTÉSE

Az üledék összetétele

A mesterséges üledék összetétele a következő:

Összetevő	Jellemzők	üledék száraz tömegének %-a
Tőzeg	Tőzegmoha, amelynek pH-ja a lehető legközelebb esik az 5,5-6,0 értékhez, és nem tartalmaz látható növény-maradványokat, finomra őrölve (részecskeméret ≤ 1 mm) és levegőn szárítva	4–5
Kvarchomok	Szemcseméret: a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban	75–76
Kaolinit agyag	Kaolinit tartalom ≥ 30 %	20
Szerves szén	Tőzeg és homok hozzáadásával beállítva	2 (±0,5)
Kalcium-karbonát	Porított, vegytiszta $CaCO_3$	0,05 - 0,1
Víz	Vezetőképesség ≤ 10 μS/cm	30 - 50

Elkészítés

A levegőn szárított tőzeget finom porrá őröljük. Nagyteljesítményű homogenizáló készülék segítségével ionmentesített vízzel szuszpenziót készítünk a szükséges mennyiségű tőzegporból. A szuszpenzió pH-ját $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 5,5 ± 0,5 értékre. A pH és a mikrobiológiai összetétel stabilizálása végett 20 ± 2 °C hőmérsékleten lassú keveréssel legalább két napig kondicionáljuk a szuszpenziót. Az ezt követően ismét megmért pH-nak 6,0 ± 0,5 értéket kell mutatnia. Ezek után a szuszpenziót összekeverjük a többi összetevővel (homok és kaolinagyag), valamint az ionmentesített vízzel úgy, hogy az üledék száraz tömegének 30–50 százaléka közötti víztartalommal rendelkező, homogén üledéket kapjunk. A végtermékként kapott keverék pH-ját ismételten megmérjük, és szükség esetén $CaCO_3$ hozzáadásával beállítjuk 6,5–7,5 értékre. Az üledékből vett minta alapján meghatározzuk a száraz tömeget és a szerves széntartalmat. Ezt követően az árvaszúnyogokkal végzett toxicitási vizsgálatban való felhasználás előtt ajánlott a mesterséges üledéket hét napig a vizsgálatban használni kívántakkal megegyező körülmények között kondicionálni.

Tárolás

A mesterséges üledék előállításához használt száraz összetevők száraz, hűvös helyen, szobahőmérsékleten tárolhatók. Az összeállított (nedves) üledék a vizsgálatban való felhasználás előtt nem tárolható. Az előállításának záró lépését képező 7 napos kondicionálási időszakot követően azonnal fel kell használni.

SZAKIRODALOM:

E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

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

4. függelék

Az elfogadható hígítóvíz kémiai tulajdonságai

Anyag	Koncentráció
Szemcsés anyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Ionizálatlan ammónia	< 1 μg/l
Keménység $CaCO_3$ koncentrációban kifejezve	< 400 mg/l (*)
Maradék klór	< 10 μg/l
Összes szerves foszfort tartalmazó növényvédő szer	< 50 ng/l
Összes szerves klórt tartalmazó növényvédő szer plusz poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

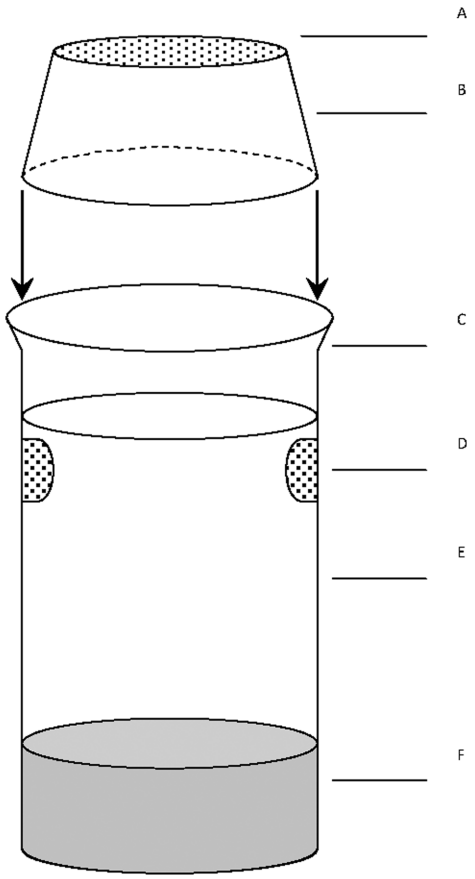
(*) Meg kell azonban jegyezni, hogy ha a keménységet okozó ionok és a vizsgált anyag között gyaníthatóan kölcsönhatás alakul ki, akkor lágyabb vizet kell alkalmazni (és ezért az Elendt-féle M4 közeg ilyen esetben nem alkalmazható).

▼**M4**

5. függelék

Útmutató az árvaszúnyoglárvák kikelésének figyelemmel kíséréséhez

A vizsgálati edényekre csapdákat helyezünk a kikelt példányok számára. A csapdák a 20. naptól a vizsgálat végéig szükségesek. Ezek egy példáját mutatja be az alábbi ábra:



A: nylon háló

B: fejjel lefelé fordított műanyagpohár

C: vizsgálati edény, kiöntő nélkül

D: hálós vízcserélő nyílás

E: víz

F: üledék

▼M4

C.29. GYORS BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG: SZÉN-DIOXID-VIZSGÁLAT LÉGMENTESEN ZÁRT EDÉNYEKBEN (A GŐZTÉR CO_2-TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA)

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 310. vizsgálati iránymutatásában (2006) leírt módszerrel. A módszer olyan szűrővizsgálat, amely a vegyi anyagok gyors biológiai lebonthatóságának értékelésére szolgál, és hasonló információkat nyújt, mint az e melléklet C.4. fejezetében ismertetett A–F vizsgálati módszerek. Ezért azok a vegyi anyagok, amelyek esetében ez a vizsgálati módszer pozitív eredményt ad, biológiailag könnyen lebonthatónak, és ennek következtében a környezetben gyorsan lebomlónak tekinthetők.

2. A rosszul oldható és erősen adszorbeálódó vegyi anyagok esetében hagyományosan általában a jól bevált szén-dioxid-módszer (CO_2-módszer) (1) az elsődleges választás, amely a szerves vegyületek biológiai lebonthatóságának eredeti Sturm-féle vizsgálatán (2) alapul, és a mikrobatevékenység eredményeként felszabaduló szén-dioxid mérésével határozza meg a biológiai lebonthatóságot. Oldható (de nem illékony) vegyi anyagok esetében is erre a módszerre esik a választás, mivel sokan a szén-dioxid-fejlődést tekintik a mikrobatevékenység egyetlen kétségbevonhatatlan bizonyítékának. Az oldott szerves szén eltávolítása egyaránt lehet fizikai-kémiai folyamatok – adszorpció, volatilizáció, precipitáció, hidrolízis – és mikrobatevékenység eredménye, oxigénfogyasztás pedig számos nem biológiai reakcióban is megfigyelhető; CO_2 viszont ritkán keletkezik szerves vegyületekből nem biológiai úton. Az eredeti és a módosított Sturm-féle vizsgálatban (1)(2) a CO_2 eltávolítása a folyadékfázisból történik, és a CO_2 gáz-átbuborékoltatás eredményeként kerül az elnyelető edényekbe (a CO_2 eltávolítására megfelelő kezeléssel alkalmassá tett levegőt buborékoltatnak át a folyékony közegen), míg a Larson-féle változatban (3)(4) a CO_2 úgy kerül a reakcióedényből az abszorberekbe, hogy a vizsgálati edény folyamatos rázása mellett CO_2-mentes levegőt vezetnek keresztül a gőztéren. A reakcióedény rázása csak a Larson-féle módosításban szerepel; az ISO 9439 szabvány (5) és az Egyesült Államokban alkalmazott eredeti változat (6) csak oldhatatlan anyagok esetében ír elő keverést, és mindkettőben gáz-átbuborékoltatás, nem pedig a gőztér cseréje szerepel. Egy másik hivatalos, Gledhill módszerén (8) alapuló és az USA Környezetvédelmi Hivatala (EPA) által elfogadott módszer (7) szerint a CO_2-t a légkör felé zárt, rázott reakcióedényen belül közvetlenül a gázfázisból nyeletik el lúgban, miként a klasszikus Warburg–Barcroft-féle respirométer-palackban.

3. Kimutatták azonban, hogy a szabványos, módosított Sturm-féle vizsgálat számos vegyi anyag esetében történő alkalmazása során szervetlen szén (IC) halmozódik fel a közegben (9). 20 mg C/l koncentrációban használt anilin lebomlása során 8 mg/l IC koncentrációt is mértek. Ezért a lúgban elnyeletett CO_2 nem ad valódi képet arról, hogy a lebomlás során az egyes köztes időpontokban mennyi CO_2 keletkezik mikrobiológiai folyamatok eredményeként. Ennek következtében egyes vegyi anyagoknál, amelyek az oldott szerves szén (DOC) eltávolítása alapján biológiailag gyorsan lebonthatónak minősülnének, nem teljesül az a követelmény, amely szerint a biológiailag gyorsan lebontható anyagok esetében a CO_2-fejlődés elméleti maximumának ($ThCO_2$) több mint 60 %-át el kell érni a „tíznapos ablakban” (a 10 %-os biológiai lebomlás elérését közvetlenül követő 10 napban).

4. Ha a százalékos lebomlás értéke a vártnál alacsonyabb, akkor lehetséges, hogy IC halmozódott fel a vizsgálathoz használt oldatban. Ekkor a lebonthatóság a gyors biológiai lebonthatóság megállapítására szolgáló további vizsgálatokkal értékelhető.

▼M4

5. A Sturm-féle módszertan egyéb hátrányai (nehézkesség, időigényesség, nagyobb kísérleti hibalehetőség, és az illékony vegyi anyagok vizsgálatára való alkalmatlanság) arra ösztönözték a kutatókat, hogy a gázátáramoltatás (10)(11) helyett egy – a Gledhill által javasolttól eltérő – zárt edényes technikát keressenek. Boatman et al. (12) a korábbi módszerek áttekintését követően egy olyan zárt elrendezést alkalmazott, amelyben a közeg savas kezelését követően a CO_2 az inkubálás végén a gőztérbe távozik. A CO_2 mérésére a gőztérből automatikusan vett minták szervetlenszén-tartalmának gázkromatográfiás analízisét ((GC)/IC) használták, de a folyadékfázis oldott szervetlenszén-tartalmát (DIC) nem vették figyelembe. Emellett az alkalmazott edények nagyon kicsik (20 ml) voltak, és csak 10 ml közeget tartalmaztak, ami problémákat okozott: például az oldhatatlan vizsgált anyagokból szükségszerűen nagyon kis mennyiséget kellett bevinni, és/vagy előfordulhatott, hogy a beoltott közegben nem vagy nem kellő mennyiségben voltak jelen a vizsgált vegyi anyagok lebontására képes mikroorganizmusok.

6. E nehézségek leküzdéséhez Struijs és Stoltenkamp (13), valamint az anaerob körülmények közötti biológiai lebonthatóság vizsgálatában (15) használt készülékkel szerzett tapasztalataikból ihletet merítő Birch és Fletcher (14) független kutatásai járultak hozzá. Az előbbi szerzőpáros módszere (13) a gőztér CO_2-tartalmának savas kezelést és ekvilibrációt követő mérésén alapult, míg az utóbb említettek (14) mind a gázfázisban, mind a folyadékfázisban mérték a DIC értékét, és semmilyen kezelést nem alkalmaztak; a keletkező IC 90 %-a a folyadékfázisban volt jelen. A Sturm-féle vizsgálattal összehasonlítva mindkét módszer rendelkezik előnyökkel, mivel a vizsgálati elrendezés kompakt és jobban kezelhető, alkalmas az illékony vegyi anyagok vizsgálatára, és lehetővé teszi a felszabaduló CO_2 késleltetett mérésének az elkerülését.

7. Ezt a két megközelítést ötvözte a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálatára vonatkozó ISO-szabvány (16), amelyet körvizsgálatnak is alávetettek (17), és amely az itt bemutatott vizsgálati módszernek is az alapját képezi. Ugyancsak ezt a két megközelítést használja fel az EPA módszere (18). A CO_2 mérésének két ajánlott módszere létezik: a gőztér CO_2-tartalmának meghatározása savas kezelést követően (13) és az IC meghatározása a folyadékfázisban lúgfölösleg hozzáadása után. Az utóbbi módszert Peterson vezette be annak a CONCAWE által végzett körvizsgálatnak (19) a során, amelynek tárgya a gőztér CO_2-tartalma vizsgálatának módosított, a jellegüknél fogva biológiailag lebontható anyagok értékelésére alkalmas módszere volt. Az itt bemutatott vizsgálati módszer tartalmazza a gyors biológiai lebonthatóság meghatározására vonatkozóan e melléklet C.4. fejezetében ismertetett módszereken az 1992-es átdolgozás (20) keretében végrehajtott módosításokat, így a vizsgálati körülmények (közeg, időtartam stb.) egyebekben megegyeznek a módosított Sturm-féle vizsgálatban alkalmazottakkal (20). Birch és Fletcher (14) kimutatták, hogy a gőztér CO_2-tartalmának e vizsgálata nagyon hasonló eredményeket adott, mint az átdolgozott vizsgálati módszerekre ugyanazon vegyi anyagokkal elvégzett OECD-körvizsgálat (21).

A VIZSGÁLAT ELVE

8. A kizárólagos szén- és energiaforrásként szolgáló vizsgált vegyi anyagot – általában 20 mg C/l koncentrációt alkalmazva – vegyes mikroorganizmus-populációval beoltott, ásványi sókat tartalmazó pufferközegben inkubáljuk. A vizsgálatot az aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomláshoz szükséges oxigént tartalmazó gőztérrel rendelkező, légmentesen zárt palackokban végezzük. A vizsgált vegyi anyag aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomlása során felszabaduló szén-dioxid meghatározásához megmérjük, hogy a kísérleti palackokban mennyivel több szervetlen szén (IC) keletkezik, mint a vakpróbákhoz használt, csak a beoltott közeget tartalmazó palackokban. A biológiai lebomlás mértékét az IC-termelődés elméleti maximuma (ThIC) százalékában fejezzük ki, a kezdetben bevitt vizsgált vegyi anyag (mint szerves szén) mennyisége alapján.

9. A DOC-csökkenés és/vagy a vizsgált vegyi anyag elsődleges biológiai lebonthatósága is mérhető (20).

▼M4

A VIZSGÁLT VEGYI ANYAGRA VONATKOZÓ INFORMÁCIÓK

10. A százalékos lebomlás kiszámításához ismerni kell a vizsgált vegyi anyag szerves széntartalmát (tömegszázalékban kifejezve), amely a kémiai szerkezet alapján vagy méréssel határozható meg. Illékony vizsgált vegyi anyagok esetében a gőztér és a folyadék térfogata közötti megfelelő arány meghatározását segíti a mért vagy számított Henry-állandó. A vizsgált vegyi anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásához és a rossz biológiai lebonthatóságra utaló eredmények értelmezéséhez hasznosak: amennyiben nem bizonyított, hogy a vizsgált vegyi anyag nincs gátló hatással a mikrobatevékenységre, ajánlott a gátló hatás ellenőrzésére szolgáló kontrolledényt (lásd a 24. bekezdést) szerepeltetni a vizsgálatban.

A MÓDSZER ALKALMAZHATÓSÁGA

11. A vizsgálat a vízben oldható és a nem oldható vegyi anyagok vizsgálatára egyaránt alkalmas, bár a vizsgált vegyi anyag megfelelő eloszlatását biztosítani kell. Az ajánlott 1:2 gőztér-folyadék térfogatarány alkalmazása mellett az illékony vegyi anyagok 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ Henry-állandóig vizsgálhatók, mivel így a vizsgált vegyi anyag aránya a gőztérben nem fogja meghaladni az 1 %-ot (13). Illékonyabb vegyi anyagok vizsgálata esetén kisebb térfogatú gőztér is használható, de biológiai hasznosíthatóságuk korlátozó tényező lehet, különösen akkor, ha vízben rosszul oldódnak. A felhasználóknak úgy kell megválasztaniuk a gőztér és a folyadék térfogatának arányát és a vizsgált vegyi anyag koncentrációját, hogy elegendő oxigén álljon rendelkezésre az aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomláshoz (azaz kerülni kell a magas szubsztrátumkoncentrációt és a kis gőztértérfogatot). Erre a kérdésre vonatkozóan a szakirodalom (13)(23) nyújt útmutatást.

REFERENCIA-VEGYIANYAGOK

12. Az eljárás ellenőrzése érdekében érdemes egyidejűleg olyan referencia-vegyianyagokat is vizsgálni, amelyek biológiai lebonthatósága ismert. Vízben oldható vegyi anyagok vizsgálata esetén anilin, nátriumbenzoát vagy etilénglikol, rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén pedig 1-oktanol használható erre a célra (13). E vegyületeknek a ThIC százalékában kifejezett biológiai lebomlásának 14 napon belül több mint 60 %-ot kell elérnie.

REPRODUKÁLHATÓSÁG

13. A módszer ISO-körvizsgálata (17) során a következő eredmények születtek az ajánlott körülmények között, a vizsgált vegyi anyag 20 mg C/l koncentrációban történő alkalmazása mellett.

Vizsgált vegyi anyag	Százalékos biológiai lebomlás középértéke (28 nap alatt)	Relatív szórás (%)	Laboratóriumok száma
Anilin	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

A vizsgálaton belüli variabilitást (megismételhetőséget) illetően megállapítható, hogy anilin alkalmazása esetén szinte valamennyi vizsgálatsorozatban alacsony, 5 %-ot nem meghaladó volt a relatív szórás. A gyengébb megismételhetőséget mutató két esetben a nagyobb variabilitást valószínűleg az okozta, hogy a vakpróbákban magas volt az IC-termelődés. Az 1-oktanol alkalmazása gyengébb megismételhetőséget eredményezett, de a vizsgálatsorozatok 79 %-ában még így is 10 % alatt maradt a relatív szórás. Ebben az esetben adagolási hibák okozhatták a vizsgálaton belüli nagyobb variabilitást, mivel nagyon kis mennyiségű (3–4 μl) 1-oktanolt kellett befecskendezni a lezárt kísérleti palackokba. A vizsgált vegyi anyag kisebb koncentrációban történő alkalmazása nagyobb relatív szórást eredményezett, különösen a 10 mg C/l értéknél alacsonyabb koncentrációk esetében. Az oltóanyagban lévő összes szervetlen szén (TIC) koncentrációjának csökkentésével ez részben kiküszöbölhető volt.

▼M4

14. Egy EU-körvizsgálat (24) során, amelyben öt felületaktív anyagot alkalmaztak 10 mg C/l koncentrációban, a következő eredmények születtek:

Vizsgált vegyi anyag	Százalékos biológiai lebomlás középértéke (28 nap alatt)	Relatív szórás (%)	Laboratóriumok száma
Tetrapropilén-benzol-szulfonát	17	45	10
Diizooktil-szulfoszukcinát (anionos)	72	22	9
Hexadecil-trimetil-ammónium-klorid (kationos)	75 (*)	13	10
Izononilfenol-(etoxilát)$_9$ (nem ionos)	41	32	10
Kókusz-amido-propil-dimetilhidroxi-szulfobetain (amfoter)	60	23	11

(*) A toxikus hatás semlegesítése SiO_2 hozzáadásával történt.

Az eredmények azt mutatják, hogy a nehezebben lebomló felületaktív anyagok esetében általában véve nagyobb volt a variabilitás. A vizsgálaton belüli variabilitás az esetek 90 %-ában nem érte el a 15 %-ot, a legmagasabb érték 30–40 % volt.

MEGJEGYZÉS: A felületaktív anyagok többségükben nem azonos szerkezetű molekulákból állnak, hanem több izomer, homológ stb. keverékei, amelyek lebomlása nem egyforma alkalmazkodási fázist követően, eltérő reakciósebesség mellett történik, „zavaros”, laposabb görbét eredményezve, ezért előfordulhat, hogy a „tíznapos ablakban” nem érhető el a 60 %-os megfelelési érték, holott az egyes molekulafajták önmagukban vizsgálva 10 nap alatt elérnék a 60 % feletti szintet. Ez a jelenség más összetett keverékek esetében is megfigyelhető.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

Készülékek

15. A szokásos laboratóriumi készülékek és:

a) üveg szérumpalackok, butilkaucsuk septummal rendelkező alumíniumkupakkal lezárva. Az ajánlott méret a 160 ml körüli össztérfogattal rendelkező „125 ml-es” palack (ebben az esetben mindegyik palacknak ismert, 160 ± 1 ml térfogatúnak kell lennie). Kisebb edény is használható, amennyiben az eredmények megfelelnek a 66. és a 67. bekezdésben leírt feltételeknek;

b) szénanalizátor vagy a szervetlen szén mérésére alkalmas egyéb műszer (pl. gázkromatográf);

▼M4

c) fecskendők nagy pontosságú gáz- és folyadékminta-vételhez;

d) orbitális rázókészülék szabályozott hőmérsékletű környezetben;

e) CO_2-mentes levegő-utánpótlás, amely levegő nátronmész-granulátumon történő átvezetésével vagy 80 % N_2/20 % O_2 összetételű gázkeverék alkalmazásával oldható meg (nem kötelező, lásd a 28. bekezdést);

f) membránszűrő berendezés 0,20–0,45 μm pórusmérettel (nem kötelező);

g) szervesszén-analizátor (nem kötelező).

Reagensek

16. Mindvégig analitikai tisztaságú reagenseket használjunk.

Víz

17. Olyan desztillált vagy ionmentesített vizet kell használni, amelynek összes szervesszén-koncentrációja ≤ 1 mg/l. Ez az ajánlott dózisban alkalmazott vizsgált vegyi anyaggal a vizsgálat kezdetén bevitt szerves széntartalom legfeljebb 5 %-ának felel meg.

Törzsoldatok az ásványisó-tartalmú közeg előállításához

18. A törzsoldatok és az ásványisó-tartalmú közeg hasonló az ISO 14593 szabvány (16) és a gyors biológiai lebonthatóság vizsgálata kapcsán a C.4. fejezetben leírt vizsgálati módszer (20) által előírthoz. Magasabb ammónium-klorid-koncentráció (0,5 g/l helyett 2,0 g/l) alkalmazása csak nagyon kivételes esetekben szükséges, például ha a vizsgált vegyi anyag koncentrációja > 40 mg C/l. A törzsoldatokat hűtve kell tárolni, és hat hónap után – kicsapódásra vagy mikroorganizmus-növekedésre utaló jel esetén korábban – meg kell semmisíteni. A következő törzsoldatokat kell elkészíteni:

a) 8,50 g kálium-dihidrogén-foszfátot (KH_2PO_4),

21,75 g dikálium-hidrogén-foszfátot (K_2HPO_4),

33,40 g dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrátot ($Na_2HPO_4.2H_2O$) és

0,50 g ammónium-kloridot (NH_4Cl)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk. 7,4 (± 0,2) pH-jú oldatot kell kapnunk. Ha ez nem így van, akkor új oldatot kell készíteni.

b) 36,40 g kalcium-klorid-dihidrátot ($CaCl_2.2H_2O$)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk.

c) 22,50 g magnézium-szulfát-heptahidrátot ($MgSO_4.7H_2O$)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk.

d) 0,25 g vas(III)-klorid-hexahidrátot ($FeCl_3.6H_20$)

vízben feloldunk, és 1 literre hígítunk, és hozzáadunk egy csepp tömény HCl-t.

Ásványisó-tartalmú közeg előállítása

19. Az a) jelű oldatból 10 ml-t körülbelül 800 ml vízzel elkeverünk (17. bekezdés), majd hozzáadunk a b), a c) és a d) jelű oldatok mindegyikéből 1 ml-t, és az így kapott elegyet vízzel 1 literre hígítjuk (17. bekezdés).

Egyéb reagensek

20. Tömény foszforsav (H_3PO_4) (> 85 % m/V).

▼M4

Nátrium-hidroxid-oldat (7M)

21. Oldjunk fel 280 g nátrium-hidroxidot (NaOH) 1 liter vízben (17. bekezdés). Határozzuk meg az oldat DIC-koncentrációját, és ezt az értéket vegyük figyelembe a vizsgálat eredményének kiszámítása során (lásd az 55. és a 61. bekezdést), különös tekintettel a 66. bekezdés b) pontjában szereplő érvényességi kritériumra. Ha a DIC-koncentráció túl magas, készítsünk friss oldatot.

Vizsgált vegyi anyag

22. Ha a vizsgált vegyi anyag megfelelően oldható vízben, akkor készítsünk vízben (17. bekezdés) vagy a vizsgálathoz használt közegben (19. bekezdés) lehetőleg a vizsgálathoz használandó végleges koncentráció százszorosának megfelelő koncentrációjú törzsoldatot; ha a törzsoldat pH-ja nem megfelelő, akkor be kell állítani. A törzsoldatot adjuk az ásványisó-tartalmú közeghez úgy, hogy 2 és 40 mg C/l közötti, lehetőleg 20 mg C/l végleges szervesszén-koncentrációt kapjunk. Ennél alacsonyabb koncentráció esetén az eredmények pontossága romolhat. Az oldható és az oldhatatlan folyékony vizsgált anyagok nagy pontosságú fecskendő segítségével közvetlenül bejuttathatók az edényekbe. A rosszul oldható, illetve oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok speciális kezelést igényelhetnek (25). A választási lehetőségek a következők:

a) ismert lemért mennyiségek közvetlen bejuttatása;

b) ultrahangos diszpergálás a hozzáadás előtt;

c) szétoszlatás emulgeálószer segítségével, amelynek mikrobatevékenységet gátló vagy serkentő hatását a hozzáadás előtt ellenőrizni kell;

d) a folyékony vizsgált vegyi anyag – vagy megfelelő, illékony oldószerrel készített oldata – adszorbeálása semleges közegen vagy eszközön (például üvegszálas szűrőn), majd az esetleg használt oldószer elpárologtatása, és ismert mennyiségek bejuttatása;

e) a vizsgált vegyi anyag könnyen párolgó oldószerrel készített oldata ismert mennyiségének bejuttatása az üres kísérleti edénybe, majd az oldószer elpárologtatása.

A c), a d) és az e) pontban említett szerek mikrobatevékenységet gátló vagy serkentő hatását a hozzáadás előtt vizsgálattal ellenőrizni kell (lásd a 42. bekezdés b) pontját).

Referencia-vegyianyag

23. Vízzel készítsünk a vizsgálathoz használandó végleges koncentráció (20 mg C/l) lehetőleg százszorosának megfelelő koncentrációjú törzsoldatot az (oldható) referencia-vegyianyagból (17. bekezdés).

Gátló hatás ellenőrzése

24. A gyors biológiai lebonthatóság értékeléséhez használt körülmények között a vizsgált vegyi anyagok gyakran nem mutatnak jelentős mértékű lebomlást. Ennek egyik lehetséges oka, hogy a vizsgált vegyi anyag a vizsgálat során alkalmazott koncentrációban gátló hatást gyakorol az oltóanyagra. A gátló hatás lehetséges okként vagy közreműködő tényezőként való (utólagos) azonosításának megkönnyítése érdekében a gátló hatás ellenőrzése beépíthető a vizsgálati tervbe. A másik lehetőség, hogy a gátló hatás ellenőrzése kizárja az ilyen zavaró kölcsönhatásokat, és kimutatja, hogy a lebomlás hiánya vagy csekély mértéke kizárólag annak tulajdonítható, hogy a vizsgált vegyi anyag a vizsgálati körülmények között nem hozzáférhető a mikrobák számára. A vizsgált vegyi anyag (aerob) mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatására vonatkozó információk beszerzéséhez készítsünk a vizsgált vegyi anyagból és a referencia-vegyianyagból (19. bekezdés) oldatot a vizsgálathoz használt közegben úgy, hogy mindkettő az alkalmazott koncentrációban legyen jelen az oldatban (lásd a 22. és a 23. bekezdést).

▼M4

Oltóanyag

25. Az oltóanyag különféle forrásokból származhat: lehet eleveniszap, szennyvíztisztító elfolyó vize (klórozatlan), felszíni víz és talaj, vagy ezek keveréke (20). A forrás biológiai lebontó képességét referencia-vegyianyag segítségével ellenőrizzük. Bármely forrásból is származzanak, a vizsgált vegyi anyagnak korábban már kitett mikroorganizmusok nem alkalmazhatók, ha az eljárás célja a gyors biológiai lebonthatóság vizsgálata.

Figyelmeztetés: Az eleveniszap, a szennyvíz és a szennyvíztisztító elfolyó vize kórokozókat tartalmazhat, ezért körültekintéssel kell kezelni.

26. A tapasztalatok alapján az oltóanyag optimális mennyisége az a mennyiség, amely:

— elégséges biológiai lebontó képességet biztosít,

— a referencia-vegyianyag esetében a meghatározott százalékos lebomlást eredményezi (lásd a 66. bekezdést),

— milliliterenként 10^2–10^5 darab telepképző egységet biztosít a végtermékként kapott keverékben,

— szokásos körülmények között 4 mg/l lebegőanyag-koncentrációt biztosít a végtermékként kapott keverékben eleveniszap használata esetén; a koncentráció 30 mg/l értékig elfogadható, de ez jelentős mértékben növelheti a CO_2-fejlődést a vakpróbákban (26),

— a vizsgált vegyi anyaggal bevitt kezdeti szervesszén-koncentráció kevesebb mint 10 %-át adja,

— biztosítja, hogy a vizsgálathoz használt oldat 1 literére általában 1–10 ml oltóanyag jusson.

Eleveniszap

27. Az eleveniszapot frissen kell gyűjteni elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi méretű szennyvíztisztító berendezés levegőztető tartályából. Szükség esetén a durva szemcséket szitálással el kell távolítani (például 1 mm^2 szemnagyságú szitaháló segítségével), és az iszapot a felhasználásig aerob körülmények között kell tartani.

28. A másik lehetőség a durva részecskék eltávolítása utáni ülepítés vagy centrifugálás (például 1 100 g intenzitással 10 percig). A felülúszó folyadékot távolítsuk el. Az iszapot át lehet mosni az ásványi oldattal. A tömény iszapot az ásványi oldatban szuszpendáljuk úgy, hogy 3–5 g/l lebegőanyag-koncentrációt kapjunk. Ezt követően az iszapot a szükséges időn keresztül levegőztessük.

29. Az iszapot megfelelően működő hagyományos szennyvíztisztító telepről kell gyűjteni. Ha az iszapot nagy terhelésű szennyvíztisztítóból kellett gyűjtenünk, vagy úgy gondoljuk, hogy gátló hatású anyagokat tartalmaz, akkor mosni kell. Az újraszuszpendált iszapot alapos keverést követően ülepítsük vagy centrifugáljuk, majd távolítsuk el a felülúszó folyadékot, és a mosott iszapot ismét szuszpendáljuk egy újabb adag ásványi közegben. Ezt az eljárást addig ismételjük, amíg az iszap a fölös szubsztrátumtól vagy gátló anyagoktól mentesnek tekinthető.

30. A teljes újraszuszpendálódás elérése után, vagy ha kezeletlen iszapot használunk, vegyünk mintát közvetlenül a felhasználás előtt a lebegőanyagok száraz tömegének meghatározása céljából.

31. Egy további lehetőség az eleveniszap homogenizálása (3–5 g/l lebegőanyag-koncentráció). Az iszapot Waring laboratóriumi turmixgépben közepes sebességgel 2 percig keverjük. Az így kezelt iszapot 30 percen vagy szükség esetén hosszabb időn keresztül hagyjuk ülepedni, majd az oltóanyagként használni kívánt folyadékot dekantáljuk úgy, hogy az ásványi közeg minden literére körülbelül 10 mg oltóanyag jusson.

▼M4

32. A vakpróbákban a CO_2-fejlődés még tovább csökkenthető az iszap egy éjszakán keresztüli, CO_2-mentes levegővel történő levegőztetésével. Ebben a vizsgálatban olyan oltóanyagot használjunk, amelynek eleveniszap-eredetű lebegőanyag-koncentrációja 4 mg/l (13).

Szennyvíztisztító tisztított elfolyó vize

33. Alternatívaként elsősorban háztartási szennyvizet fogadó szennyvíztisztító telep vagy laboratóriumi méretű szennyvíztisztító berendezés tisztított elfolyó vizéből is származhat az oltóanyag. A mintát aerob körülmények között kell tartani, és a gyűjtés napján fel kell használni, vagy szükség esetén előkondicionálni kell. A durva szemcsés anyag eltávolítása végett az elfolyó vizet durva szűrőn át kell szűrni, és meg kell mérni a pH-ját.

34. IC-tartalmának csökkentése érdekében 1 órán keresztül buborékoltassunk át a szüredéken CO_2-mentes levegőt (15. bekezdés e) pont), miközben a pH-t foszforsav segítségével tartsuk 6,5 értéken (20. bekezdés). Nátrium-hidroxiddal állítsuk vissza a pH eredeti értékét (21. bekezdés), és körülbelül 1 órás ülepítést követően vegyünk megfelelő mennyiségű felülúszó folyadékot oltóanyagnak. Az átbuborékoltatás csökkenti az oltóanyag IC-tartalmát. Például ha a szűrt és átbuborékoltatott elfolyó víz ajánlott maximális literenkénti mennyiségét (100 ml) használtuk oltóanyagként, a vakpróbákban az edényekben jelen lévő IC mennyisége a 0,4–1,3 mg/l tartományon belül volt (14), ami a vizsgált vegyi anyaggal bevitt szén 2–6,5 %-ának felel meg 20 mg C/l koncentráció alkalmazása esetén és 4–13 %-ának, ha az alkalmazott koncentráció 10 mg C/l.

Felszíni víz

35. Megfelelő felszíni vízből mintát veszünk. A mintát aerob körülmények között kell tartani, és a mintavétel napján fel kell használni. A mintát szükség esetén szűréssel vagy centrifugálással koncentráljuk. Az egyes kísérleti edényekben használandó oltóanyagnak meg kell felelnie a 26. bekezdésben meghatározott követelményeknek.

Talaj

36. Megfelelő talajból mintát veszünk a talajfelszín alatt legfeljebb 20 cm mélységből. A kövek, a növénymaradványok és a gerinctelen állatok eltávolítását követően a talajmintát 2 mm-es szitahálón átszitáljuk (ha a minta túl nedves az azonnali szitáláshoz, akkor a szitálás megkönnyítése érdekében levegőn kicsit szárítjuk). A mintát aerob körülmények között tartjuk, és a mintavétel napján felhasználjuk. (Ha a mintát lazán bekötött fekete polietilén tasakban szállítjuk, akkor abban 2–4 °C hőmérsékleten legfeljebb egy hónapig tárolható.)

Az oltóanyag előkondicionálása

37. Az oltóanyag előkondicionálható a kísérleti körülményekhez, de nem adaptálódhat előre a vizsgált vegyi anyaghoz a kísérlet megkezdése előtt. Előkondicionálással csökkenthető a vakpróbákban tapasztalható CO_2-fejlődés. Az előkondicionálás azt jelenti, hogy az eleveniszapot a vizsgálathoz használt közegben való, 30 mg/l koncentrációra történő feloldást követően CO_2-mentes nedves levegővel legfeljebb 5–7 napig levegőztetjük a vizsgálat során alkalmazandó hőmérsékleten.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

A palackok száma

38. A vizsgálathoz szükséges palackok száma (lásd a 15. bekezdés a) pontját) az analízisek gyakoriságától és a vizsgálat időtartamától függ.

39. Ajánlott a palackokat hármasával analízisnek alávetni olyan időintervallumonként, amely lehetőséget ad a „tíznapos ablak” meghatározására. Emellett a vizsgálat végén az a), a b) és a c) sorozatból (lásd a 42. bekezdést) legalább öt palackot (15. bekezdés a) pont) kell analizálni, hogy a százalékos biológiai lebomlás középértékének 95 %-os konfidenciaintervallumai kiszámíthatók legyenek.

▼M4

Beoltott közeg

40. Az oltóanyagot úgy kell használni, hogy 4 mg/l eleveniszap-eredetű szárazanyag-koncentrációt kapjunk. Közvetlenül a felhasználás előtt készítsünk elegendő mennyiségű beoltott közeget, például 2 ml megfelelően kezelt, 2 000 mg/l koncentrációjú eleveniszap (27–32. bekezdés) 1 liter ásványisó-közeghez való hozzáadásával (19. bekezdés). Szennyvíztisztító tisztított elfolyó vizének használata esetén legfeljebb 100 ml elfolyó vizet (33. bekezdés) kell 900 ml ásványisó-közeghez adni (19. bekezdés), és a közeggel 1 literre hígítani.

A palackok előkészítése

41. A beoltott közeg aliquot részeit adagoljuk a palackokba úgy, hogy a gőztér és a folyadék térfogatarányа 1:2 legyen (például egy 160 ml befogadóképességű palackba 107 ml kerüljön). Ettől eltérő térfogatarány is alkalmazható, de a 11. bekezdésben foglaltakat figyelembe kell venni. Mindegyik oltóanyagtípus esetében ügyelni kell arra, hogy a beoltott közeg megfelelően legyen elkeverve, és így a kísérleti palackok között egyformán eloszthatóó legyen.

42. Az előkészített palacksorozatoknak (15. bekezdés a) pont) a következőket kell tartalmazniuk:

a) a kísérleti palackok (F_T) tartalmazzák a vizsgált anyagot;

b) a vakpróbákhoz használt kontrollpalackok (F_B) csak a vizsgálathoz használt közeget és az oltóanyagot tartalmazzák; ha a vizsgált anyag kísérleti edényekbe történő bejuttatásához bármilyen vegyi anyagot, oldószert, egyéb szert vagy üvegszálas szűrőt használtunk, akkor a palackoknak ezeket is tartalmazniuk kell;

c) az eljárás ellenőrzésére használt edények (F_C) referencia-vegyianyagot tartalmaznak;

d) amennyiben szükségesek, a vizsgált vegyi anyag lehetséges gátló hatásának ellenőrzésére használt edények (F_I) a vizsgált vegyi anyagot az F_T, a referencia-vegyianyagot az F_C palackokkal megegyező koncentrációban tartalmazzák (24. bekezdés);

e) a lehetséges nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt edényekhez (F_S) az a) pontban leírtakon túl 50 mg/l $HgCl_2$-t kell adni vagy az edényeket más módon (például autoklávban) sterilizálni kell.

43. A vízben oldható vizsgált vegyi anyagok és referencia-vegyianyagok bejuttatása vizes törzsoldat formájában történik (22., 23. és 24. bekezdés) úgy, hogy 10–20 mg C/l koncentrációt kapjunk.

44. Az oldhatatlan vizsgált vegyi anyagok és referencia-vegyianyagok a vizsgált vegyi anyag természetének megfelelően különféle módszerekkel juttathatók a palackokba (lásd a 22. bekezdés a)–e) pontját) a beoltott közeg hozzáadása előtt vagy után, a vizsgált vegyi anyag kezelésének módszerétől függően. A 22. bekezdés a)–e) pontjában felsorolt eljárások alkalmazása esetén a vakpróbákhoz használt F_B palackokat (42. bekezdés b) pont) hasonló módon kell kezelni, de a vizsgált vegyi anyag vagy a referencia-vegyianyag nélkül.

45. Az illékony vizsgált vegyi anyagokat a lezárt palackokba kell befecskendezni (47. bekezdés) mikrofecskendő segítségével. A dózist a befecskendezett mennyiség és a vizsgált vegyi anyag sűrűsége alapján kell kiszámítani.

46. Az edényekbe szükség esetén vizet kell adagolni úgy, hogy mindegyik edényben egyforma legyen a folyadék mennyisége. A gőztér és a folyadék térfogatarányát (általában 1:2), valamint a vizsgált vegyi anyag koncentrációját úgy kell megválasztani, hogy a gőztérben elegendő oxigén álljon rendelkezésre a teljes biológiai lebomláshoz.

▼M4

47. Ezt követően valamennyi palackot le kell zárni, például butilkaucsuk septummal ellátott alumínium kupakkal. Az illékony vizsgált vegyi anyagokat ekkor kell bejuttatni (45. bekezdés). A vizsgálathoz használt oldat DOC-koncentrációja csökkenésének figyelése és a kezdeti IC-koncentráció vagy más meghatározandó tényezők nulladik időpontban végzett analízise esetén (steril kontrollok, 42. bekezdés e) pont), megfelelő mintát kell venni a kísérleti edényből. A kísérleti edényt és tartalmát ezt követően meg kell semmisíteni.

48. A lezárt palackokat (15. bekezdés d) pont) a tartalmuk alapos elkeverése és szuszpenzióban tartása céljára megfelelő rázási sebességet (pl. 150–200 rpm) biztosító rotációs rázókészülékre helyezzük (15. bekezdés d) pont), és sötétben, 20 °C ± 1 °C értéken tartott hőmérsékleten inkubáljuk.

Mintavétel

49. A mintavétel menete az alkalmazkodási fázis hosszától és a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlásának reakciósebességétől függ. Az analízis céljára felhasznált palackokat a legalább hetente vagy – a teljes bomlási görbe megrajzolásához – gyakrabban (például hetente kétszer) végzett mintavétel napján megsemmisítjük. Az F_T, az F_B és az F_C, valamint – ha használjuk – az F_I és az F_S palackokból (42. bekezdés) a szükséges számú darabot levesszük a rázókészülékről. A vizsgálat időtartama általában 28 nap. Ha a biológiai bomlás görbéjéből arra lehet következtetni, hogy az állandósult állapot a 28. nap előtt beállt, akkor a 28. napnál korábban is be lehet fejezni a vizsgálatot. A százalékos biológiai lebomlás relatív szórását, illetve konfidenciahatárait a vizsgálat 28. napjára megmaradt öt palackból vett minták analízisének eredményeiből kell kiszámítani. A gátló hatás és a nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt palackokból nem kell olyan gyakran mintát venni, mint a többi palackból: az 1. és a 28. napon végzett mintavétel elegendő.

Szervetlen szén (IC) analízise

50. A palackokban végbemenő CO_2-fejlődést a szervetlen szén (IC) koncentrációja inkubációs időszak alatti növekedésének mérésével határozzuk meg. A vizsgálat során keletkező IC-mennyiség mérésére két ajánlott módszer létezik, amelyeket az alábbiakban ismertetünk. Mivel a két módszer kissé eltérő eredményre vezethet, ugyanazon vizsgálatsorozaton belül csak az egyiket használjuk.

51. Az a) módszer alkalmazása akkor ajánlott, ha a közeg tartalmazhatja például az üvegszálas szűrőpapír és/vagy az oldhatatlan vizsgált vegyi anyag maradványait. Ha szénanalizátor nem áll rendelkezésre, akkor gázkromatográfot is használhatunk ennek az analízisnek az elvégzéséhez. Fontos, hogy a gőztér gáztartalmának elemzésekor a palackok hőmérséklete a vizsgálat során használt hőmérséklettel megegyező vagy ahhoz közeli legyen. Az IC mérésére szénanalizátort használó laboratóriumok a b) módszert egyszerűbbnek találhatják. Fontos, hogy a CO_2 karbonáttá alakításához használt nátrium-hidroxid-oldat (21. bekezdés) vagy frissen készüljön, vagy IC-tartalma ismert legyen, hogy a vizsgálat eredményeinek kiszámítása során ezt az értéket vehessük figyelembe (lásd a 66. bekezdés b) pontját).

a) módszer: 3 alatti pH-értéket eredményező savas kezelés

52. Az egyes analízissorozatok előtt az IC-analizátort megfelelő IC-etalonnal (pl. N_2 -ben 1 tömegszázalék CO_2) kalibrálni kell. A mintavételre felhasznált palackok mindegyikébe a septum kupakon keresztül tömény foszforsavat (20. bekezdés) fecskendezünk, hogy a pH-t 3 alatti értékre csökkentsük (például 107 ml vizsgálati közeghez 1 ml-t adunk). Ezt követően a palackokat visszahelyezzük a rázókészülékre. A vizsgálathoz használt hőmérsékleten egy óráig folytatott rázást követően a palackokat levesszük a rázókészülékről, és mindegyik palack gőzteréből aliquot résznyi (pl. 1 ml) mintát veszünk, amelyet az IC-analizátorba fecskendezünk. A mért IC-koncentrációt mg C/l mértékegységben jegyezzük fel.

▼M4

53. A módszer elve, hogy a 3 alatti pH-t eredményező savas kezelést és a 20 °C-on történő ekvilibrációt követően a folyadék- és a gázfázis közötti – koncentrációként mért – CO_2-megoszlás egyensúlyi állandója 1,0 (13). Ezt a következőképpen legalább egyszer ki kell mutatni a vizsgálati elrendezésre vonatkozóan:

Készítsünk 5 és 10 mg/l IC-koncentrációjú palackokat vízmentes nátrium-karbonát (Na_2CO_3) CO_2-mentes vízben készített oldatát alkalmazva, amelyhez tömény foszforsavval (20. bekezdés) savasítsuk úgy a vizet, hogy a pH 6,5 legyen, és egy éjszakán buborékoltassunk át rajta CO_2-mentes levegőt, majd lúggal emeljük a pH-t semleges szintre. Gondoskodjunk arról, hogy a gőztér és a folyadék térfogatának aránya ugyanolyan legyen, mint a vizsgálatok során (pl. 1:2). Az 52. bekezdésben leírtak szerint végezzük el a savas kezelést és az ekvilibrációt, majd mind a gőztérben, mind a folyadékfázisban mérjük meg az IC koncentrációját. Ellenőrizzük a két koncentráció kísérleti hibahatáron belüli egyezését. Ha az egyezés nem áll fenn, akkor ellenőrizni kell az eljárást. Az IC folyadék- és gázfázis közötti megoszlásának ezt az ellenőrzését nem kell minden vizsgálat alkalmával elvégezni, valószínűleg a kalibráció során a legcélszerűbb végrehajtani.

54. A DOC-csökkenés mérése esetén (csak vízben oldható vizsgált vegyületek esetében) a külön (savas kezelésnek nem alávetett) palackok folyadékfázisaiból vett mintákat membránszűrővel történő szűrést követően a DOC-analizátorba fecskendezzük. Ezek a palackok szükség szerint az elsődleges biológiai lebonthatóság mérésére szolgáló további analízisek céljára is felhasználhatók.

b) módszer: a CO_2 karbonáttá alakítása

55. Az egyes analízissorozatok előtt az IC-analizátort megfelelő etalonnal – például nátrium-bikarbonát ($NaHCO_3$) CO_2-mentes vízben készített, 0–20 mg/l tartományon belüli IC-koncentrációjú oldata (lásd az 53. bekezdést) felhasználásával – kalibrálni kell. A mintavételre felhasznált palackok mindegyikébe a septum kupakon keresztül nátrium-hidroxid-oldatot (7M, 21. bekezdés) fecskendezünk (például 107 ml közeghez 1 ml-t adunk), majd a palackokat a vizsgálathoz használt hőmérsékleten egy órán keresztül rázókészülékkel kezeljük. Az egy napon felhasznált palackok mindegyikéhez ugyanazt az NaOH oldatot használjuk, de ez nem szükséges a vizsgálat során végrehajtott valamennyi mintavétel esetében. Ha a mintavételek alkalmával az abszolút vak IC-értékeket is meg kell határozni, akkor az NaOH-oldat IC-koncentrációját minden egyes használat alkalmával meg kell határozni. A rázókészülékről való levételt követően hagyjuk ülepedni a palackok tartalmát. Mindegyik palack esetében fecskendővel szívjunk fel megfelelő mennyiséget (pl. 1 000-ből 50 µl) a folyadékfázisból. A mintákat fecskendezzük az IC-analizátorba, és jegyezzük fel az IC-koncentráció értékeit. E módszer használata során gondoskodni kell arról, hogy az alkalmazott analizátor képes legyen a lúgos minták kezelésére.

56. A módszer elve, hogy a lúgos oldat hozzáadását és a rázást követően elhanyagolható lesz az IC koncentrációja a gőztérben. Ezt IC-etalont használva legalább egyszer ellenőrizni kell a vizsgálati elrendezésre vonatkozóan, amelynek során a lúg hozzáadását és az ekvilibrációt követően mind a gőztérben, mind a folyadékfázisban meg kell mérni az IC koncentrációját (lásd az 53. bekezdést). A gőztérben nullához kell közelítenie a koncentrációnak. A lényegében teljes mértékű CO_2-abszorpciónak ezt az ellenőrzését nem szükséges minden vizsgálat alkalmával elvégezni.

57. A DOC-csökkenés mérése esetén (csak vízben oldható vizsgált vegyületek esetében) a külön (hozzáadott lúgot nem tartalmazó) palackok folyadékfázisaiból vett mintákat membránszűrővel történő szűrést követően a DOC-analizátorba fecskendezzük. Ezek a palackok szükség szerint az elsődleges biológiai lebonthatóság mérésére szolgáló további analízisek céljára is felhasználhatók

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kiszámítása

58. A vizsgált vegyi anyag 100 %-os mineralizációját, azaz teljes széntartalma CO_2-vé alakulását feltételezve a ThIC vakpróbákban keletkező mennyiséget meghaladó része az egyes kísérleti palackokba a vizsgálat kezdetén bejuttatott TOC mennyiséggel egyenlő, vagyis:

$$ThIC = TOC.$$

Az összes szervetlen szén (TIC) tömege (mg) az egyes palackokban:

$$TIC = (\text{mg C a folyadékfázisban} + \text{mg C a gőztérben}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{[1] egyenlet}$$

ahol:

V_L = a folyadék térfogata a palackban (liter)

CL = IC koncentrációja a folyadékban (mg/l szénkoncentráció);

VH = a gőztér térfogata (liter);

CH = IC koncentrációja a gőztérben (mg/l szénkoncentráció).

A TIC kiszámítását az IC mérésére használható két analitikai módszerrel a 60. és a 61. bekezdés ismerteti. A százalékos biológiai lebomlás (*% D*) mindkét esetben:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{[2] egyenlet}$$

ahol:

TIC_t = a kísérleti palack TIC értéke a t időpontban (mg);

TIC_b = a vakpróbák TIC értékeinek középértéke a t időpontban (mg);

TOC = a kísérleti edénybe bejuttatott TOC kezdeti értéke (mg).

A százalékos biológiai lebomlást (% D) a kísérleti (F_T), a referencia-vegyianyagot tartalmazó (F_C) és – ha a vizsgálatban szerepelnek – a gátló hatás ellenőrzésére használt (F_I) palackokra egyaránt ki kell számítani az egyes mintavételi időpontokig keletkező TIC megfelelő mennyiségéből.

59. Ha a steril kontrollok (F_S) TIC-tartalma jelentős növekedést mutat a vizsgálat időszaka alatt, akkor ebből a vizsgált vegyi anyag nem biológiai úton történő lebomlására lehet következtetni, amit a D értékének [2] egyenlettel történő kiszámítása során figyelembe kell venni.

3 alatti pH-értéket eredményező savas kezelés

60. Mivel a 3 alatti pH-értéket eredményező savas kezelés kiegyenlíti a TIC koncentrációját a folyadék- és a gázfázisban, az IC-koncentrációt csak a gázfázisban kell mérni. Tehát az [1] egyenletből $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, ahol V_B = a szérumpalack térfogata.

A CO_2 karbonáttá alakítása

61. Ennél a módszernél is az [1] egyenlettel végezzük a számításokat, de mivel az IC mennyisége a gázfázisban elhanyagolható, ezt nem vesszük figyelembe, vagyis $V_H \times C_H = 0$ és $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Az eredmények kifejezése

62. A százalékos biológiai lebomlást (D) az inkubálási idő függvényében ábrázoló biológiai bomlási görbének lehetőség szerint mutatnia kell az alkalmazkodási fázist, a biológiai lebontási fázist, a tíznapos ablakot és az állandósult állapotot, azaz azt a fázist, amelyben a maximális lebomlási fok elérése után a görbe egy adott értéknél vízszintessé válik. Ha a párhuzamos kísérleti edények (F_T) értékei hasonlók (20 %-nál kisebb különbséget mutatnak), akkor elegendő a középértékek görbéjét megrajzolni (lásd 2. függelék, 1. ábra); ha nem, akkor minden egyes edény görbéjét meg kell rajzolni. Meg kell határozni a százalékos biológiai lebomlás állandósult állapothoz tartozó középértékét vagy a legmagasabb értékét (például amikor a görbe állandósult állapothoz tartozó szakasza csökkenést mutat), de az utóbbi esetben értékelni kell, hogy nem hibás értékről van-e szó. A vizsgálati jegyzőkönyvben a biológiai lebomlás így meghatározott maximális szintjét kell „a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlási fokaként" feltüntetni. Ha a kísérleti edények száma nem volt elegendő az állandósult állapot megjelenítéséhez, akkor a vizsgálat utolsó napján mért adatokat kell a középérték kiszámításához felhasználni. Ez az utolsó érték – öt ismétlés középértéke – jelzi a százalékos biológiai lebomlás meghatározásának pontosságát. A jegyzőkönyvben a „tíznapos ablak" végén kapott értéket is szerepeltetni kell.

63. Ugyanezzel a módszerrel meg kell rajzolni a referencia-vegyianyag (F_C) és – ha a vizsgálatban szerepelt – a nem biológiai lebomlási folyamatok és a gátló hatás ellenőrzésére használt edények (F_S és F_I) görbéjét.

64. Dokumentálni kell továbbá a vakpróbákhoz használt kontrollpalackokban (F_B) és – ha a vizsgálatban szerepeltek – a nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt edényekben (F_S) jelen lévő TIC mennyiségét.

65. Számítsuk ki a keverék egyetlen összetevője, a referencia-vegyianyag alapján várható elméleti IC-hozam felhasználásával az F_I-vel jelölt edényekhez tartozó D értéket. Ha a 28. napon $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, akkor feltételezhető, hogy a vizsgált vegyi anyag gátló hatással volt az oltóanyag aktivitására, és ez lehet a vizsgálati körülmények között kapott alacsony D_{FT} értékek magyarázata. Ebben az esetben a vizsgálatot alacsonyabb vizsgálati koncentrációval meg kell ismételni, és lehetőség szerint az oltóanyag DIC-tartalmát és a vakpróbákban keletkező TIC mennyiségét is csökkenteni kell, mert ellenkező esetben az alacsonyabb koncentráció alkalmazása csökkenteni fogja a módszer pontosságát. Alternatív megoldásként használhatunk másik oltóanyagot. Ha a nem biológiai lebomlási folyamatok ellenőrzésére használt F_S palackban a TIC mennyiségének jelentős (> 10 %) növekedése figyelhető meg, akkor lehetséges, hogy nem biológiai lebomlási folyamatok mentek végbe.

Az eredmények érvényessége

66. A vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha:

a) a referencia-vegyianyagot tartalmazó F_C edényekben a százalékos lebomlás középértéke 60 % fölé emelkedik az inkubálás 14. napjáig; és

b) a vakpróbákhoz használt F_B edényekben jelen lévő TIC mennyiségének középértéke a vizsgálat végén meghaladja a 3 mg C/l értéket.

Ha ezek a követelmények nem teljesülnek, akkor a vizsgálatot egy másik forrásból származó oltóanyaggal meg kell ismételni, és/vagy felül kell vizsgálni az eljárásokat. Például ha az a probléma, hogy a vakpróbákban sok IC keletkezik, akkor a 27–32. bekezdésben leírt eljárást kell alkalmazni.

(1) Százalékos lebomlás a referencia-vegyianyagot tartalmazó F_C edényekben.
(2) Százalékos lebomlás az F_I edényekben.

▼M4

67. Ha kimutatásra került, hogy a vizsgált vegyi anyagnak nincs gátló hatása (65. bekezdés), és mégsem sikerül elérni a ThIC 60 % százalékát, akkor a vizsgálatot emelt koncentrációjú oltóanyaggal (legfeljebb 30 mg/l eleveniszap, illetve literenként 100 ml szennyvíztisztító elfolyó vizének használata esetén) vagy más forrásokból származó oltóanyagokkal meg lehet ismételni, különösen akkor, ha a lebomlás a 20–60 % tartományon belül volt.

Az eredmények értelmezése

68. A ThIC 60 %-a feletti biológiai lebomlás a tíznapos ablakban ennél a vizsgálatnál azt mutatja, hogy a vizsgált vegyi anyag aerob körülmények között biológiailag gyorsan lebontható.

69. Ha a ThIC 60 %-aként meghatározott megfelelési értéket nem sikerül elérni, akkor meg kell határozni a közeg pH-értékét azokban a palackokban, amelyek nem lettek savval vagy lúggal kezelve; a 6,5 alatti érték arra utalhat, hogy nitrifikáció zajlott le. Ebben az esetben a vizsgálatot emelt koncentrációjú pufferoldattal meg kell ismételni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

70. Állítsunk össze egy táblázatot, amely az egyes mintavételi napokon felhasznált minden egyes kísérleti palackhoz (F_T), referencia-vegyianyagot tartalmazó palackhoz (F_C) és – ha a vizsgálatban szerepel – gátló hatás ellenőrzésére szolgáló kontrollpalackhoz (F_I) tartozó % D értékeket mutatja. Dokumentáljuk a vakpróbákban (F_B) és a steril kontrollokban (F_S) keletkező TIC mennyiségét, a DOC értékeket és/vagy az egyéb meghatározandó értékeket, valamint ezek százalékos csökkenését.

71. Határozzuk meg az állandósult állapothoz tartozó % D értékek középértékét, vagy használjuk a legmagasabb értéket, ha a biológiai bomlási görbe állandósult állapothoz tartozó szakasza csökkenő, és a jegyzőkönyvben ezt tüntessük fel „a vizsgált vegyi anyag biológiai lebomlási fokaként”. Az utóbbi esetben ellenőrizni kell, hogy nem hibás értékről van-e szó.

72. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgált anyag:

— közönséges név, kémiai név, CAS-szám, szerkezeti képlet és a releváns fizikai és kémiai tulajdonságok,

— a vizsgált vegyi anyag kémiai tisztasága (szennyezettsége).

Vizsgálati körülmények:

— hivatkozás erre a vizsgálati módszerre,

— az alkalmazott vizsgálati elrendezés leírása (pl. az edény térfogata, a gőztér és a folyadék térfogataránya, keverési módszer stb.),

— a vizsgált vegyi anyag és a referencia-vegyianyag vizsgálati elrendezésbe történő bevitele: alkalmazott vizsgálati koncentrációk és az egyes kísérleti palackokba adagolt szénmennyiség, oldószer esetleges használata,

— az alkalmazott oltóanyag részletezése, esetleges előkezelés és előkondicionálás,

— inkubálási hőmérséklet,

— az IC-analízis elvének validálása,

— az alkalmazott IC-analizátor (és bármely egyéb alkalmazott analitikai módszer) fő jellemzői,

— a párhuzamos edények száma.

Eredmények:

— nyers adatok és a biológiai lebonthatóság számított értékei táblázatos formában,

▼M4

— a vizsgált és a referencia-vegyianyagok százalékos lebomlását az idő függvényében ábrázoló grafikon, az alkalmazkodási fázis, a bomlási fázis, a tíznapos ablak és a meredekség,

— százalékos lebomlás az állandósult állapotban, a vizsgálat végén és a tíznapos ablak végén,

— a vizsgálati eredmények esetleges elvetésének oka,

— az alkalmazott eljárás szempontjából releváns bármely egyéb körülmény,

— az eredmények szöveges elemzése.

SZAKIRODALOM

(1) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása – CO_2-fejlődés-vizsgálat (C.4-C. módszer)

(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 and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; felülvizsgált szöveg: 1999). Vízminőség. Szerves vegyületek vizes közegben való teljes, aerob, biológiai lebonthatóságának kiértékelése. Szén-dioxid-fejlődéssel járó vizsgálat (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 and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and 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 and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and 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, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593, (1999) Vízminőség. Szerves vegyületek teljes aerob biológiai lebonthatóságának kiértékelése vizes közegben. A lezárt edényzet szervetlen széntartalmának meghatározásán alapuló módszer (a gőztér CO_2-tartalmának vizsgálata).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace C02 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 and Starkey M (1999). An „inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) E melléklet C.4. fejezete: A „gyors" biológiai lebonthatóság meghatározása

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) E melléklet C.11. fejezete: Eleveniszap-légzésgátlási vizsgálat.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and 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, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Vízminőség. Útmutató a vízben rosszul oldódó szerves vegyületek előkészítésére és kezelésére azok vizes közegben való biológiai lebonthatóságának értékeléséhez.

▼M4

1. függelék

RÖVIDÍTÉSEK ÉS FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

IC: Szervetlen szén

$ThCO_2$: Elméleti szén-dioxid-felszabadulás (mg): az a számított szén-dioxid-mennyiség, amelynek a vizsgált vegyi anyag ismert vagy mért széntartalmából létre kell jönnie a teljes mineralizáció során; mg fejlődött szén-dioxid/mg vizsgált vegyi anyag formában is használják.

DOC: Oldott szerves szén: az oldatban jelen lévő szerves szén, vagy a 0,45 mikrométeres szűrőn átszűrhető, vagy 15 percig tartó kb. 4 000 g (kb. 40 000 m sec^{-2}) intenzitású centrifugálást követően a felülúszó folyadékban maradó szerves szén.

DIC: Oldott szervetlen szén.

ThIC: Elméleti szervetlenszén-termelődés.

TIC: Összes szervetlen szén.

Biológiailag gyorsan lebontható: Önkényes besorolás, amelybe olyan vegyi anyagok tartoznak, amelyek bizonyos meghatározott, a teljes biológiai lebonthatóság meghatározására szolgáló szűrővizsgálatok követelményeinek megfeleltek; ezek a vizsgálatok olyan szigorúak, hogy feltételezhető, hogy az ilyen vegyi anyagok vízi környezetben aerob körülmények között biológiailag gyorsan és teljesen lebomlanak.

Tíznapos ablak: A 10 %-os biológiai lebomlás elérését közvetlenül követő 10 nap.

Jellegénél fogva biológiailag lebontható: Besorolás, amelybe olyan vegyi anyagok tartoznak, amelyekre nézve a biológiai lebonthatóság valamely vizsgálata egyértelműen igazolta az elsődleges vagy teljes biológiai lebonthatóságot.

Aerob körülmények közötti teljes biológiai lebomlás: Az a lebomlási szint, amely akkor következik be, amikor a vizsgált vegyületet teljesen felhasználják a mikroorganizmusok, és ez szén-dioxid, víz, ásványi sók és új mikrobás sejtalkotórészek (biomassza) keletkezését eredményezi.

Mineralizáció: A mineralizáció egy szerves vegyület teljes lebontása aerob körülmények között CO_2-re és H_2O-ra, anaerob körülmények között pedig CH_4-re, CO_2-re és H_2O-ra.

Alkalmazkodási fázis: A vizsgálat kezdetétől addig az időpontig tartó időszak, amikor a lebontó mikroorganizmusok akklimatizálódása és/vagy alkalmazkodása bekövetkezik, és a vizsgált vegyi anyag vagy szerves anyag biológiai lebomlása észlelhető szintet ér el (például a maximális elméleti biológiai lebomlás 10 %-át vagy ennél alacsonyabb szintet a mérési technika pontosságától függően).

Bomlási fázis: Az alkalmazkodási fázis végétől a maximális lebomlási szint 90 %-ának eléréséig tartó időszak

Állandósult állapot: Az állandósult állapot az a fázis, amelyben a lebomlás maximális szintet ér el, és a biológiai bomlási görbe vízszintessé válik.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, e vizsgálati módszer alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

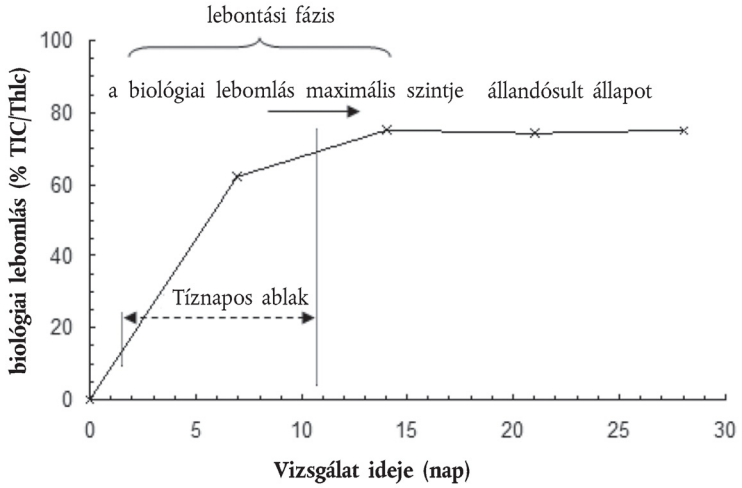
▼M4

2. függelék

Példa a biológiai bomlási görbére

1. ábra

1-oktanol biológiai lebomlása a gőztér CO_2 tartalmának vizsgálata során



Glosszárium

biológiai lebomlás

lebontási fázis

a biológiai lebomlás maximális szintje

állandósult állapot

Tíznapos ablak

Vizsgálat ideje (nap)

▼M4

C.30. **BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁS SZÁRAZFÖLDI KEVÉSSERTÉJŰEKBEN**

BEVEZETÉS

1. Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD 317. vizsgálati iránymutatásában (2010) leírt módszerrel. A vegyi anyagok környezetben bekövetkező sorsára vonatkozó vizsgálati módszerek közül a „Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat" (e melléklet C.13. fejezete (49)) 1996-ban, a „Biológiai felhalmozódás fenékiszapban élő üledéklakó kevéssertéjűekben" (53) 2008-ban került kiadásra. A vegyi anyagok vízi környezetben élő szervezetekre vonatkozó biológiai felhalmozódására vonatkozó adatok azonban nehezen vagy egyáltalán nem extrapolálhatók szárazföldi szervezetekre, például földigilisztákra. A vegyi anyagok talajban való biológiai felhalmozódása értékelésére jelenleg a vizsgált vegyi anyag lipofilitásán alapuló modellszámításokat – például (14) (37) – használunk, például ahogy az EU szakmai útmutatója (19) leírja. A kompartment specifikus vizsgálati módszer iránti igény már megfogalmazódott a szakirodalomban (például (55)). Egy ilyen módszer különösen fontos a szárazföldi táplálékláncokban végbemenő másodlagos mérgezés értékeléséhez (4). A halaktól különböző szervezetekben való biológiai felhalmozódás vizsgálatára több nemzeti módszer létezik (például (2) és (72)). Az American Society for Testing and Materials kidolgozott egy módszert a szennyezett talajokból származó anyagok trágyagilisztákban (Eisenia fetida, Savigny) és televényférgekben való biológiai felhalmozódásának a mérésére (3). A biológiai felhalmozódás mesterségesen szennyezett talajban való meghatározásának egy nemzetközileg elfogadott módszere – például (25) (29) – javíthatja a vegyi anyagok szárazföldi ökoszisztémákra gyakorolt kockázatának az értékelését.

2. A talajban élő lebontó gerinctelen állatok ki vannak téve a talajhoz kötött vegyi anyagok hatásainak. Az ezen állatok közé tartozó szárazföldi kevéssertéjűek fontos szerepet játszanak a talaj szerkezete és funkciója szempontjából (15) (20). A szárazföldi kevéssertéjűek a talajban és részben a talajfelszínen (különösen az alomrétegben) élnek; a biomasszát tekintve gyakran a legnépesebb fajokat képviselik (54). A talajban végzett bioturbációs tevékenységük révén és zsákmányállatként ezek az állatok jelentős mértékben befolyásolhatják a vegyi anyagok más szervezetek, például gerinctelen állatok (például ragadozó atkák és bogarak; például (64)), illetve gerinces ragadozók (például róka, sirály) számára való biológiai hozzáférhetőségét (18) (62). A szárazföldi kevéssertéjűek közé tartozó egyes fajok ökotoxikológiai vizsgálatokban való jelenlegi felhasználását az 5. függelék ismerteti.

3. Az ASTM a földigilisztafélék családjába tartozó trágyagilisztával (Eisenia fetida) és a közönséges televényféreggel (Enchytraeus albidus) végzett laboratóriumi talajtoxicitási és bioakkumulációs vizsgálatokra vonatkozó irányadó útmutatója (3) számos alapvető és hasznos részletet közöl a talajból felvett vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódása itt bemutatott vizsgálatának az elvégzésével kapcsolatban. A vizsgálati módszer ismertetése hivatkozik továbbá az OECD 315. vizsgálati iránymutatására (Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat) (49) és C.51. fejezetére (Biológiai felhalmozódás fenékiszapban élő üledéklakó kevéssertéjűekben) (53). A talajból felvett vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódásának vizsgálatára vonatkozó gyakorlati tapasztalatok és szakirodalom – például (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79) – ugyancsak fontos információforrásként szolgálnak ehhez a vizsgálati módszerhez.

4. Ez a vizsgálati módszer leginkább a talajon való adszorbeálódásra hajlamos stabil, semleges szerves vegyi anyagok vizsgálatára alkalmas. Lehetővé teszi továbbá a talajrészecskékhez kötődő stabil fémorganikus vegyületek biológiai felhalmozódásának a vizsgálatát. Fémek és más nyomelemek esetében ugyancsak alkalmazható.

ELŐFELTÉTELEK

5. Vegyi anyagok szárazföldi kevéssertéjűekben való biológiai felhalmozódását eddig nehézfémek (lásd például (63)), valamint 3,0 és 6,0 közötti log K_{ow} értékekkel rendelkező megmaradó szerves vegyi anyagok – például (40) – esetében vizsgálták. Ilyen vizsgálatok vonatkoztak még a következőkre:

— 6,0 feletti log K_{ow} értéket mutató vegyi anyagok (szuperhidrofób vegyi anyagok),

▼M4

— olyan vegyi anyagok, amelyek élő szervezetekben való biológiai felhalmozódásra való képessége ismert, például felületaktív vagy erősen adszorbeálódó vegyi anyagok,

— vegyi anyagok, amelyek szerkezeti jellemzői utalnak a biológiai felhalmozódás képességére, például ismert biológiai felhalmozódási potenciállal rendelkező vegyi anyagokkal analógok, és

— fémek.

6. A vizsgálat megkezdése előtt bizonyos információknak – mint amilyen például a közönséges név, a kémiai név (lehetőleg IUPAC név), a szerkezeti képlet, a CAS regisztrációs szám, a kémiai tisztaság, a biztonsági előírások, a megfelelő tárolási körülmények és az analitikai módszerek – rendelkezésre kell állniuk a vizsgált vegyi anyagokról. Mindezek mellett ismerni kell a következő információkat:

a) oldhatóság vízben;

b) oktanol-víz megoszlási hányados (K_{ow});

c) talaj- víz megoszlási hányados K_{oc}-ként kifejezve,

d) páranyomás;

e) lebomlási képesség (például talajban, vízben);

f) ismert metabolitok.

7. A vizsgált vegyi anyag lehet radioaktívan jelölt vagy nem jelölt. Az analízis megkönnyítése érdekében azonban ajánlott radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyagot használni. A döntést a kimutathatósági határértékek alapján kell meghozni, vagy attól függően, hogy a kiindulási vegyi anyagra és metabolitjaira vonatkozó mérések szükségesek-e. Radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyag használata és az összes radioaktív maradvány mérése esetén fontos jellemezni a kiindulási vegyi anyag és a kiindulási vegyi anyagtól eltérő jelölt anyag százalékarányát a talajban és a vizsgálathoz használt organizmusokban található radioaktívan jelölt maradványok esetében egyaránt, például az állandósult állapot időszaka alatt vagy a felvételi fázis végén gyűjtött mintákban, hogy a kiindulási vizsgált vegyi anyag és a talajban található metabolitok biológiai felhalmozódási tényezője (BAF) kiszámítható legyen (50. bekezdés). Az itt bemutatott módszer módosítható, például annak érdekében, hogy a radioaktívan nem jelölt szerves vizsgált vegyi anyagok vagy fémek méréséhez elegendő biomassza álljon rendelkezésre. Az összes radioaktív maradvány mérése esetén (az extrakciót, égetést vagy szövetstabilizálódást követő folyadékszcintillációs számlálással) a biológiai felhalmozódási tényezőt a kiindulási vegyi anyag és metabolitjai határozzák meg. A BAF kiszámítását lehetőség szerint az organizmusokban mért kiindulási vizsgált vegyi anyag és az összes radioaktív maradvány alapján kell végezni. Ezt követően a biológiai felhalmozódási tényezőből kiszámítható a féreg lipidtartalmára és a talaj szerves széntartalmára (OC) vonatkoztatott bióta-talaj felhalmozódási tényező (BSAF) a különböző biológiai felhalmozódási vizsgálatok eredményeinek az összehasonlítása végett.

8. Ismerni kell a vizsgált vegyi anyag vizsgálathoz használt fajokra gyakorolt toxikus hatását, például a felvételi fázis időtartamához tartozó hatáskoncentrációt (EC_x) vagy a letális koncentrációt (LC_x) (például (19)). A vizsgált vegyi anyag választott koncentrációja lehetőleg az akut aszimptotikus LC_{50} körülbelül 1 %-ának feleljen meg, és legalább tízszer nagyobb legyen, mint a használt analitikai módszerrel talajban kimutatható határérték. Lehetőség szerint a szubletális végpontokkal végzett hosszú távú vizsgálatokból származó toxicitási értékeket kell előnyben részesíteni (51) (52). Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, akkor egy akut toxicitási vizsgálat nyújthat hasznos információt (lásd például (23)).

▼M4

9. Rendelkezni kell egy ismert pontosságú, precizitású és érzékenységű, megfelelő analitikai módszerrel a vegyi anyag mennyiségi meghatározására a vizsgálathoz használt oldatokban, a talajban és a biológiai anyagban, a minták előállítására és tárolására vonatkozó részletes eljárásokkal, valamint az anyagbiztonsági adatlapokkal. Ismerni kell továbbá a vizsgált tétel talajban és féregszövetben való analitikai kimutathatóságának határértékeit. 14 C-vel jelölt vizsgált vegyi anyag használata esetén ismerni kell a fajlagos radioaktivitást (Bq/mol) és a szennyező anyagokhoz tartozó százalékos radioaktivitást. A vizsgált vegyi anyag fajlagos radioaktivitásának olyan nagynak kell lennie, hogy az analízist megkönnyítse, de a vizsgálathoz használt koncentráció ne váltson ki toxikus hatásokat.

10. A vizsgálat mesterséges talajjal és természetes talajokkal egyaránt végezhető. Természetes talaj használata esetén a vizsgálat megkezdése előtt ismerni kell például a talaj vagy a talajösszetevők eredetét, a pH-t, a szerves széntartalmat, a részecskeméret-eloszlást (homok, iszap és agyag százalékaránya) és a víztartó képességet (WHC) (3) (48).

A VIZSGÁLAT ELVE

11. A vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódását jellemző paraméterek a biológiai felhalmozódási tényező (BAF), a felvételi sebességi állandó (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e). Meghatározásaikat az 1. függelék tartalmazza.

12. A vizsgálat két fázisra oszlik: a felvételi (expozíciós) fázisra és az ürülési (expozíció utáni) fázisra. A felvételi fázisban kellő ismétlésszámot alkalmazva férgek csoportjait tesszük ki a vizsgált vegyi anyaggal mesterségesen szennyezett talaj hatásának. A kísérleti állatok mellett a vizsgált vegyi anyagtól eltekintve ugyanolyan körülmények között tartott kontrollcsoportokat alkalmazunk. Mérjük a kísérleti organizmusok száraz tömegét és lipidtartalmát. A kontrollcsoportba tartozó férgek esetében is meg lehet tenni ugyanezt. Analitikai háttérértékek (vakértékek) a kontrollcsoportba tartozó férgekből és a talajból vett minták elemzésével kaphatók. Az ürülési fázishoz a férgeket át kell helyezni a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó talajba. Az ürülési fázis csak akkor hagyható el, ha az expozíciós fázisban jelentős mértékű volt a vizsgált vegyi anyag felvétele. Az ürülési fázis arról nyújt tájékoztatást, hogy a kísérletben részt vevő szervezetek milyen ütemben választják ki a vizsgált vegyi anyagot (például (27)). Ha a felvételi fázis során nem állt be állandósult állapot, akkor a kinetikai paramétereket – a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_k), valamint a felvételi és az ürülési sebességi állandó(ka)t – a felvételi és az ürülési fázisokban kapott eredmények szimultán illesztése alapján kell meghatározni. A vizsgált vegyi anyag koncentrációját a férgekben/férgeken a vizsgálat mindkét fázisa során mindvégig figyelemmel kell kísérni.

13. A felvételi fázisban az állandósult állapot eléréséig legfeljebb 14 napig (televényférgeknél) vagy 21 napig (földigilisztáknál) kell mintákat venni a mérések elvégzéséhez (11) (12) (67). Az állandósult állapot akkor következik be, amikor a férgekben mért koncentrációt az idő függvényében mutató görbe az időtengellyel párhuzamossá válik, és a legalább kétnaponta vett mintákon végzett koncentrációanalízisek statisztikai összehasonlítása (például varianciaanalízis, regressziós analízis) három egymást követő esetben legfeljebb ± 20 %-os eltérést mutat.

14. Az ürülési fázishoz a vizsgálathoz használt organizmusokat át kell helyezni olyan edényekbe, amelyek ugyanazt a szubsztrátumot tartalmazzák, de a vizsgált vegyi anyag nélkül. Az ürülési fázis során 14 napon keresztül (televényférgeknél) vagy 21 napon keresztül (földigilisztáknál) kell mintákat venni a mérések elvégzéséhez, kivéve, ha a korábbi analitikai meghatározások a vizsgált vegyi anyag 90 %-os csökkenését mutatták a férgekben. A vizsgált vegyi anyagnak az ürülési fázis végén a férgekben mért koncentrációját ki nem választott maradványokként kell dokumentálni. Lehetőleg

▼M4

egyaránt ki kell számítani az állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényezőt (BAFss) – a láthatóan beállt állandósult állapotban a férgekben (Ca) és a talajban (Cs) mért koncentrációk hányadosaként – és a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAFK) – a talajból való felvétel sebességi állandója (ks) és az ürülési sebességi állandó (ke) hányadosaként (a meghatározásokat lásd az 1. függelékben), elsőrendű kinetikát feltételezve (a számításokat lásd a 2. függelékben). Ha nyilvánvalóan nem elsőrendű a kinetika, akkor más modelleket kell alkalmazni.

15. A felvételi sebességi állandót, az ürülési sebességi állandót (vagy más modellek használata esetén állandókat), a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_K) és – amennyiben lehetséges – e paraméterek mindegyike esetében a konfidenciahatárokat számítógépes módszerrel kell kiszámítani modellegyenletekből (az útmutatást lásd a 2. függelékben). Bármely modell esetében az illeszkedés megfelelősége meghatározható például a korrelációs együttható vagy a determinációs együttható alapján (az együttható 1-hez közeli értéke jelzi a jó illeszkedést), vagy khi-négyzet próbával. A becsült paraméterek szórásából vagy konfidenciahatárából is következtetni lehet a modell illeszkedésének megfelelőségére.

16. Erősen lipofil vizsgált anyagok esetén a vizsgálati eredmények variabilitásának csökkentése érdekében a biológiai felhalmozódási tényezőket a lipidtartalomra és a szerves széntartalomra vonatkoztatva kell kifejezni (a talaj szerves széntartalmának (OC) hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára). Ez a megközelítés azon a tényen alapul, hogy a vegyi anyagok egyes osztályainál nyilvánvaló összefüggés áll fenn a biológiai felhalmozódási potenciál és a lipofilitás között, amint azt halaknál egyértelműen kimutatták (47). Az ilyen vegyi anyagok biológiai felhalmozódása a hal lipidtartalmától függ. A fenékiszapban élő organizmusoknál is hasonló korrelációt állapítottak meg, például (30) (44). A szárazföldi kevéssertéjűeknél is kimutattak hasonló összefüggést, például (5) (6) (7) (14). Ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a kísérleti állatok lipidtartalmát ugyanabból a biológiai anyagból lehet meghatározni, mint amit a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározására használunk. A másik lehetőség, hogy kontroll állatokat használunk a lipidtartalom mérésére.

A VIZSGÁLAT ÉRVÉNYESSÉGE

17. A következő feltételeknek kell teljesülniük mind a kontrollok, mind a kezelések során ahhoz, hogy a vizsgálat érvényes legyen:

— A vizsgálat végén a felvételi és az ürülési fázisban mért mortalitás összességében nem haladhatja meg a behelyezett férgek összlétszámának 10 %-át (földigilisztáknál), illetve 20 %-át (televényférgeknél).

— *Eisenia fetida* és *Eisenia andrei* használata esetén a felvételi és az ürülési fázis végén mért tömegveszteség középértéke nem haladhatja meg az egyes fázisok elején mért kezdeti friss tömeg 20 %-át.

A MÓDSZER LEÍRÁSA

A vizsgálathoz használt fajok

18. A biológiai felhalmozódás vizsgálatához a szárazföldi kevéssertéjűek közé tartozó több faj is ajánlott. A leggyakrabban használt fajok az Eisenia fetida vagy Eisenia andrei (földigiliszta-félék), illetve az Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus vagy Enchytraeus luxuriosus (televényférgek), amelyek leírását az 5. függelék tartalmazza.

▼M4

Készülékek

19. A berendezés valamennyi részét illetően kerülni kell az olyan anyagok használatát, amelyek oldódhatnak, adszorbeálhatják a vizsgált vegyi anyagot, vagy amelyekből más vegyi anyagok mosódhatnak ki, illetve amelyek ártalmasak lehetnek a vizsgálathoz használt állatokra. Szabványos, kémiailag semleges anyagból készült, a terhelés mértékének – vagyis a kísérleti állatok számának – megfelelő térfogatú négyszögletes vagy hengeres edények használhatók. A vizsgálathoz használt közeggel érintkező felszerelések rozsdamentes acélból, műanyagból vagy üvegből készülhetnek. A vizsgálati edényeket megfelelő módon le kell fedni, hogy a férgek ne szökhessenek ki belőlük, de az elegendő levegőellátás biztosított legyen. Magas adszorpciós együtthatóval rendelkező vegyi anyagok, például szintetikus piretroidok vizsgálata esetén szilanizált üveg használata lehet szükséges. Ilyenkor a felszerelést használat után meg kell semmisíteni (49). Ügyelni kell, hogy a radioaktívan jelölt vizsgált tételek és illékony vegyi anyagok ne kikerülhessenek ki a vizsgálati elrendezésből. Megfelelő abszorbenst tartalmazó csapdák (például üveg gázmosó palackok) alkalmazásával meg kell akadályozni a maradványok elillanását a vizsgálati edényekből.

Talaj

20. A vizsgálathoz olyan minőségű talajt kell használni, amely lehetővé teszi a vizsgálathoz használt organizmusok túlélését és lehetőség szerinti szaporodását az alkalmazkodási és a vizsgálati időszakok alatt anélkül, hogy rendellenes megjelenést vagy viselkedést mutatnának. A férgeknek bele kell ásniuk magukat a talajba.

21. A vizsgálat során az e melléklet C.8. fejezetében (48) leírt mesterséges talajt ajánlott szubsztrátumként használni. A biológiai felhalmozódási vizsgálatokhoz való használatra szánt mesterséges talaj előállítását és a mesterséges talaj tárolására vonatkozó ajánlásokat a 4. függelék tartalmazza. A levegőn szárított mesterséges talaj a felhasználásig szobahőmérsékleten tárolható.

22. Szennyezésmentes helyről származó természetes talajok is szolgálhatnak a vizsgálathoz és/vagy a férgek tenyésztéséhez használt talajként. A természetes talajokat jellemezni kell legalább a következőkkel: származás (gyűjtés helye), pH, szerves széntartalom, részecskeméret-eloszlás (homok, iszap és agyag százalékaránya), maximális víztartó képesség (WHC_{max}) és százalékos víztartalom (3). A talajban, illetve a talajösszetevőkben található mikro-szennyező anyagok analízise a felhasználás előtt hasznos információkat szolgáltathat. Mezőgazdasági földterületről származó talaj használata esetén meg kell győződni arról, hogy a talajt nem kezelték növényvédőszerrel vagy kezelt állatoktól származó trágyával a mintavételt megelőző legalább egy évben, illetve szerves trágyával a mintavételt megelőző legalább fél évben (50). A természetes talajok kevéssertéjűekkel végzett ökotoxikológiai laboratóriumi vizsgálatok során történő felhasználás előtti kezelésének leírása a szakirodalomban megtalálható (3). A természetes talajokat a lehető legrövidebb ideig szabad csak a laboratóriumban tárolni.

A vizsgált anyag bevitele

23. A vizsgált vegyi anyagnak be kell épülnie a talajba. Ehhez figyelembe kell venni a vizsgált vegyi anyag fizikai és kémiai tulajdonságait. Ha a vizsgált vegyi anyag vízben oldható, akkor a talajba keverés előtt vízben fel kell oldani. Vízben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén egy vagy több (mesterséges) talajösszetevő vizsgált vegyi anyaggal való bevonása az ajánlott szennyezési eljárás. A kvarchomokot vagy annak egy részét például át lehet itatni a vizsgált vegyi anyag megfelelő szerves oldószerrel készített oldatával, amelyet aztán lassan elpárologtatunk, amíg a homok megszárad.

▼M4

Ezt követően a bevont részt össze lehet keverni a nedves talajjal. Ennek az eljárásnak az a legfőbb előnye, hogy a talajba nem kerül oldószer. Természetes talaj használata esetén a vizsgált vegyi anyag bejuttatásához szennyezhetjük a talaj egy levegőn szárított részét a vizsgált vegyi anyaggal a mesterséges talajra vonatkozóan az imént bemutatott módon, vagy a nedves talajba keverhetjük a vizsgált vegyi anyagot, majd a következő lépésben elpárologtatjuk az oldódást segítő szert, amennyiben ilyet használtunk. A nedves talaj oldószerekkel való érintkezését általában amennyire csak lehet kerülni kell. Figyelembe kell venni a következőket (3):

— Ha nem vizet használunk oldószerként, akkor olyan oldószert kell használni, amely vízzel elegyíthető, és/vagy eltávolítható (például elpárologtatható) úgy, hogy csak a vizsgált vegyi anyag maradjon a talajban.

— Az oldószer vizsgálatára szolgáló kontroll használata esetén negatív kontroll nem szükséges. Az oldószer vizsgálatára szolgáló kontroll edénynek a legnagyobb koncentrációban kell tartalmaznia a talajhoz adott oldószert, amelynek ugyanabból a tételből kell származnia, mint amelyet a törzsoldat készítéséhez használtunk. Az oldódást segítő megfelelő szer kiválasztásának fő szempontjai az oldószer toxikus hatása és illékonysága, valamint a vizsgált vegyi anyag választott oldószerben való oldhatósága.

24. Vízben és szerves oldószerekben rosszul oldódó vizsgált vegyi anyagok esetén a kívánt vizsgálati koncentráció eléréséhez vizsgálati edényenként 2,0–2,5 g finomra őrölt kvarchomokot összedolgozhatunk a vizsgált vegyi anyag megfelelő mennyiségével például mozsárban. A kvarchomok és a vizsgált vegyi anyag e keverékét hozzáadjuk az előnedvesített talajhoz, és alaposan elkeverjük megfelelő mennyiségű ionmentesített vízzel úgy, hogy a szükséges nedvességtartalmat kapjuk. A végtermékként kapott keveréket elosztjuk a vizsgálati edények között. Az eljárást minden egyes vizsgálati koncentráció esetén megismételjük, és egy vizsgálati edényenként 2,0–2,5 g finomra őrölt kvarchomokot tartalmazó, megfelelő kontroll edényt is készítünk.

25. A szennyezést követően meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag koncentrációját a talajban. A vizsgálathoz használt organizmusok behelyezése előtt ellenőrizni kell a vizsgált vegyi anyag homogén eloszlását a talajban. A szennyezési módszert és az adott szennyezési eljárás indoklását dokumentálni kell (24).

26. A talaj és a pórusvíz fázis közötti egyensúlynak ideális esetben a vizsgálathoz használt organizmusok behelyezése előtt be kell állnia; 20 °C hőmérsékleten erre négy napot ajánlott számítani. Számos vízben rosszul oldódó szerves vegyi anyag esetében az adszorbeálódott és oldott frakciók közötti valódi egyensúly eléréséhez napokra vagy hónapokra lehet szükség. A vizsgálat céljától függően, például ha a környezeti feltételeket kell utánozni, a mesterségesen szennyezett talaj hosszabb ideig „érlelhető”, például fémek esetében három héten keresztül 20 °C hőmérséklet mellett (22).

A vizsgálathoz használt organizmusok tenyésztése

27. A férgeket lehetőleg állandó laboratóriumi tenyészetben kell tartani. Az *Eisenia fetida* és az *Eisenia andrei*, valamint a televényféreg fajok laboratóriumi körülmények közötti tenyésztésének módszereire vonatkozóan az 5. függelék ad útmutatást (lásd még (48) (51) (52)).

28. A vizsgálathoz használt férgeken nem lehetnek megfigyelhető betegségek, rendellenességek és paraziták.

A VIZSGÁLAT ELVÉGZÉSE

29. A vizsgálathoz használt organizmusokat a felvételi fázisban tesszük ki a vizsgált vegyi anyag hatásának. A felvételi fázis 14 nap (televényférgeknél) vagy 21 nap (földigilisztáknál), kivéve, ha kimutatható, hogy az állandósult állapot elérése ennél előbb bekövetkezett.

▼M4

30. Az ürülési fázishoz a férgeket át kell helyezni a vizsgált vegyi anyagot nem tartalmazó talajba. Az első mintavételt az ürülési fázis kezdete után 4 – 24 órával kell végezni. A 21 napos felvételi fázisra és 21 napos ürülési fázisra vonatkozó mintavételi ütemtervekre a 3. függelék mutat be példákat.

A vizsgálathoz használt organizmusok

31. A szárazföldi televényférgek számos fajánál az egyedtömeg nagyon kicsi (például az *Enchytraeus albidus* esetében egy egyed nedves tömege 5–10 mg, az *Enchytraeus crypticus* vagy az *Enchytraeus luxuriosus* esetében pedig még kevesebb); a tömegmérések és a kémiai analízisek elvégzéséhez szükség lehet az egyes ismétlésekhez tartozó férgek együttes vizsgálatára (azaz az adott ismétléshez tartozó valamennyi férget fel kell használni ahhoz, hogy egyetlen analitikai szöveteredményt kapjunk). Minden egyes ismétléshez 20 televényféreg egyedet kell használni, és legalább három ismétlést kell alkalmazni. Ha a vizsgált vegyi anyag analitikai kimutathatósági határértéke magas, több féregre lehet szükség. Ha a vizsgálathoz nagyobb egyedtömeggel rendelkező fajokat használunk (*Eisenia fetida* és *Eisenia andrei*), akkor egy egyedet tartalmazó ismétlések is használhatók.

32. A vizsgálathoz hasonló tömegű földigilisztákat (például az *Eisenia fetida* és az *Eisenia andrei* esetében 250–600 mg tömegű egyedeket) kell használni. A televényférgeknek (például *Enchytraeus albidus*) körülbelül 1 cm hosszúnak kell lenniük. Az egy adott vizsgálathoz használt valamennyi féregnek ugyanabból a forrásból kell származnia, és kifejlett állatnak kell lennie, amelynél a nyereg (clitellum) már kialakult (lásd az 5. függeléket). Mivel az állatok tömege és kora hatással lehet a BAF értékekre (például az eltérő lipdtartalom és/vagy a peték jelenléte következtében), ezeket a paramétereket pontosan dokumentálni kell, és figyelembe kell venni az eredmények értelmezése során. Az expozíciós időszak alatt lerakott gubók is befolyásolhatják a BAF értékeket. Az átlagos nedves és a száraz tömeg becslése végett ajánlott a vizsgálat előtt lemérni a vizsgálathoz használt férgek egy részmintáját.

33. A talaj férgekhez viszonyított arányának elég nagynak kell lennie ahhoz, hogy a felvételi fázisban minél kevésbé csökkenjen a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a talajban. *Eisenia fetida*, illetve *Eisenia andrei* használata esetén 50 g (száraz tömeg), a televényférgek esetében pedig 10–20 g (száraz tömeg) egy féregre jutó minimális talajmennyiség biztosítása ajánlott. Az edényeknek 2–3 cm (televényférgeknél), illetve 4–5 cm (földigilisztáknál) talajréteget kell tartalmazniuk.

34. A tenyészetből kivesszük a vizsgálathoz használni kívánt férgeket (például ékszerész csipesszel televényférgek használata esetén). A kifejlett állatokat nem kezelt kísérleti talajba helyezzük, hogy akklimatizálódjanak, és tápláljuk (lásd a 36. bekezdést). Ha a vizsgálati körülmények eltérnek a tenyésztési körülményektől, akkor 24–72 órás akklimatizálódási időszak szükséges ahhoz, hogy a férgek alkalmazkodjanak a vizsgálati körülményekhez. Az akklimatizációt követően a földigilisztákat tiszta vizet tartalmazó üvegedényekbe (például petri-csészékbe) helyezzük, és leöblítjük, majd azt követően lemérjük a tömegüket, mielőtt a vizsgálathoz használt talajba helyeznénk őket. A mérés előtt a férgeket finoman az edény széléhez kell ütögetni, vagy enyhén megnedvesített papírtörölközővel óvatosan meg kell őket törölgetni, hogy a felesleges vizet eltávolíthassuk róluk.

35. A vizsgálathoz használt organizmusok viselkedését figyelni és dokumentálni kell. A földigilisztákkal végzett kísérletekben az állatok (a kontroll és a kezelt csoport egyaránt) akkor mutatnak normális viselkedést, ha néhány órán belül beássák magukat a talajba; ezt a férgek vizsgálati edényekbe való behelyezését követő 24 órán belül ellenőrizni kell. Ha a földigiliszták nem ássák be magukat a talajba (például a felvételi fázis félidejét több mint 10 %-kal meghaladó időszak elteltével), az vagy arra utal, hogy a vizsgálati

▼M4

körülmények nem megfelelők, vagy arra, hogy a vizsgálathoz használt organizmusok nem egészségesek. Ilyen esetben a vizsgálatot le kell állítani, és meg kell ismételni. A televényférgek főként a talajszemcsék közti pórusokban élnek, és kültakarójuk gyakran csak részben érintkezik a környező szubsztrátummal; a televényférgek esetében az expozíciót egyenértékűnek tételezzük fel függetlenül attól, hogy beássák-e magukat a talajba, vagy sem, és az utóbbi esetben a vizsgálatot nem feltétlenül szükséges megismételni.

Táplálás

36. Ha a vizsgálathoz használt talaj összes szerves széntartalma alacsony, akkor a férgeket táplálni kell. Mesterséges talaj használata esetén az ajánlott heti táplálékadag (amelyet hetente egyszer kell adni) a földigilisztáknál a talaj száraz tömegének minden grammjára 7 mg szárított istállótrágya, televényférgeknél pedig a talaj száraz tömegének minden grammjára 2–2,5 mg őrölt zabpehely (11). Az első táplálékadagot közvetlenül a vizsgálathoz használt organizmusok behelyezését követően kell a talajba keverni. Lehetőleg ugyanolyan típusú táplálékot kell használni, mint a tenyésztés során (lásd az 5. függeléket).

Fény és hőmérséklet

37. A vizsgálatot szabályozott, 16 órás világos és 8 órás sötét periódusból álló ciklusokat alkalmazva kell végezni, lehetőleg úgy, hogy a vizsgálati edények 400–800 lx fényt kapjanak (3). A vizsgálat teljes időszaka alatt 20 ± 2 °C hőmérsékletet kell biztosítani.

Vizsgálati koncentrációk

38. A vizsgálathoz egyetlen koncentrációt használunk. A további koncentráció(k) szükségességét indokolni kell. Az analitikai kimutathatósági határértékhez közeli toxicitású (EC_x) vegyi anyag vizsgálata esetén nagy fajlagos aktivitást biztosító radioaktív jelölésre van szükség. Fémek esetén a koncentrációnak a szövetre és a talajra jellemző háttérszint felett kell lennie.

Ismétlések

39. A kinetikai mérésekhez (a felvételi és az ürülési fázisban) mintavételi pontonként legalább három ismétlést kell alkalmazni minden egyes kezelt edény esetében. Összességében az ismétlésszámnak elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy a felvételi és az ürülési fázisban valamennyi mintavételt el lehessen végezni a megfelelő időpontban.

40. A biológiai megfigyelésekhez és mérésekhez (például a száraz és nedves tömeg aránya, lipidtartalom), valamint a férgek és a talaj háttér-koncentrációjának analíziséhez használt negatív kontrollok esetében legalább 12 ismétlés szükséges (négy a vizsgálat kezdetén, négy a felvételi fázis végén és négy az ürülési fázis végén végzett mintavételekhez), amennyiben a vízen kívül más oldószert nem használunk. Ha a vizsgált vegyi anyaggal való szennyezéshez oldódást segítő szert használtunk, akkor a kezelt ismétlések mellett a vizsgált vegyi anyagon kívül minden egyéb összetevőt tartalmazó kontrollokat is be kell állítani a szolubilizáló szer hatásának az ellenőrzésére (négy ismétlést a vizsgálat kezdetén, négyet a felvételi fázis végén és négyet az ürülési fázis végén végzett mintavételekhez). Ebben az esetben a negatív kontrollok esetében további négy ismétlésre (oldószert nem tartalmazó edények) lehet szükség a felvételi fázis végén végzett választható mintavételekhez. Ezek az ismétlések az oldószer kontrollal való biológiai összehasonlításra szolgálnak, amelyből az oldószer vizsgálathoz használt organizmusokra gyakorolt lehetséges hatásáról kaphatunk tájékoztatást. Ajánlatos elegendő számú (például nyolc) további tartalék ismétlést is biztosítani mind a kezelt, mind a kontroll edényekhez.

▼M4

A talajminőség-mérés gyakorisága

41. A vizsgálat kezdetén, valamint a felvételi és az ürülési fázisok végén meg kell mérni a talaj pH-ját és nedvességtartalmát, valamint a vizsgálat elvégzésére szolgáló helyiség (állandó) hőmérsékletét. A talaj nedvességtartalmát hetente egyszer ellenőrizni kell, amelyhez meg kell mérni a vizsgálati edények tömegét, és a tényleges értékeket össze kell hasonlítani a vizsgálat kezdetén mért kiindulási értékekkel. A vízveszteséget ionmentesített víz hozzáadásával pótolni kell.

A féreg- és talajminták gyűjtése és analízise

42. A földigilisztával és televényféreggel végzett biológiai felhalmozódási vizsgálatok felvételi és ürítési fázisaira vonatkozó ütemterv egy példáját a 3. függelék mutatja be.

43. A vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához a férgek behelyezése előtt, valamint a felvételi és az ürülési fázis során talajmintákat kell venni a vizsgálati edényekből. A vizsgálat során meg kell határozni a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának alakulását a férgekben és a talajban. Általában a talajra jellemző összkoncentrációt szokás mérni. Kiegészítésképpen a pórusvízre jellemző koncentráció is mérhető; ebben az esetben a vizsgálat megkezdése előtt ki kell dolgozni az indoklást és a megfelelő módszereket, amelyeknek a jegyzőkönyvben is szerepelniük kell.

44. A felvételi és az ürülési fázis során legalább hat alkalommal kell féreg- és talajmintákat gyűjteni. Ha a vizsgált vegyi anyag stabilitása bizonyított, a talajanalízisek száma csökkenthető. A felvételi fázis kezdetén és végén ajánlott legalább három ismétlést analizálni. Ha a talajban mért koncentráció a felvételi fázis végén több mint 30 %-kal eltér a kezdeti koncentrációtól, akkor a más napokon vett talajmintákat is analizálni kell.

45. Minden egyes mintavétel alkalmával el kell távolítani a férgeket az adott edény talajtartalmából (például az edény talajtartalmát egy nem túl mély tálon szétterítjük, majd egy puha ékszerész csipesszel kiemeljük a férgeket), és vízzel gyorsan át kell öblíteni egy nem túl mély pohárban vagy acéltálban. A fölösleges vizet el kell távolítani (lásd a 34. bekezdést). A férgeket óvatosan át kell helyezni egy előre lemért edénybe, majd azonnal le kell mérni a béltartalommal együtt.

46. Ezt követően hagyni kell, hogy a földigiliszták (*Eisenia* sp.) az éjszaka folyamán kiürítsék a béltartalmukat, például egy lefedett petri-csészében elhelyezett nedves szűrőpapíron (lásd a 34. bekezdést). A béltartalom ürítését követően a biomassza vizsgálat időszaka alatti esetleges csökkenésének az értékelése céljából meg kell határozni a férgek tömegét (lásd az érvényességi kritériumokat a 17. bekezdésben). A televényférgek tömegének mérését és szövetelemzését a béltartalom ürítése nélkül kell elvégezni, ám ez a férgek kis mérete miatt technikailag nehezen lenne kivitelezhető. A végleges tömeg meghatározását követően a férgeket azonnal el kell pusztítani a lehető legmegfelelőbb módszert alkalmazva (például folyékony hidrogénnel vagy –18 °C alatti hőmérsékletre történő fagyasztással).

47. Az ürülési fázis során a férgek szennyezett béltartalma tiszta talajra cserélődik. Ez azt jelenti, hogy ha a közvetlenül az ürülési fázis előtt vett mintában szereplő férgeken a béltartalom ürítése nélkül végezzük el a méréseket (televényférgek esetében), akkor azok a szennyezett talajból álló béltartalmat is tartalmazni fogják. A vízi kevéssertéjűek esetében azt feltételezzük, hogy az ürülési fázis első 4–24 órájában a szennyezett béltartalom nagy része tiszta üledékre cserélődik, például (46). Földigiliszták esetében hasonló eredmények születtek a radioaktívan jelölt kadmium és cink felhalmozódására vonatkozó vizsgálatok során (78). A televényférgek esetében az ürülési fázisban elsőként vett mintában mért koncentrációt lehet a béltartalom kiürülése utáni szövetkoncentrációnak tekinteni. Annak ellensúlyozása végett, hogy a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a nem szennyezett talaj általi hígítás miatti csökkenhet az ürülési fázisban, a béltartalom tömegét a férgek nedves tömegének az elpusztult férgek tömegéhez viszonyított aránya, illetve a férgek száraz tömegének az elpusztult férgek tömegéhez viszonyított aránya alapján is meg lehet becsülni.

▼M4

48. A lebomlás vagy egyéb veszteségek elkerülése érdekében a talaj- és féregmintákat lehetőleg közvetlenül az edényből való eltávolítást követően (vagyis 1–2 napon belül) kell analizálni, és ajánlott közelítő felvételi és ürülési sebesség értékeket számítani, ahogy a vizsgálat halad előre. Ha az analízist késleltetni kell, akkor a mintákat megfelelő módszert alkalmazva, például mélyhűtve (≤ -18 °C) kell tárolni.

49. Ellenőrizni kell, hogy a kémiai analízis pontossága és reprodukálhatósága, valamint a vizsgált vegyi anyag talaj- és féregmintákból való visszanyerése megfelel az adott módszernek; dokumentálni kell az extrakciós hatékonyságot, a kimutathatósági határértéket (LOD) és a mennyiségi meghatározás határértékét (LOQ). Hasonlóképpen ellenőrizni kell, hogy a vizsgált vegyi anyag nem mutatható ki a háttérnél nagyobb koncentrációban a kontroll edényekben. Ha a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a vizsgálathoz használt organizmusokban (C_a) a kontroll férgek esetében nagyobb, mint 0, ezt a kinetikai paraméterek számításánál figyelembe kell venni (lásd a 2. függeléket). A vizsgálat során a mintákat mindvégig úgy kell kezelni, hogy a szennyeződés és a veszteség (például a vizsgált vegyi anyag mintavevő eszközön való adszorbeálódása következtében) a lehető legkisebb mértékű legyen.

50. Radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyagok használata esetén lehetőség van a kiindulási anyag és a metabolitok analízisére. A vizsgált kiindulási vegyi anyag és a metabolitok mennyiségi meghatározása az állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén fontos információkat szolgáltat. A mintákat ezt követően „meg kell tisztítani”, hogy a vizsgált kiindulási vegyi anyag mennyisége külön is meghatározható legyen. Ajánlott azonosítani azokat a metabolitokat, amelyek önmagukban meghaladják az analizált minta (minták) összes radioaktivitásának 10 %-át.

51. Dokumentálni és a jegyzőkönyvben is szerepeltetni kell az összes visszanyerést, a vizsgált vegyi anyag visszanyerését a férgekben, a talajban és – ha a vizsgálatban szerepelnek – az elpárolgott vizsgált anyag elnyelésére szolgáló abszorbenst tartalmazó csapdákban.

52. Az adott vizsgálati edényből vett mintában szereplő egyedek összevonása a földigilisztánál kisebb televényférgek használata esetén elfogadható. Az ismétlések számának csökkenésével járó összevonás azonban korlátozza az adatok feldolgozására alkalmazható statisztikai eljárásokat. Ha egy adott statisztikai eljárást kell alkalmazni, vagy a próba erejének el kell érnie egy bizonyos szintet, akkor a vizsgálat során olyan számú ismétlést kell alkalmazni, amely a kívánt összevonás mellett az ezeknek a követelményeknek való megfelelést is biztosítja.

53. A BAF értékét ajánlott egyaránt kifejezni az összes száraz súly függvényében és – ha szükséges (azaz erősen hidrofób vegyi anyagok esetén) – a lipidtartalom függvényében. A lipidtartalom meghatározására megfelelő módszereket kell alkalmazni (egyes létező módszerek – például (31) (58) – e célra történő adaptálásával). Ezek a módszerek a kloroform/metanol extrakciós technikára épülnek. A klórozott oldószerek használata azonban kerülendő, a Bligh- és Dyer-féle módszer (9) szakirodalomban (17) leírt módosítását kell alkalmazni. Mivel előfordulhat, hogy a különböző módszerek eltérő értékeket eredményeznek, az alkalmazott módszert részletesen ismertetni kell. Amennyiben lehetséges, vagyis ha elegendő féregszövet áll rendelkezésre, akkor a lipidanalízist a vizsgált anyag analíziséhez használttal azonos mintán vagy extraktumon kell elvégezni, mivel a lipideket gyakran el kell távolítani az extraktumból ahhoz, hogy kromatográfiás módszerrel analizálható legyen (49). A másik lehetőség, hogy kontroll állatokat használunk a lipidtartalom mérésére, amelyre majd a BAF értékeket vonatkoztathatjuk. Ha ezt az utóbbi megközelítést használjuk, akkor a felszerelés kevésbé szennyeződik a vizsgált vegyi anyaggal.

▼M4

ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVVEZETÉS

Az eredmények kezelése

54. A vizsgált anyag felvételi görbéje az idő függvényében, aritmetikus skálán ábrázolja a vizsgált anyag férgekben/férgeken mért koncentrációjának alakulását a felvételi fázisban. Amennyiben a görbe kiegyenesedett, vagyis elérte az állandósult állapotot (a meghatározásokat lásd az 1. függelékben), az állandósult állapothoz tartozó BAF_{ss} biológiai felhalmozódási tényezőt a következőképpen kell kiszámítani:

$$\frac{C_a \text{ az állandúsult állapotban vagy a felvételi fázis végén (középérték)}}{C_s \text{ az állandósult állapotban vagy a felvételi fázis végén (középérték)}}$$

C_a a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a vizsgálathoz használt organizmusban

C_s a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a talajban

55. Ha nem állt be az állandósult állapot, akkor a BAF_{ss} helyett a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_K) kell kiszámítani a sebességi állandók alapján, az alábbiak szerint:

— A BAF_K-t a k_s és a k_e hányadosaként kell meghatározni.

— A felvételi és az ürülési sebességet lehetőleg párhuzamosan kell kiszámítani (lásd a 11. egyenletet a 2. függelékben).

— Az ürülési sebességi állandó (k_e) meghatározása általában az ürülési görbe alapján történik (amely a vizsgált tétel férgekben mért koncentrációjának az alakulását ábrázolja az ürülési fázisban). Ezt követően a felvételi sebességi állandó kiszámítható a k_e adott értékéből, valamint a C_a felvételi görbéből levezetett értékéből – ezeknek a módszereknek a leírását lásd a 2. függelékben. A BAF_K és a sebességi állandók meghatározásához lehetőleg számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecslést kell használni. Ha az ürülés folyamata nyilvánvalóan nem az elsőrendű kinetikát követi, akkor összetettebb modelleket kell alkalmazni.

Vizsgálati jegyzőkönyv

56. A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgált vegyi anyag:

— A vizsgált vegyi anyag talajban élő kevéssertéjűekre gyakorolt akut vagy hosszú távú toxikus hatására vonatkozóan rendelkezésre álló információk (például EC_x, LC_x, NOEC)

— kémiai tisztaság, fizikai jelleg, valamint fizikai és kémiai tulajdonságok, például log K_{ow}, vízben való oldhatóság,

— kémiai azonosító adatok; a vizsgált tétel származása, a használt oldószer meghatározása és koncentrációja,

— radioaktívan jelölt vizsgált vegyi anyag használata esetén a jelölt atomok pontos elhelyezkedése, a fajlagos radioaktivitás és a radiokémiai tisztaság.

A vizsgálathoz felhasznált faj:

— tudományos név, törzs, származás, esetleges előkezelés, akklimatizáció, életkor, mérettartomány, stb.

▼M4

Vizsgálati körülmények:

— az alkalmazott vizsgálati eljárás,

— az alkalmazott megvilágítás típusa és jellemzői, valamint a fényperiódus(ok),

— a vizsgálat kialakítása (például vizsgálati edények száma és mérete, talajtömeg és a talajréteg magassága, ismétlések száma, egy ismétlésre jutó férgek száma, vizsgálati koncentrációk száma, a felvételi és az ürítési fázisok időtartama, mintavételi gyakoriság),

— a vizsgálati edény anyagának indoklása,

— a vizsgálati tétel előkészítése és alkalmazása, valamint az adott módszer választásának okai,

— a névleges vizsgálati koncentrációk, a vizsgálati edényekben mért értékek középértékei és szórásuk, valamint az ezen értékek előállításának módszere,

— a mesterséges talaj összetevőinek a forrása vagy – természetes közeg használata esetén – a talaj származása, esetleges előkezelés leírása, kontroll eredmények (túlélés, biomassza képződés, szaporodás), a talaj jellemzői (pH, összes szerves széntartalom, részecskeméret-eloszlás (homok, iszap és agyag százalékaránya), WHC_{max}, százalékos víztartalom a vizsgálat elején és végén, valamint az elvégzett egyéb mérések),

— a talaj- és féregminták kezelésének részletes bemutatása, beleértve az előkészítés részleteit, a tárolást, a szennyezési eljárásokat, az extrakciót és az analitikai eljárásokat (és pontosságukat) a férgekre és a talajra vonatkozóan, valamint a lipidtartalmat (ha a mérése szerepelt a vizsgálatban) és a vizsgált tétel visszanyerését.

Eredmények:

— a férgek mortalitása a kontroll és az egyes vizsgálati edényekben, bármely megfigyelt rendellenes viselkedés (például talajkerülés, televényférgekkel végzett biológiai felhalmozódási vizsgálat esetén a szaporodás hiánya),

— a talaj és a vizsgálathoz használt organizmusok száraz és nedves tömegének az aránya (hasznos a viszonyításhoz),

— a férgek nedves tömege az egyes mintavételi időpontokban; földigilisztáknál a vizsgálat kezdetén és az egyes mintavételi időpontokban a béltartalom ürítése előtt és után mért nedves tömeg,

— a vizsgálathoz használt organizmusok lipidtartalma (ha meghatározásra került),

— a vizsgált vegyi anyag férgek általi felvételének és férgekből való kiürülésének kinetikáját ábrázoló görbék, valamint az állandósult állapot eléréséhez szükséges idő,

— a mintavételi időpontokhoz tartozó C_a és C_s (szórással és tartománnyal együtt, esettől függően) (a C_a a férgek nedves és száraz tömegének kg-jára jutó g-ban, a C_s a talaj nedves és száraz tömegéhez kg-jára jutó g-ban kifejezve). Ha a bióta-talaj felhalmozódási tényezőt (BSAF) is meg kell határozni (például a különböző lipidtartalmú állatokkal végzett kettő vagy több vizsgálat eredményeinek az összehasonlítása céljára), a C_a az organizmus lipidtartalmának kg-jára jutó g-ban, a C_s pedig a talaj szerves szén (OC) tartalmának kg-jára jutó g-ban is kifejezhető,

— ezeken kívül a jegyzőkönyvben szerepelhet még a BAF (amely azt fejezi ki, hogy a talaj hány grammja jut a férgek kilogrammjára), a talajból való felvétel sebességi állandója (amely azt fejezi ki, hogy egy napra vetítve a talaj hány grammja jut a férgek kilogrammjára), valamint a k_e ürülési sebességi állandó (amely az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki); a BSAF (amely azt fejezi ki, hogy a talaj szerves széntartalmának hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára),

▼M4

— ha a vizsgálatban a mérése szerepelt, a következők talajban és a vizsgálathoz használt állatokban kimutatott százaléka: a kiindulási vegyi anyag, a metabolitok és a megkötött maradványok (azaz a vizsgált vegyi anyag közönséges extrakciós módszerekkel nem kinyerhető százaléka),

— az adatok statisztikai elemzéséhez használt módszerek.

Az eredmények értékelése:

— az eredmények megfelelése a 17. bekezdésben felsorolt érvényességi kritériumoknak,

— nem várt vagy szokatlan eredmények, például a vizsgált vegyi anyag nem teljes mértékű kiürülése a vizsgálathoz használt állatokból.

SZAKIRODALOM

(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 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In 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 and 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 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (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 and 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 and 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, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 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) Az Európai Parlament és a Tanács 2006. December 18-I 1907/2006/EK rendelete a vegyi anyagok regisztrálásáról, értékeléséről, engedélyezéséről és korlátozásáról (REACH), az Európai Vegyianyag-ügynökség létrehozásáról, az 1999/45/EK irányelv módosításáról, valamint a 793/93/EGK tanácsi rendelet, az 1488/94/EK bizottsági rendelet, a 76/769/EGK tanácsi irányelv, a 91/155/EGK, a 93/67/RGK, a 93/105/EK és a 2000/21/EK bizottsági irányelv hatályon kívül helyezéséről, HL L 396., 2006.12.30., 1. o.

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(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 and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Available for download at: 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 pp.

(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 pp.

▼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 and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.

(33) Hund-Rinke K and 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. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Talajminőség. Szennyező anyagok hatása a földigilisztára (*Eisenia fetida*). 2. rész: A reprodukciós hatások meghatározása.

(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 pp.

(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, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) E melléklet C.8. fejezete: Toxicitás földigilisztákra.

(49) E melléklet C.13. fejezete: Biokoncentráció vizsgálata: átfolyásos hal vizsgálat.

(50) E melléklet C.21. fejezete: Talajlakó mikroorganizmusok: nitrogén-átalakítási vizsgálat.

(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 and 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. In: 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 and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: 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 and 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 and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: 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 and 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. In: 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, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and 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, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and 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 and 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 and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

1. függelék

FOGALOMMEGHATÁROZÁSOK

Biológiai felhalmozódás: a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten a vizsgált vegyi anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva. A biológiai felhalmozódás biokoncentrációs és biomagnifikációs folyamatok eredménye (lásd lentebb).

Biokoncentráció: a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – a vegyi anyagnak kizárólag a környező közegből való (vagyis a testfelületen keresztüli és talajemésztéssel történő) felvétele eredményeként – a vizsgált vegyi anyagnak a környező közegben lévő koncentrációjához viszonyítva.

Biomagnifikáció: a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/szervezeten – kizárólag szennyezett táplálékból vagy zsákmányállatból való felvétel eredményeként – a vizsgált vegyi anyagnak a szennyezett táplálékban vagy zsákmányállatban lévő koncentrációjához viszonyítva. A biomagnifikáció a vizsgált tétel táplálékhálón belüli átadásához vagy felhalmozódásához vezethet.

Ürülés: a vizsgált vegyi anyag kiürülése a vizsgálathoz használt organizmus szövetéből aktív vagy passzív folyamatok eredményeként, amelyek a vizsgált vegyi anyag környező közegben való jelenlététől vagy hiányától függetlenül mennek végbe.

Biológiai felhalmozódási tényező (BAF): a vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódási vizsgálat felvételi fázisának bármely időpontjában a vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának (C_a, a férgek száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) és a vegyi anyag környező közegben lévő koncentrációjának a hányadosa (C_s, a talaj száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve); a BAF azt fejezi ki, hogy a talaj hány kilogrammja jut a férgek egy kilogrammjára.

Állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényező (BAF_{ss}): az állandósult állapothoz tartozó BAF, amely nem változik jelentősen egy hosszabb időtartamon keresztül, amely alatt a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a környező közegben (C_s, a talaj száraz tömegének kg-jára jutó grammban kifejezve) állandó.

A közvetlenül a talajból való felvétel sebességi állandója és az ürülési sebességi állandó (k_s és k_e, lásd lentebb) hányadosából számított **biológiai felhalmozódási tényezőt** kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőnek (BAF_K) nevezzük.

Bióta-talaj felhalmozódási tényező (BSAF): a vizsgált vegyi anyag vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért, lipidtartalomra vonatkoztatott koncentrációjának és a vizsgált vegyi anyag talajban mért, szerves széntartalomra vonatkoztatott koncentrációjának a hányadosa az állandósult állapotban. A C_a-t az organizmus lipidtartalmának kilogrammjára jutó grammban, a C_s-t a talaj szerves széntartalmának kilogrammjára jutó grammban fejezzük ki; a BSAF azt fejezi ki, hogy a talaj szerves széntartalmának hány kilogrammja jut a férgek lipidtartalmának egy kilogrammjára.

Állandósult állapot vagy **platό**: az expozíciós fázisban párhuzamosan végbemenő felvételi és ürülési folyamatok közötti egyensúly. Az állandósult állapot akkor következik be, amikor a BAF alakulását az idő függvényében ábrázoló görbe párhuzamossá válik az időtengellyel, és a legalább kétnapos időközönként vett három egymást követő mintán végzett BAF analízis eredménye 20 %-nál kisebb eltérést mutat, és a három mintavételi időszak nem mutat statisztikailag számottevő eltéréseket. Ha a vizsgált vegyi anyag felvétele lassú, helyénvalóbb lehet a hétnapos időközök alkalmazása (49).

Szerves szén – víz megoszlási hányados (K_{oc}): a vegyi anyag talaj szerves szén frakciójában/frakcióján és vízben mért koncentrációjának a hányadosa az egyensúlyi állapotban.

Oktanol – víz megoszlási hányados (K_{ow}): a vegyi anyag n-oktanolban és vízben való oldhatóságának a hányadosa az egyensúlyi állapotban, esetenként P_{ow}-val is jelölik. A vegyi anyag vízi szervezetekben való felhalmozódási képességének kifejezésére a K_{ow} logaritmusát ($\log K_{ow}$) használjuk.

▼M4

Felvételi vagy expozíciós fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgálathoz használt organizmusok ki vannak téve a vizsgált vegyi anyag hatásának.

Talajból való felvétel sebességi állandója (k_s): a vizsgált tétel vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgált tétel talajfázisból való felvétele eredményeként bekövetkező növekedésének az ütemét meghatározó számérték. A k_s azt fejezi ki, hogy egy napra vetítve a talaj hány grammja jut a férgek kilogrammjára.

Ürülési fázis: azt az időtartamot jelöli, amelyen keresztül a vizsgált vegyi anyag vizsgálathoz használt organizmusokból való kiürülését (vagy a vizsgálathoz használt organizmusokban való nettó csökkenését) vizsgáljuk a vizsgálathoz használt organizmusok szennyezett közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően.

Ürülési sebességi állandó (k_e): a vizsgált tétel vizsgálathoz használt organizmusban/organizmuson mért koncentrációjának a vizsgálathoz használt organizmusok vizsgált anyagot tartalmazó közegből a vizsgált anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követő csökkenésének az ütemét meghatározó számérték; a k_e az egy napra jutó ürülés mértékét fejezi ki.

Vizsgált vegyi anyag: Bármely, ennek a vizsgálati módszernek az alkalmazásával vizsgált anyag vagy keverék.

▼M4

2. függelék

A felvételi és az ürülési paraméterek kiszámítása

A biológiai felhalmozódási vizsgálatok fő végpontja a biológiai felhalmozódási tényező (BAF). A BAF értéke az állandósult állapotban a vizsgálathoz használt organizmusban mért koncentráció (C_a) és a talajban mért koncentráció (C_s) hányadosaként számítható ki. Ha a felvételi fázisban nem következik be az állandósult állapot, az állandósult állapothoz tartozó biológiai felhalmozódási tényező (BAF_{ss}) helyett a kinetikai biológiai felhalmozódási tényezőt (BAF_K) kell kiszámítani a sebességi állandókból. Jelezni kell azonban, hogy a BAF az állandósult állapothoz tartozó koncentrációkon alapul-e vagy sem.

A BAF_K, a talajból való felvétel sebességi állandója (k_s) és az ürülési sebességi állandó (k_e) meghatározása általában számítógéppel végzett nemlineáris paraméterbecsléssel történik, például a szakirodalomban (68) leírt modellek alapján. Ezek a számítógépes programok az egymást követő időpontokban gyűjtött koncentráció adatokból és a következő modellegyenletekből számítják ki a BAF_K, a k_s és a k_e értékeit:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[1. egyenlet]}$$

vagy

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[2. egyenlet]}$$

ahol:

C_a = a vegyi anyag koncentrációja a férgekben [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_s = szövetben való felvételi sebességi állandó [a talaj egy napra vetítve a férgek kg-jára jutó grammja]

C_s = a vegyi anyag koncentrációja a talajban [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_e = ürülési sebességi állandó [1/nap]

t_c = a felvételi fázis végének időpontja

Ha a vizsgált vegyi anyag hatásának ki nem tett férgekben a háttér-koncentráció – például a 0. napon – jelentős mértékben eltér a nullától (ez például fémek esetén fordulhat elő), akkor a háttér-koncentrációt ($C_{a,0}$) bele kell foglalni az egyenletekbe, amelyek így a következők:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[3. egyenlet]}$$

és

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[4. egyenlet]}$$

Ha a felvételi fázisban a vizsgált vegyi anyag koncentrációja a talajban jelentős csökkenést mutat, akkor a következő modellek alkalmazhatók (például (67) (79)):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[5. egyenlet]}$$

▼M4

ahol:

C_s = a vegyi anyag koncentrációja a talajban [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_0 = talajban való lebomlás sebességi állandója [1/nap]

C_0 = a vegyi anyag kezdeti koncentrációja a talajban [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[6. egyenlet]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[7. egyenlet]}$$

ahol:

C_a = a vegyi anyag koncentrációja a férgekben [nedves vagy száraz tömeg kg-jára jutó g]

k_s = szövetben való felvételi sebességi állandó [a talaj egy napra vetítve a férgek kg-jára jutó grammja]

k_0 = talajban való lebomlás sebességi állandója [1/nap]

k_e = ürülési sebességi állandó [1/nap]

t_c = a felvételi fázis végének időpontja.

Amennyiben a felvételi fázis alatt beáll az állandósult állapot (vagyis $t = \infty$), az 1. egyenlet

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[1. egyenlet]}$$

leegyszerűsíthető a következőképpen:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

vagy

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[8. egyenlet]}$$

Ezt követően a vizsgált tétel állandósult állapothoz tartozó koncentrációja a féregszövetben ($C_{a,ss}$) kiszámítható a k_s/k_e x C_s képlettel.

A bióta-talaj felhalmozódási tényező (BSAF) a következőképpen számítható ki:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[9. egyenlet]}$$

ahol f_{oc} a szerves szén frakció a talajban, f_{lip} pedig a lipid frakció a féregben, amelyeket lehetőleg a vizsgálat során gyűjtött mintákon kell meghatározni a száraz, illetve a nedves tömeg alapján.

Az ürülés kinetikája az ürülési fázisból származó adatokból, az alábbi modellegyenlet és számítógépes nemlineáris paraméterbecslés alkalmazásával modellezhető. Ha az idő függvényében ábrázolt adatpontok a vizsgált tétel állatokban mért koncentrációjának folyamatos exponenciális csökkenését jelzik, akkor az ürülés időbeli alakulása egyrekeszes modellel (9. egyenlet) jellemezhető.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[10. egyenlet]}$$

▼M4

Az ürülési folyamatok esetenként kétfázisúak, azaz a korai fázisban a C_a gyors csökkenése figyelhető meg, amelyet az ürülés későbbi fázisaiban a vizsgált tételek koncentrációjának lassúbb csökkenése vált fel, például (27) (68). A két fázis azzal a feltevéssel értelmezhető, hogy a szervezet két különböző részből áll, amelyekből eltérő sebességgel ürül ki a vizsgált tétel. Ebben az esetben tanulmányozni kell a vonatkozó szakirodalmat, például (38) (39) (40) (78).

A fenti modellegyenletekkel egyszerre is kiszámíthatók a kinetikai paraméterek (k_s és k_e), ha az elsőrendű kinetikai modellt a felvételi és az ürülési fázisból származó valamennyi adatra egyidejűleg alkalmazzuk. A felvételi és az ürülési sebességi állandók együttes kiszámítását lehetővé tévő módszer leírása a szakirodalomban (41), (73) és (70) megtalálható.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[11. egyenlet]}$$

Megjegyzés: A felvételi és ürülési paraméterek egyesített felvételi és ürülési adatokból történő egyidejű becslése esetén a 11. egyenletben az »m« deszkriptor teszi lehetővé a számítógépes program számára az egyenletben szereplő résztényezők hozzárendelését az adott fázishoz tartozó adathalmazokhoz és az értékelés helyes elvégzését (a felvételi fázis esetén m = 1; az ürülési fázis esetén m = 2).

Mindazonáltal ezeket a modellegyenleteket kellő körültekintéssel kell használni, különösen akkor, ha a vizsgált vegyi anyag biológiai hozzáférhetősége vagy (biológiai) lebomlása a vizsgálat folyamán változik (lásd például (79)).

▼M4

3. függelék

PÉLDÁK A TALAJBÓL FELVETT VIZSGÁLT VEGYI ANYAG BIOLÓGIAI FELHALMOZÓDÁSA VIZSGÁLATÁNAK ÜTEMTERVÉRE

Földigilisztával végzett vizsgálat

a) Felvételi fázis 8 különböző napon történő mintavétellel a kinetikai számítások céljára

Nap	Tennivaló
– 6	Az elkészített talaj kondicionálása 48 órán keresztül,
– 4	A talajfrakció szennyezése a vizsgált vegyi anyag oldatával; az esetlegesen használt oldószer elpárologtatása; a talajösszetevők összekeverése; a talaj szétosztása a vizsgálati edényekben; ekvilibráció 4 napon keresztül a vizsgálati körülmények között (fémmel szennyezett talaj esetén 3 napon keresztül),
– 3 – – 1	A vizsgálathoz felhasználandó organizmusok kiemelése az akklimatizációs tenyészetből; a talajösszetevők előkészítése és nedvesítése,
0	a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; talajminták gyűjtése a kezelt edényekből és az oldószer kontrollokból a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához; táplálékadag adása; a férgek tömegének lemérése és a férgek véletlenszerű elosztása a vizsgálati edények között; elegendő féreg-alminta elkülönítése az analitikai háttérértékek, a nedves és száraz tömeg, valamint a lipidtartalom meghatározásához; a vizsgálati edények tömegének lemérése a talaj nedvességtartalmának az ellenőrzése végett; zárt vizsgálati elrendezés használata esetén a levegőellátás ellenőrzése,
1	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása; talaj- és féregminták gyűjtése a vizsgált tétel koncentrációjának a meghatározásához,
2	Ugyanaz, mint az 1. napon,
3	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása,
4	Ugyanaz, mint az 1. napon,
5 – 6	Ugyanaz, mint a 3. napon,
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
8 – 9	Ugyanaz, mint a 3. napon,
10	Ugyanaz, mint az 1. napon,
11 – 13	Ugyanaz, mint a 3. napon,
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
15 – 16	Ugyanaz, mint a 3. napon,
17	Ugyanaz, mint az 1. napon,
18 – 20	Ugyanaz, mint a 3. napon,

▼**M4**

Nap	Tennivaló
21	Ugyanaz, mint az 1. napon; a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére; a felvételi fázis vége; a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós edényekből tiszta talajt tartalmazó edényekbe az ürítési fázishoz (béltartalom-ürítés nélkül); talaj- és féregminták gyűjtése az oldószer kontrollokból.
	Az expozíció előtti tennivalókat (ekvilibrációs fázis) a vizsgált vegyi anyag tulajdonságainak a figyelembevételével kell ütemezni.
	A 3. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

b) Ürülési fázis

Nap	Tennivaló
– 6	A talajösszetevők előállítása és nedvesítése; az elkészített talaj kondicionálása 48 órán keresztül,
– 4	A talajösszetevők összekeverése; a talaj szétosztása a vizsgálati edényekben; inkubálás 4 napon keresztül a vizsgálati körülmények között,
0 (a felvételi fázis vége)	A hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a férgek tömegének lemérése és a férgek véletlenszerű elosztása a vizsgálati edények között; táplálékadag adása; a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós edényekből tiszta talajt tartalmazó edényekbe; talaj- és féregminták gyűjtése 4 – 6 óra elteltével a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához,
1	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása; talaj- és féregminták gyűjtése a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásához,
2	Ugyanaz, mint az 1. napon,
3	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása,
4	Ugyanaz, mint az 1. napon,
5–6	Ugyanaz, mint a 3. napon,
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
8–9	Ugyanaz, mint a 3. napon,
10	Ugyanaz, mint az 1. napon,
11–13	Ugyanaz, mint a 3. napon,
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag adása; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
15–16	Ugyanaz, mint a 3. napon,
17	Ugyanaz, mint az 1. napon,

▼M4

Nap	Tennivaló
18–20	Ugyanaz, mint a 3. napon,
21	Ugyanaz, mint az 1. napon; a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére; talaj- és féregminták gyűjtése az oldószer kontrollokból.
	Az ürülési fázis kezdete előtt ugyanúgy kell előkészíteni a talajt, mint a felvételi fázis előtt.
	A 3. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

Televényféreggel végzett vizsgálat

a) Felvételi fázis 8 különböző napon történő mintavétellel a kinetikai számítások céljára

Nap	Tennivaló
– 6	Az elkészített talaj kondicionálása 48 órán keresztül,
– 4	A talajfrakció szennyezése a vizsgált vegyi anyag oldatával; az esetlegesen használt oldószer elpárologtatása; a talajösszetevők összekeverése; a talaj szétosztása a vizsgálati edényekben; ekvilibráció 4 napon keresztül a vizsgálati körülmények között (fémmel szennyezett talaj esetén 3 napon keresztül),
– 3 – – 1	A vizsgálathoz felhasználandó organizmusok kiemelése az akklimatizációs tenyészetből; a talajösszetevők előkészítése és nedvesítése,
0	a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; talajminták gyűjtése a kezelt edényekből és az oldószer kontrollokból a vizsgált vegyi anyag koncentrációjának a meghatározásáho; táplálékadag hozzáadása a talajhoz; a férgek tömegének lemérése és a férgek véletlenszerű elosztása a vizsgálati edények között; elegendő féregalminta elkülönítése az analitikai háttérértékek, a nedves és száraz tömeg, valamint a lipidtartalom meghatározásához; a vizsgálati edények tömegének lemérése a talaj nedvességtartalmának az ellenőrzése végett; zárt vizsgálati elrendezés használata esetén a levegőellátás ellenőrzése,
1	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása; talaj- és féregminták gyűjtése a vizsgált tétel koncentrációjának a meghatározásához,
2	Ugyanaz, mint az 1. napon,
3	A levegőellátás ellenőrzése, a férgek viselkedésének és a hőmérsékletnek a dokumentálása,
4	Ugyanaz, mint az 1. napon,
5–6	Ugyanaz, mint a 3. napon,
7	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag hozzáadása a talajhoz; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére, és az elpárolgott víz pótlása,
9	Ugyanaz, mint az 1. napon,
10	Ugyanaz, mint a 3. napon,

▼**M4**

Nap	Tennivaló
11	Ugyanaz, mint az 1. napon,
12–13	Ugyanaz, mint a 3. napon,
14	Ugyanaz, mint az 1. napon; táplálékadag hozzáadása a talajhoz; a hőmérséklet és a talaj pH-jának mérése; a vizsgálati edények tömegének ismételt lemérése a talaj nedvességtartalmának ellenőrzésére; a felvételi fázis vége; a férgek áthelyezése a fennmaradó expozíciós edényekből tiszta talajt tartalmazó edényekbe az ürítési fázishoz (béltartalom-ürítés nélkül); talaj- és féregminták gyűjtése az oldószer kontrollokból.
	Az expozíció előtti tennivalókat (ekvilibrációs fázis) a vizsgált vegyi anyag tulajdonságainak a figyelembevételével kell ütemezni.
	A 3. napnál leírt tennivalókat minden nap el kell végezni (legalább munkanapokon).

▼M4

4. függelék

Mesterséges talaj – Az előállításra és a tárolásra vonatkozó ajánlások

Mivel az adott forrásból származó természetes talaj nem biztos, hogy az egész év folyamán rendelkezésre áll, és a talajban élő organizmusok, valamint a mikroszennyező anyagok jelenléte befolyásolhatják a vizsgálatot, ajánlott az e melléklet C.8. fejezetében (Toxicitás földigilisztákra) (48) leírtaknak megfelelően készített mesterséges szubsztrátumot használni ebben a vizsgálatban. Ez a talaj számos faj számára lehetővé teszi a túlélést, a növekedést és a szaporodást, teljes mértékben szabványosított, és rendelkezésre állnak a vizsgálati és tenyésztési körülmények laboratóriumon belüli és laboratóriumok közötti összehasonlításának az adatai.

Talajösszetevők

Tőzeg:	10 %	Az OECD 207. iránymutatása (48) szerinti tőzegmoha,
Kvarchomok:	70 %	Ipari kvarchomok (levegőn szárított); szemcseméret: a részecskék több mint 50 százaléka a 50–200 μm tartományban, de minden részecske mérete ≤ 2 mm,
Kaolinit agyag:	20 %	Kaolinit tartalom ≥ 30 %,
Kalcium-karbonát:	≤ 1 %	Porított, vegytiszta $CaCO_3$.

A mesterséges talaj szerves széntartalma igény szerint csökkenthető, például a tőzegtartalom száraz talaj 4–5 %-ára való csökkentésével és a homoktartalom ennek megfelelő növelésével. A szerves széntartalom csökkentése esetén kisebb a lehetősége a vizsgált vegyi anyag talajon (szerves szénen) való adszorbeálódásának, miközben a vizsgált vegyi anyag hozzáférhetősége a férgek számára javul (74). Kimutatták, hogy az alacsonyabb – például 2,7 % (33), (61), szerves széntartalmú természetes talajokban vizsgált *Enchytraeus albidus* és az *Eisenia fetida* esetében a szaporodással kapcsolatos érvényességi kritériumok teljesülnek, és a tapasztalatok szerint ez az 5 %-os tőzegtartalommal rendelkező mesterséges talajjal is elérhető.

Előállítás

A talaj száraz összetevőit alaposan összekeverjük (például nagyüzemi méretű laboratóriumi keverőgéppel). Ezt körülbelül egy héttel a vizsgálat megkezdése előtt kell megtenni. Az összekevert száraz talajösszetevőket a vizsgált tétellel való szennyezés előtt ionmentesített vízzel legalább 48 órán keresztül nedvesítjük a savasság kiegyensúlyozása/stabilizálása céljából. A pH meghatározásához a talaj és 1 M KCl oldat 1:5 arányú keverékét használjuk. Ha a pH a szükséges tartományon (6,0 ± 0,5) kívül van, akkor megfelelő mennyiségű $CaCO_3$-t kell a talajhoz adni, vagy új adag talajt kell készíteni.

A mesterséges talaj maximális víztartó képességét (WHC) az ISO 11268-2 szabvány (35) szerint kell meghatározni. A vizsgálat megkezdése előtt legalább két nappal a száraz mesterséges talajt annyi ionmentesített víz vagy művíz hozzáadásával nedvesítjük, hogy a végső víztartalom körülbelül felét kapjuk. A végső víztartalom a maximális WHC 40–60 %-a. A vizsgálat kezdetén az előnedvesített talajt annyi adagra osztjuk, ahány vizsgálati koncentrációt és kontrollt használunk a vizsgálathoz, és a vizsgált tétel oldata és/vagy ionmentesített víz vagy művíz hozzáadásával a nedvességtartalmat beállítjuk a WHC_{max} 40–60 %-ának megfelelő szintre. A nedvességtartalmat a vizsgálat kezdetén és végén meg kell határozni (105 °C-on). Az optimális nedvességtartalmat a faj igényei határozzák meg (a nedvességtartalom a következőképpen is ellenőrizhető: ha a talajt a kezünkkel finoman összenyomjuk, kis vízcseppeknek kell megjelenniük az ujjaink között).

▼M4

Tárolás

A mesterséges talaj száraz összetevői a felhasználás időpontjáig szobahőmérsékleten tárolhatók. Az elkészített, előnedvesített talajt a szennyezés előtt legfeljebb három napig lehet hűvös helyen tárolni; gondoskodni kell arról, hogy minél kevesebb víz párologhasson el belőle. A vizsgált tétellel szennyezett talajt azonnal fel kell használni, kivéve, ha olyan információk állnak rendelkezésre, amelyek szerint az adott talaj tárolása nem befolyásolja a vizsgált tétel toxikus hatását és biológiai hozzáférhetőségét. Ebben az esetben a szennyezett talajmintákat az adott vizsgált tétel esetében ajánlott körülmények között lehet tárolni az analízis elvégzéséig.

▼M4

5. függelék

A talajból felvett vizsgált vegyi anyag biológiai felhalmozódásának vizsgálatához ajánlott szárazföldi kevéssertéjű féregfajok

Földigiliszták

A vizsgálathoz ajánlott faj a földigilisztafélék (Lumbricidae) családjába tartozó *Eisenia fetida* (Savigny 1826). 1972 óta két alfajt különböztetünk meg (*Eisenia fetida* és *Eisenia andrei* (10)). Jaenike (36) szerint ezek valódi, külön fajok. Az *Eisenia fetida* könnyen felismerhető a gyűrűin keresztülfutó élénksárga csíkozásáról, míg az *Eisenia andrei* egységes sötétvörös színű. A valószínűleg a Feketetenger vidékéről származó földigiliszták ma már világszerte elterjedtek, különösen az olyan, antropogén tevékenység hatására létrejött élőhelyeken, mint a komposzthalmok. Mindkét földigilisztaféle egyaránt használható ökotoxikológiai és biológiai felhalmozódási vizsgálatokhoz.

Az *Eisenia fetida* és az *Eisenia andrei* kereskedelmi forgalomban beszerezhető, például horgászcsaliként. Más földigilisztafélékkel összehasonlítva életciklusuk rövid, körülbelül 2–3 hónap alatt érik el az ivarérett kort (szobahőmérsékleten). A 20–24 °C körüli hőmérséklet az optimális a számukra. A viszonylag nedves, közel semleges pH-jú, magas szervesanyag-tartalommal rendelkező tenyésztalajokat kedvelik. Mivel ezeket a fajokat immár 25 éve széles körben használják a szabványosított ökotoxikológiai vizsgálatokban, tenyésztésük jól meghatározott (48) (77).

Mindkét faj állati eredetű trágyák széles körében tenyészthető. Az ISO szabványban (35) ajánlott tenyésztőközeg ló- vagy szarvasmarhatrágya és tőzeg fele-fele arányú keveréke. A közegnek 6–7 körüli pH-értékkel (kalcium-karbonáttal szabályozható) és alacsony ionos vezetőképességgel (6 mS/cm-nél alacsonyabb vezetőképességgel vagy 0,5 %-nál alacsonyabb sókoncentrációval) kell rendelkeznie, valamint ammóniával vagy állati vizelettel bőségesen szennyezettnek kell lenni. Használható továbbá kereskedelmi forgalomban beszerezhető, adalékanyagoktól mentes kertészeti célú talaj vagy az OECD iránymutatása (48) szerinti mesterséges talaj, illetve ezek fele-fele arányú keveréke. A szubsztrátumnak nedvesnek kell lennie, de ne legyen túl vizes. A tenyésztéshez 10–50 liter térfogatú tartályok a megfelelők.

Ahhoz, hogy szabványos életkorú és tömegű giliszták álljanak a rendelkezésünkre, a legcélszerűbb gubókból kezdeni a tenyésztést. Tehát a friss szubsztrátumot tartalmazó tenyésztőedényekbe kifejlett férgeket kell helyezni, amelyek lerakják a gubókat. A gyakorlati tapasztalatok szerint körülbelül 100 kifejlett féreg/1 kg szubsztrátum (nedves tömeg) populációsűrűséggel jó szaporodási ütem érhető el. A kifejlett férgeket 28 nap elteltével el kell távolítani. A gubókból kikelő földigilisztákat ivarérett korban, azaz legalább 2, de nem több mint 12 hónap elteltével lehet a vizsgálat céljára felhasználni.

A fent bemutatott fajok egyedei akkor tekinthetők egészségeseknek, ha a szubsztrátumban mozognak, nem próbálják elhagyni azt, és folyamatosan szaporodnak. A nagyon lassú mozgás vagy a farokrész sárga színe (az *Eisenia fetida* esetében) a szubsztrátum kimerülésére utal. Ebben az esetben friss szubsztrátum használata vagy a tartályban lévő állatok számának a csökkentése ajánlott.

Kiegészítő válogatott irodalomjegyzék

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, Egeler 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 RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

Televényférgek

A vizsgálathoz ajánlott faj az *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (közönséges televényféreg). A gyűrűsférgek (Annelida) törzsébe tartozó televényférgek (Enchytraeidae) családján belül az *Enchytraeus albidus* az egyik legnagyobb méretű faj (akár a 15 mm-t is elérheti), és világszerte elterjedt (például (8)). Az *Enchytraeus albidus* tengeri, édesvízi és szárazföldi élőhelyeken egyaránt megtalálható, főként rothadó szerves anyagban (hínár, komposzt), ritkábban réteken fordul elő (42). Ez a széles ökológiai tolerancia, valamint egyes morfológiai változatok arra utalnak, hogy a fajon belül különböző fajták lehetnek.

Az *Enchytraeus albidus* kereskedelmi forgalomban beszerezhető, haleledelként árulják. Ellenőrizni kell, hogy a tenyészetben ne legyenek más, általában kisebb fajok (60). A tenyészet ilyen szennyeződése esetén az összes férget vízzel át kell mosni egy petri-csészében. Ezt követően ki kell válogatni a kifejlett *Enchytraeus albidus* példányokat (sztereomikroszkóp segítségével), és új tenyészetet kell létesíteni. Az összes többi férget meg kell semmisíteni. A televényférgek életciklusa rövid, 33 nap (18 °C-on), illetve 74 nap (12 °C-on) alatt érik el az ivarérett kort. A vizsgálathoz csak olyan tenyészetet szabad felhasználni, amelyen legalább 5 héten keresztül (egy generáció) semmilyen probléma nem volt megfigyelhető a laboratóriumban.

A célra az *Enchytraeus* nemzetségbe tartozó más fajok is alkalmasak, különösen az *Enchytraeus luxuriosus*. Ez a nemrégiben leírt (65) faj valódi talajlakó. Más televényféreg fajok használata esetén a használt fajt egyértelműen azonosítani, a választást pedig indokolni kell a jegyzőkönyvben.

Az *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) ugyanabba a fajcsoportba tartozik, mint az *Enchytraeus luxuriosus*. A természetes környezetben való létezése még nem bizonyított, eddig csak földigiliszta-tenyészetekben és komposztban való előfordulásáról számoltak be (Römbke 2003). Eredeti ökológiai igényei tehát nem ismertek. A közelmúltban különféle természetes talajokon végzett laboratóriumi kutatások azonban megerősítették, hogy ez a faj széles körű toleranciát mutat az olyan talajtulajdonságokkal szemben, mint a pH és a textúra (Jänsch et al. 2005). Az elmúlt években gyakran használták ezt a fajt ökotoxikológiai vizsgálatokban, mivel könnyen tenyészthető és vizsgálható (például Kuperman et al. 2003). Kis mérete (3 – 12 mm; átlagosan 7 mm (Westheide & Müller 1996)) miatt azonban nehezebben kezelhető, mint az *Enchytraeus albidus*. Ha az *Enchytraeus albidus* helyett ezt a fajt használjuk, akkor lehet – de nem szükséges – kisebb vizsgálati edényt alkalmazni. Ezenkívül azt is figyelembe kell venni, hogy ez a faj nagyon gyorsan szaporodik, generációs ideje 20 ± 2 °C hőmérsékleten nem éri el a 20 napot (Achazi et al. 1999), magasabb hőmérsékleten pedig még ennél is rövidebb.

Az *Enchytraeus albidus* (és más televényféreg fajok) egyedei mesterséges talaj és kereskedelmi forgalomban beszerezhető, szennyezésmentes, adalékanyagokat nem tartalmazó, kertészeti célú talaj keverékét tartalmazó, nagyméretű műanyag tartályokban tenyészthetők (például 30 × 60 × 10 cm vagy 20 × 12 × 8 cm, amely a kisméretű férgek tenyésztésére alkalmas). A komposzt kerülendő, mivel toxikus vegyi anyagokat, például nehézfémeket tartalmazhat. A tenyésztéshez használt talajból használat előtt háromszor megismételt mélyhűtéssel el kell távolítani a benne élő állatokat. Mesterséges talaj önmagában is használható, de lassúbb szaporodási ütemet eredményezhet, mint a kevert tenyésztalaj. A szubsztrátumnak 6,0 ± 0,5 pH-értékkel kell rendelkeznie. A tenyészetet 15 ± 2 °C hőmérsékleten, fénytől elzártan, inkubátorban kell tartani. A 23 °C fölötti hőmérsékletet feltétlenül kerülni kell. A mesterséges/természetes talajnak nedvesnek kell lennie, de ne legyen túl vizes. Ha a talajt a kezünkkel finoman összenyomjuk, kis vízcseppeknek kell megjelenniük. Az oxigénhiányos körülményeket feltétlenül kerülni kell (például fedél használata esetén elég nagy nyílásoknak kell lenniük rajta ahhoz, hogy a megfelelő levegőcsere biztosított legyen). A tenyésztalajt levegőztetés céljából hetente egyszer óvatosan át kell keverni.

▼M4

A férgeket igény szerint, de hetente legalább egyszer kell etetni zabpehellyel, amelyet a talaj felszínén kialakított mélyedésbe kell helyezni, majd földdel befedni. Ha a legutóbbi etetési időpontban adott táplálék megmarad, a táplálék adagolását megfelelően módosítani kell. Ha a megmaradó táplálékon penészgomba jelenik meg, akkor egy új adag zabpehelyre kell cserélni. A szaporodás serkentése érdekében a zabpehely kéthetente kiegészíthető kereskedelmi forgalomban beszerezhető, vitaminnal dúsított fehérjeporral. Három hónap elteltével az állatokat át kell helyezni egy frissen készített tenyészetbe vagy szubsztrátumba. A zabpelyhet légmentesen zárt edényekben kell tárolni és használat előtt autoklávban kezelni, vagy felmelegíteni a lisztatka (például *Glyzyphagus sp.*, Astigmata, Acarina) vagy ragadozó atka (például *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, Gamasida, Acarina) fertőzés elkerülése végett. A fertőtlenítést követően a táplálékot meg kell őrölni, hogy könnyen a talajfelületre szórható legyen. További lehetséges táplálékforrások a sütőélesztő vagy a TetraMin® haleledel.

Általánosságban a tenyésztési körülmények akkor megfelelők, ha a férgek nem próbálják meg elhagyni a szubsztrátumot, gyorsan mozognak a talajban, kültakarójuk fényes, nem tapadnak rá talajszemcsék, többé-kevésbé fehéres árnyalatú, és ha különböző életkorú férgek láthatók. Alapvetően a férgek akkor tekinthetők egészségesnek, ha folyamatosan szaporodnak.

Kiegészítő válogatott irodalomjegyzék

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 and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.”