

I

(Akty prijaté podľa Zmluvy o ES/Zmluvy o Euratome, ktorých uverejnenie je povinné)

NARIADENIA

NARIADENIE KOMISIE (ES) Č. 440/2008

z 30. mája 2008,

ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH)

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

(3) Testovacie metódy uvedené v prílohe V k smernici 67/548/EHS by sa mali do tohto nariadenia zahrnúť.

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

(4) Týmto nariadením sa nevylučuje použitie iných testovacích metód za predpokladu, že sú v súlade s článkom 13 ods. 3 nariadenia (ES) č. 1907/2006.

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES ⁽¹⁾, a najmä na jeho článok 13 ods. 3,

(5) Pri vypracovávaní testovacích metód by sa mali v plnej miere zohľadňovať zásady nahradenia, obmedzenia a zdokonalenia využívania zvierat v postupoch, predovšetkým vtedy, keď sú k dispozícii schválené metódy, ktorými sa testovanie na zvieratách môže nahradiť, obmedziť alebo zdokonaľiť.

keďže:

(1) Podľa nariadenia (ES) č. 1907/2006 sa testovacie metódy majú prijať na úrovni Spoločenstva na účely testovania látok v prípadoch, keď sa testovanie vyžaduje na získanie informácií o vlastnostiach látok.

(6) Ustanovenia tohto nariadenia sú v súlade so stanoviskom výboru zriadeného podľa článku 133 nariadenia (ES) č. 1907/2006,

(2) V prílohe V k smernici Rady 67/548/EHS z 27. júna 1967 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok ⁽²⁾ sa ustanovili metódy určovania fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látok a prípravkov. Príloha V k smernici 67/548/EHS sa vypustila smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2006/121/ES s účinnosťou od 1. júna 2008.

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

Testovacie metódy, ktoré sa majú uplatňovať na účely nariadenia (ES) č. 1907/2006, sa uvádzajú v prílohe k tomuto nariadeniu.

Článok 2

⁽¹⁾ Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1, opravená verzia v Ú. v. EÚ L 136, 29.5.2007, s. 3.

⁽²⁾ Ú. v. ES 196, 16.8.1967, s. 1. Smernica naposledy zmenená a doplnená smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2006/121/ES (Ú. v. ES L 396, 30.12.2006, s. 850, opravená verzia v Ú. v. EÚ L 136, 29.5.2007, s. 281) – príslušné odkazy sa budú aktualizovať, keď sa zverejní 30. ATP.

Komisia v prípade potreby preskúma testovacie metódy uvedené v tomto nariadení s cieľom nahradiť, obmedziť a zdokonaľiť testovanie na stavovcoch.

Článok 3

Všetky odkazy na prílohu V k smernici 67/548/EHS sa vykladajú ako odkaz na toto nariadenie.

Uplatňuje sa od 1. júna 2008.

V Bruseli 30. mája 2008

Článok 4

Toto nariadenie nadobúda účinnosť dňom nasledujúcim po jeho uverejnení v Úradnom vestníku Európskej únie.

Za Komisiu

Stavros DIMAS

člen Komisie

PRÍLOHA

ČASŤ A: METÓDY NA STANOVENIE FYZIKÁLNO-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ

OBSAH

A.1.	TEPLOTA TOPENIA A TUHNUTIA	4
A.2.	TEPLOTA VARU	14
A.3.	RELATÍVNA HUSTOTA	21
A.4.	TLAK PARY	26
A.5.	POVRCHOVÉ NAPÄTIE	50
A.6.	ROZPUSTNOSŤ VO VODE	57
A.8.	ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT	67
A.9.	TEPLOTA VZPLANUTIA	80
A.10.	HORĽAVOSŤ (TUHÉ LÁTKY)	82
A.11.	HORĽAVOSŤ (PLYNY)	85
A.12.	HORĽAVOSŤ (KONTAKT S VODOU)	87
A.13.	SAMOZÁPALNÉ VLASTNOSTI TUHÝCH LÁTOK A KVAPALÍN	91
A.14.	VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI	93
A.15.	TEPLOTA SAMOVZNIETENIA (KVAPALINY A PLYNY)	104
A.16.	RELATÍVNA TEPLOTA SAMOVZNIETENIA PRE TUHÉ LÁTKY	106
A.17.	OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (TUHÉ LÁTKY)	109
A.18.	ČÍSELNÁ PRIEMERNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOSŤ A DISTRIBÚCIA MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ POLYMÉROV	114
A.19.	OBSAH ZLOŽIEK S NÍZKOU MOLEKULOVOU HMOTNOSŤOU V POLYMÉROCH	123
A.20.	ROZPÚŠŤACIE/EXTRAKTÍVNE VLASTNOSTI POLYMÉROV VO VODE	131
A.21.	OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (KVAPALINY)	135

A.1. TEPLOTA TOPENIA A TUHNUTIA

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Na stanovenie teploty topenia látok je potrebné použiť opísané metódy, prístroje a zariadenia, a to bez akýchkoľvek obmedzení týkajúcich sa stupňa ich čistoty.

Výber metódy závisí od charakteru látky určenej na testovanie. Z toho dôvodu limitujúce faktory budú závisieť od toho, či príslušná látka môže byť rozomletá na prášok ľahko, ťažko alebo vôbec nie.

Pre niektoré látky je vhodnejšie stanovenie teploty tuhnutia, a preto boli do tejto metódy zahrnuté aj normy pre toto stanovenie.

V prípadoch, kde kvôli zvláštnym vlastnostiam látky nie je možné bez problémov merať žiadny z uvedených parametrov, môže byť vhodné stanovenie teploty kvapalného skupenstva, resp. teploty tuhnutia olejov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota topenia je definovaná ako teplota, pri ktorej sa zmena z tuhého do kvapalného skupenstva prejavuje pri atmosférickom tlaku, a táto teplota ideálne zodpovedá teplote tuhnutia.

Keďže fázová zmena mnohých látok sa uskutočňuje v určitom tepelnom rozmedzí, často sa opisuje ako rozmedzie topenia.

Prepočítavanie jednotiek (K na °C)

$$t = T - 273,15$$

t: teplota v stupňoch Celzia, stupne Celzia (°C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, ak sa skúma nová látka alebo nová látka obsiahnutá v prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Niektoré kalibračné látky sú uvedené v odkazoch (4).

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Stanoví sa teplota (teplotné rozmedzie) fázovej zmeny z tuhého do kvapalného skupenstva alebo z kvapalného do tuhého skupenstva. Prakticky sa počas zohrievania, resp. ochladzovania vzorky testovanej látky pri atmosférickom tlaku stanovujú teploty počiatočného štádia topenia, resp. tuhnutia, a konečného štádia topenia, resp. tuhnutia. Opísaných je päť metód, menovite kapilárna metóda, metódy tepelných blokov, stanovenia teploty tuhnutia, metódy termickej analýzy a stanovenie teploty kvapalného skupenstva, resp. teploty tuhnutia (metóda vyvinutá pre ropné oleje).

V určitých prípadoch môže byť vhodné merať namiesto teploty topenia teplotu tuhnutia.

1.4.1. Kapilárna metóda**1.4.1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalinovým kúpeľom**

Malé množstvo jemne rozomletej látky sa vloží do kapilárnej rúrky a tesne sa natlačí. Rúrka sa zohrieva spolu s teplomerom a v priebehu vlastného topenia sa nárast teploty adjustuje na menej ako 1 K/min. Stanovuje sa počiatočná a konečná teplota topenia.

1.4.1.2. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom

Postupuje sa tak, ako je to opísané v odseku 1.4.1.1, avšak s výnimkou, že kapilárna rúrka a teplomer sú umiestnené do zahrievaného kovového bloku, pričom celý proces a hodnoty na teplomere možno sledovať otvormi v bloku.

1.4.1.3. Fotočlánková detekcia

Vzorka v kapilárnej rúrke sa zahrieva automaticky v kovovom valci. Dierou vo valci sa cez sledovanú látku namieri svetelný lúč na presne kalibrovaný fotoelektrický článok. Optické vlastnosti väčšiny látok sa počas topenia menia tak, že látka sa z nepriehľadnej mení na priehľadnú. Intenzita svetla dopadajúceho na fotoelektrický článok sa tak zvýši a vyšle stop signál k digitálnemu indikátoru, ktorý odčíta teplotu z platínového odporového teplomeru, ktorý je umiestnený vo vyhrievacej komore. Táto metóda nie je vhodná pre niektoré intenzívne sfarbené látky.

1.4.2. Tepelné bloky**1.4.2.1. Koflerov tepelný blok**

Koflerov tepelný blok pozostáva z dvoch kusov kovu s rozdielnou tepelnou vodivosťou a s elektrickým ohrievaním, pričom samotný blok je zhotovený tak, aby teplotný gradient bol takmer lineárny po celej jeho dĺžke. Teplota Koflerovho tepelného bloku sa môže meniť v rozmedzí od 283 do 573 K. Tepelný blok je vybavený zvláštnym zariadením na čítanie teploty, ktoré je opatrené posuvným bežcom s ručičkou a tabuľkou zostavenou pre konkrétny typ žeraviacej tyče. Na stanovenie teploty topenia sa testovaná látka v tenkej vrstve naniesie na tepelný blok. V priebehu niekoľkých sekúnd sa vytvorí zreteľná deliaca čiara medzi kvapalnou a tuhou fázou. Teplota na deliacej čiare sa odčíta nastavením ručičky do takej polohy, aby spočívala priamo na čiare.

1.4.2.2. Mikroskop na sledovanie taveniny

Na stanovenie teploty topenia pri veľmi malých množstvách materiálu sa používajú viaceré mikroskopicky sledované horúce štádiá. V prípade väčšiny horúcich štádií sa teplota meria citlivým termočlánkom, ale niekedy sa používajú aj klasické ortuťové teplomery. Typický prístroj na mikroskopické sledovanie teploty topenia v horúcich štádiách pozostáva z vyhrievacej komory, v ktorej sa nachádza kovová platňa, na ktorú sa umiestni vzorka na podložné sklíčko. Uprostred kovovej platne je otvor, ktorý umožňuje prenikanie svetelných lúčov z osvetľovacieho zrkadlika mikroskopu. Počas používania je komora uzavretá sklenenou platňou, aby sa zabránilo prístupu vzduchu do priestoru so skúmanou vzorkou.

Zahrievanie vzorky je regulované reostatom. Na veľmi presné merania na opticky anizotropných látkach možno použiť polarizované svetlo.

1.4.2.3. Menisková metóda

Táto metóda sa používa špeciálne pre polyamidy.

Vizuálne sa stanovuje teplota, pri ktorej dochádza k posunu menisku silikónového oleja, vloženého medzi zdroj horúceho štádia a krycie sklíčko, spočívajúce na polyamidovej testovanej vzorke.

1.4.3. Metóda na stanovenie teploty tuhnutia

Vzorka sa umiestni do zvláštnej skúšobnej trubice, ktorá sa potom vloží do prístroja na stanovovanie teploty tuhnutia. Počas ochladzovania sa vzorka jemne a neustále mieša a vo vhodných intervaloch sa meria teplota. Ak pri niekoľkých za sebou nasledujúcich čítaniach zostáva teplota konštantná, jej hodnota (s korektúrou odchýlky teplomeru) sa zaznamená ako teplota tuhnutia.

Má sa zabrániť podchladeniu udržiavaním rovnováhy medzi tuhú a kvapalnou fázou.

1.4.4. **Tepelná (termická) analýza**1.4.4.1. *Diferenciálna tepelná (termická) analýza (DTA)*

V rámci tohto postupu sa zaznamenáva rozdiel v teplotách medzi príslušnou testovanou látkou a referenčným materiálom ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému tepelnému programu. Keď testovaná vzorka podstúpi fázovú zmenu majúcu za následok zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví ako endotermická (topenie) alebo exotermická (tuhnutie) odchýlka od základnej čiary zaznamenávajúcej teplotu.

1.4.4.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria (DSK)*

V rámci tohto postupu sa zaznamenáva rozdiel v energetických vstupoch do príslušnej testovanej látky a do referenčného materiálu, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému tepelnému programu. Toto je energia, ktorá je potrebná na vytvorenie nulového teplotného rozdielu medzi testovanou látkou a referenčným materiálom. Keď testovaná vzorka podstúpi fázovú zmenu majúcu za následok zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví ako endotermická (topenie) alebo exotermická (tuhnutie) odchýlka od základnej čiary zaznamenávajúcej tepelný tok.

1.4.5. **Teplota tuhnutia olejov**

Táto metóda bola vyvinutá na použitie s ropnými olejmi a je vhodná na použitie s olejovitými látkami vyznačujúcimi sa nízkymi teplotami topenia.

Po predchádzajúcom zohriatí sa vzorka ochladzuje špecifickou rýchlosťou a v intervaloch poklesu teploty o 3 K sa skúma jej tekutosť. Najnižšia teplota, pri ktorej sa ešte dá pozorovať pohyb testovanej látky, sa zaznamená ako teplota tuhnutia oleja.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Použitelnosť a presnosť rozličných metód používaných na stanovenie teploty topenia, resp. rozmedzia topenia je uvedená v nasledujúcej tabuľke:

TABUĽKA: POUŽITEĽNOSŤ METÓD

A. **Kapilárne metódy**

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Zariadenie na stanovenie teploty topenia kvapalínovým kúpeľom	áno	len pre niekoľko látok	273 až 573 K	+ 0,3 K	JIS K 0064
Zariadenie na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom	áno	len pre niekoľko látok	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekcia fotočlánkom	áno	pre niektoré látky s použitím prídavných zariadení	253 až 573 K	± 0,5 K	

⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

B. Vyhrievacie bloky a metódy tuhnutia

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Koflerov vyhrievací stolík	áno	nie	283 až > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Taviaci mikroskop	áno	len pre niekoľko látok	273 až > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Menisková metóda	nie	predovšetkým pre polyamidy	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Metóda stanovenia teploty tuhnutia	áno	áno	223 až 573 K	± 0,5 K	napr. BS 4695

⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

C. Tepelná (termická) analýza

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Diferenčná tepelná analýza	áno	áno	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenčná skenovací kalorimetria	áno	áno	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

D. Teplota tuhnutia olejov

Metóda merania	Látky, ktoré možno rozomlieť na prášok	Látky, ktoré nemožno ľahko rozomlieť na prášok	Rozsah teplôt	Odhadnutá presnosť ⁽¹⁾	Platná norma
Teplota tuhnutia olejov	pre minerálne oleje a olejovité látky	pre minerálne oleje a olejovité látky	223 až 323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

⁽¹⁾ Závisí od typu zariadenia a stupňa čistoty látky.

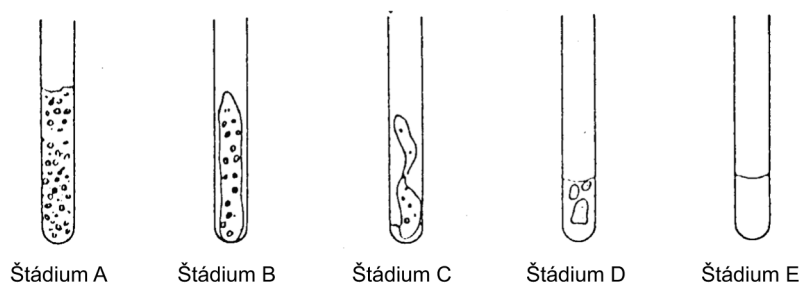
1.6. OPIS METÓD

Postupy skoro všetkých skúšobných metód sú opísané v medzinárodných a štátnych normách (pozri dodatok 1).

1.6.1. Metódy s kapilárnou rúrkou

Keď sú testované látky, ktoré sú rozdrvené na jemný prach, vystavené pomalému nárastu teploty, zvyčajne prejavujú štádiá topenia, ktoré sú znázornené na obrázku 1.

Obrázok 1



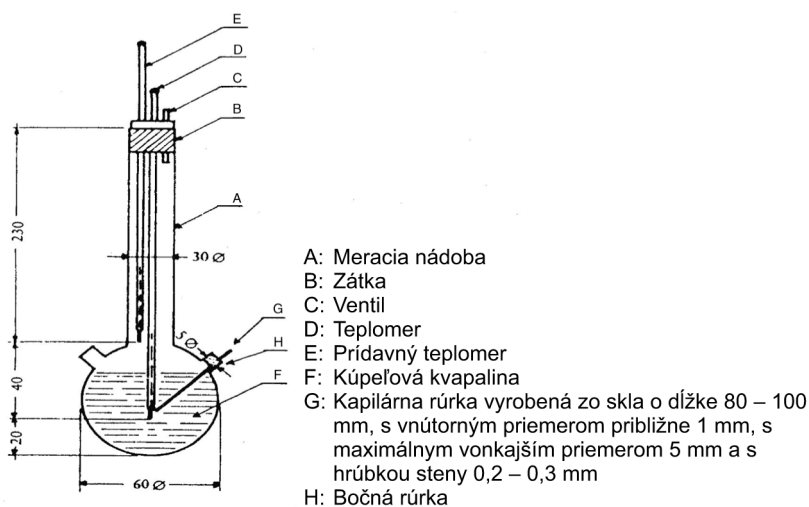
- Štádium A (začiatok procesu topenia): Jemné kvapôčky rovnomerne priliehajú k vnútornej stene kapilárnej rúrky.
- Štádium B Medzi testovanou vzorkou a vnútornou stenou kapilárnej rúrky sa objavuje voľný priestor následkom zmrašťovania taveniny.
- Štádium C Zmraštená testovaná vzorka sa začína zosúvať nadol a skvapalňuje.
- Štádium D Na povrchu sa vytvára úplný meniskus, avšak značné množstvo testovanej vzorky zostáva naďalej v tuhom skupenstve.
- Štádium E (konečné štádium procesu topenia): V kapilárnej rúrke už nemožno sledovať žiadne tuhé čiastočky.

Počas stanovovania teploty topenia sa teploty zaznamenávajú na začiatku procesu topenia a v konečnom štádiu.

1.6.1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalinovým kúpeľom

Na obrázku 2 je znázornený typ štandardizovaného prístroja na meranie teploty topenia vyrobeného zo skla (JIS K 0064); všetky špecifikácie (rozmery) sú uvedené v milimetroch (mm).

Obrázok 2



Temperačná kvapalina:

Je potrebné zvoliť vhodnú kvapalinu. Voľba správnej kvapaliny závisí od teploty topenia, ktorá má byť stanovená, napr. parafrínový olej pre teploty topenia, ktoré nepresahujú 473 K, silikónový olej pre teploty topenia, ktoré nepresahujú 573 K.

Pre teploty topenia nad 523 K sa môže použiť zmes pozostávajúca z troch dielov kyseliny sírovej a dvoch dielov síranu draselného (v pomere hmôt). Pri použití takejto zmesi je potrebné dodržiavať vhodné bezpečnostné opatrenia.

Teplomer:

Treba používať len také teplomery, ktoré spĺňajú požiadavky týchto alebo ekvivalentných noriem:

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

Postup:

Suchá testovaná látka sa v trecej miske rozomelie na jemný prášok a vloží sa do kapilárnej rúrky, ktorá je na jednom konci zatavená. Testovaný prášok sa tesne natlačí tak, aby náplň tvorila približne 3 mm stĺpec. Na účely dosiahnutia rovnomerne natesnanej vzorky je potrebné kapilárnu rúrku pustiť z výšky približne 700 mm cez sklenú rúrku vertikálne na hodinkové sklíčko.

Naplnená kapilárna rúrka sa umiestni do kúpeľa tak, aby sa stredná časť ortuťovej guľôčky teplomeru dotýkala tej časti rúrky, v ktorej je umiestnená testovaná vzorka. Kapilárna rúrka sa do prístroja vkladá zvyčajne pri teplote, ktorá je o 10 K nižšia ako samotná teplota topenia.

Temperačná kvapalina sa zahrieva tak, aby nárast teploty predstavoval približne 3 K za minútu. Kvapalinu je potrebné neustále miešať. Pri teplote približne o 10 K nižšej ako predpokladaná teplota topenia testovanej látky sa nárast teploty nastaví na maximálne 1 K za minútu.

Výpočet:

Výpočet teploty topenia je takýto:

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

kde:

T = korigovaná teplota topenia v K

T_D = teplota odčítaná na teplomere D v K

T_E = teplota odčítaná na teplomere E v K

n = počet dielikov ortuťového stĺpca teplomeru D na výstupnej trubičke.

1.6.1.2. *Zariadenia na meranie teploty topenia s kovovým blokom*

Prístroje:

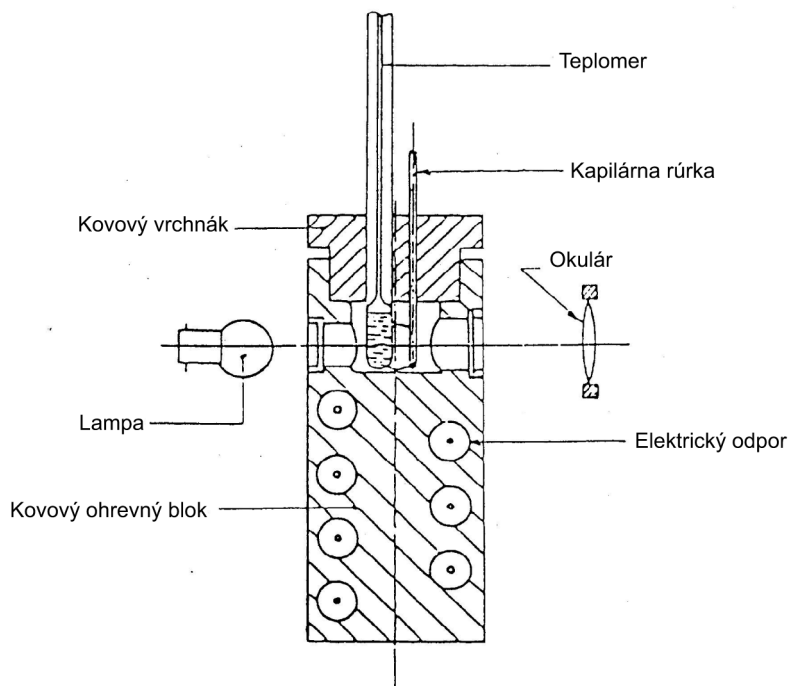
Pozostávajú z týchto častí:

- valcovitý blok, ktorého horná časť je dutá a vytvára komoru (pozri obrázok 3),
- kovový vrchnák s dvoma alebo viacerými otvormi umožňujúcimi zasunutie rúrok do kovového bloku,
- ohrevný systém kovového bloku, pozostávajúci napríklad z elektrického odporu zabudovaného do kovového bloku,
- reostat na reguláciu príkonu energie v prípade použitia elektrického ohrievania,
- štyri okienka zo žiaruvzdorného skla na bočných stenách komory, ktoré sú umiestnené protiľahlo a vzájomne v pravých uhloch. Pred jedným z týchto okienok je namontovaný okulár na sledovanie kapilárnej rúrky. Zvyšné tri okienka sa používajú na osvetlenie vnútornej komory kovového bloku pomocou lámp,
- kapilárna rúrka zo žiaruvzdorného skla, na jednom konci uzavretá (pozri odsek 1.6.1.1).

Teplomer:

Pozri normy spomínané v odseku 1.6.1.1. Možno tiež použiť termoelektrické meracie zariadenia s porovnateľným stupňom presnosti.

Obrázok 3



1.6.1.3. Fotočlánková (fotónková) detekcia

Prístroje a postup:

Prístroj pozostáva z kovovej komory s automatickým ohrevným systémom. Tri kapilárne rúrky sa naplnia testovanou látkou podľa pokynov uvedených v odseku 1.6.1.1 a umiestnia sa do piecky.

Na účely kalibrovania prístroja existuje viacero lineárnych prírastkov teploty a vhodný nárast teploty je elektricky nastavovaný predvolenou konštantnou a lineárnou rýchlosťou ohrevu. Registračné prístroje ukazujú skutočnú teplotu v piecke, ako aj teplotu testovanej látky umiestnenej v kapilárnych rúrkach.

1.6.2. Tepelné bloky

1.6.2.1. Koflerov tepelný blok

Pozri dodatok.

1.6.2.2. Mikroskop na sledovanie taveniny

Pozri dodatok.

1.6.2.3. Menisková metóda (polyamidy)

Pozri dodatok.

Rýchlosť ohrevu pri teplote topenia by mala byť nižšia ako 1 K za minútu.

1.6.3. Metódy na stanovenie teploty tuhnutia

Pozri dodatok.

1.6.4. Tepelná analýza**1.6.4.1. Diferenciálna tepelná analýza**

Pozri dodatok.

1.6.4.2. Diferenciálna snímacia kalorimetria

Pozri dodatok.

1.6.5. Stanovenie teploty tuhnutia olejov

Pozri dodatok.

2. ÚDAJE

V niektorých prípadoch je potrebná korekcia teplomeru.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak boli takéto uskutočnené,
- stanovenie presnosti.

Ako teplota topenia sa v správe uvádza priemer najmenej dvoch meraní, ktoré sa nachádzajú v rozmedzí stanovenej presnosti (pozri tabuľky).

Ak sa rozdiel medzi teplotou na začiatku a v konečnom štádiu procesu topenia nachádza v rámci hraničných limitov presnosti metódy, za teplotu topenia sa bude považovať teplota nameraná v konečnom štádiu procesu topenia. Inak sa v správe uvádzajú obidve teploty.

Ak sa testovaná látka rozloží alebo sublimuje ešte pred dosiahnutím teploty topenia, v správe je potrebné uviesť teplotu, pri ktorej bol tento jav pozorovaný.

V správe musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímеси a fyzikálneho stavu testovanej látky.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline No 102, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. (vyd.). Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, vol. II, 803 – 834.
- (3) R. Weissberger ed. (vyd.): 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.

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. Kapilárne metódy**1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalným kúpeľom**

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

1.2. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom

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

2. Tepelné bloky**2.1. Koflerov tepelný blok**

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

2.2. Mikroskop na sledovanie tavenín

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Menisková metóda (polyamidy)

ISO 1218 (E)	Plastics- polyamides -determination of „melting point”
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. Metódy na stanovenie teploty tuhnutia

BS 463 3	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. Tepelná analýza**4.1. Diferenciálna tepelná analýza**

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

4.2. Diferenciálna snímacia 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

5. Stanovenie teploty tuhnutia olejov

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

A.2. TEPLOTA VARU

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Metódy, prístroje a zariadenia opísané v tejto časti môžu byť použité pre kvapalné látky a látky s nízkou teplotou topenia za predpokladu, že tieto látky nepodliehajú reakciám pod teplotou varu (napr. samovoľnej oxidácii alebo prešmykovaní či degradácii a pod.). Metódy môžu byť aplikované na čisté, ako aj na nečisté kvapalné látky.

Dôraz sa kladie na metódy využívajúce fotočlánkovú detekciu a tepelnú (termickú) analýzu, pretože tieto metódy umožňujú stanovenie teploty topenia a zároveň aj teploty varu. Navyše, merania sa môžu uskutočniť automaticky.

Tzv. „dynamická metóda“ má tú výhodu, že sa môže použiť aj na stanovenie tlaku pary a nie je teda potrebné upravovať teplotu varu k normálnemu tlaku (101,325 kPa), pretože normálny tlak sa môže počas meraní upravovať manostatom.

Poznámky:

Vplyv prímiesí na stanovenie teploty varu závisí vo veľkej miere od charakteru prímiesi. Keď sa vo vzorke nachádzajú prchavé prímiesi, ktoré by mohli nepriaznivo ovplyvniť výsledky, testovaná látka sa očistí.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Normálna teplota varu je definovaná ako teplota, pri ktorej má tlak pary danej kvapaliny hodnotu 101,325 kPa.

Ak sa teplota varu nemeria pri normálnom atmosférickom tlaku, závislosť teploty od tlaku pary môže byť opísaná Clausiusovou-Clapeyronovou rovnicou:

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

kde:

P = tlak pary testovanej látky v pascaloch

ΔH_v = jej výparné teplo (skupenské teplo vyparovania) v J mol⁻¹

R = univerzálna mólová plynová konštanta = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹

T = termodynamická teplota v K

Teplota varu je stanovená pri zohľadnení okolitého tlaku pôsobiaceho počas merania.

Prepočty

Tlak (jednotky: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(„bar“ je naďalej prípustná jednotka, avšak neodporúča sa jej používanie)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

(jednotky „mm Hg“ a „Torr“ nie sú prípustné)

1 atm = štandardná atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ nie je prípustná).

Teplota (jednotky K – kelvin)

$$t = T - 273,15$$

t: teplota v stupňoch Celzia, stupne Celzia (°C),

T: termodynamická teplota, kelvin (K).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka alebo nová látka obsiahnutá v prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Niektoré kalibračné látky možno vyhľadať v metódach uvedených v dodatku.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Päť metód na stanovenie teploty varu (rozmedzia varu) sa zakladá na meraní teploty varu, dve ďalšie sa zakladajú na tepelnej analýze.

1.4.1. Stanovenie použitím ebulliometra

Ebulliometre boli pôvodne vyvinuté na stanovenie hmotnosti molekúl zvýšením teploty varu, ale sú vhodné aj na presné merania teploty varu. Veľmi jednoduchý prístroj je opísaný v technickej norme ASTM D 1120-72 (pozri dodatok). Kvapalina sa v tomto prístroji zohrieva v rovnovážnych podmienkach pri atmosférickom tlaku až po dosiahnutie varu.

1.4.2. Dynamická metóda

Táto metóda spočíva v meraní rekondenzačnej teploty pary v spätnom toku počas varu pomocou vhodného teplomeru. Pri tejto metóde môže byť regulovaný tlak.

1.4.3. Destilačná metóda pre teplotu varu

Táto metóda spočíva v destilácii kvapaliny a v meraní rekondenzačnej teploty pary a v stanovení množstva destilátu.

1.4.4. Metóda podľa Siwoloboffa

Testovaná vzorka sa zahrieva vo vzorkovej rúrke, ktorá je ponorená do kvapaliny v tepelnom kúpeli. Do vzorkovej rúrky sa zasunie zatavená kapilára, ktorá obsahuje vo svojej spodnej časti vzduchovú bublinu.

1.4.5. Fotočlánková detekcia

Postupuje sa podľa princípov Siwoloboffovej metódy, avšak s uskutočnením automatického fotoelektrického merania pri použití stúpajúcich bublín.

1.4.6. Diferenciálna tepelná analýza

Touto technikou merania sa zaznamenáva teplotný rozdiel medzi testovanou látkou a referenčným materiálom ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému teplotnému programu. Keď testovaná vzorka prejde fázovou zmenou zahrnujúcou zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví endotermickou odchýlkou (varom) od základnej línie teplotného záznamu.

1.4.7. Diferenciálna snímacia kalorimetria

Touto meracou technikou sa zaznamenáva rozdiel vo vstupoch energie do testovanej látky a do referenčného materiálu ako funkcia teploty, pričom testovaná látka aj referenčný materiál sú vystavené tomu istému regulovanému a kontrolovanému teplotnému programu. Toto je energia, ktorá je potrebná na vytvorenie nulového teplotného rozdielu medzi testovanou látkou a referenčným materiálom. Keď testovaná vzorka prejde fázovou zmenou zahrnujúcou zmenu entalpie, táto zmena sa prejaví endotermickou odchýlkou (varom) od základnej línie záznamu tepelného toku.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Aplikovateľnosť a presnosť rozdielných metód použitých na stanovenie teploty varu, resp. teplotného rozmedzia, je uvedená v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Porovnanie metód

Metóda merania	Odhadnutá presnosť	Platná norma
Stanovenie ebulliometrom	$\pm 1,4$ K (do 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ $\pm 2,5$ K (do 600 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dynamická metóda	$\pm 0,5$ K (do 600 K) ⁽²⁾	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Destilačná metóda (stanovenie rozmedzia teploty varu)	$\pm 0,5$ K (do 600 K)	
Postup podľa Siwoloboffa	± 2 K (do 600 K) ⁽²⁾	
Detekcia fotočlánkom	$\pm 0,3$ K (do 373 K) ⁽²⁾	ASTM E 537-76
Diferenčná tepelná analýza	$\pm 0,5$ K (do 600 K)	
Diferenčná snímacia kalorimetria	$\pm 2,0$ K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
	$\pm 0,5$ K (do 600 K)	
	$\pm 2,0$ K (do 1 273 K)	

⁽¹⁾ Táto presnosť platí len pre jednoduchý prístroj opísaný napr. v norme ASTM D 1120-72; môže byť zlepšená použitím dokonalejšieho ebulliometra.

⁽²⁾ Platí len pre čisté látky. Použitie za iných okolností by malo byť zdôvodnené.

1.6. OPIS SKÚŠOBNÝCH METÓD

Postupy niektorých skúšobných metód sú opísané v medzinárodných a štátnych technických normách (pozri dodatok).

1.6.1. **Ebulliometer**

Pozri dodatok.

1.6.2. **Dynamická metóda**

Pozri testovaciu metódu A.4 na stanovenie tlaku pary.

Zaznamenáva sa teplota varu pozorovaná pri aplikovanom tlaku 101,325 kPa.

1.6.3. **Destilačný proces (rozmedzie varu)**

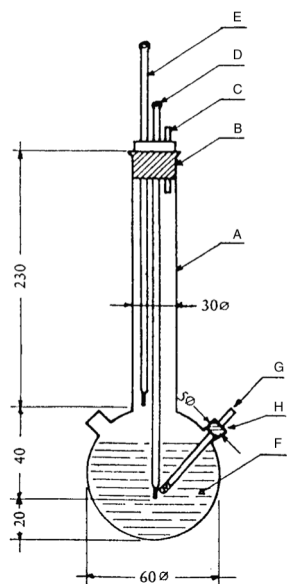
Pozri dodatok.

1.6.4. **Metóda podľa Siwoloboffa**

Testovaná vzorka sa zahrieva v prístroji na meranie teploty topenia vo vzorkovej rúrke s priemerom približne 5 mm (obrázok 1).

Obrázok 1 znázorňuje typ štandardizovaného prístroja na meranie teploty topenia a teploty varu (podľa technickej normy JIS K 0064) (vyrobený zo skla, všetky rozmery sú uvedené v milimetroch).

Obrázok 1

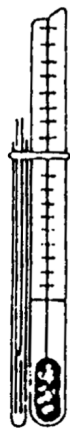


- A: Meracia náboda
 B: Zátka
 C: Ventil
 D: Teplomer
 E: Prídavný teplomer
 F: Kúpeľová kvapalina
 G: Kapilárna rúrka vyrobená zo skla o dĺžke 80 – 100 mm, s vnútorným priemerom približne 1 mm, s maximálnym vonkajším priemerom 5 mm a s hrúbkou steny 0,2 – 0,3 mm
 H: Bočná rúrka

Kapilárna rúrka (varná kapilára), ktorá je zatavená približne vo výške 1 cm nad spodným koncom, sa umiestni do vzorkovej rúrky. Výška úrovne, do ktorej sa pridá testovaná látka, musí byť taká, aby zatavená časť kapiláry bola pod hladinou kvapaliny. Vzorková rúrka obsahujúca varnú kapiláru sa buď pripevní k teplomeru pomocou gumičky, alebo sa zboku fixuje podpierkou (pozri obrázok 2).

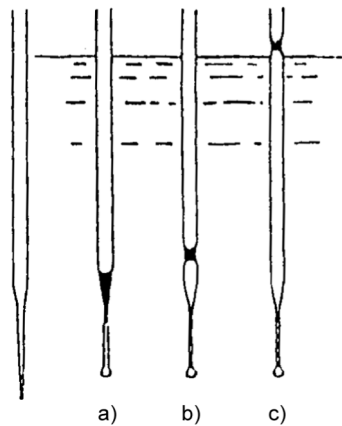
Obrázok 2

Princíp podľa Siwoloboffa



Obrázok 3

Modifikovaný princíp



Temperačná kvapalina sa zvolí v závislosti od teploty varu. Pri teplotách do 573 K možno použiť silikónový olej. Parafrínový olej možno použiť len do teploty 473 K. Zahrievanie temperačnej kvapaliny musí byť spočiatku adjustované na nárast teploty 3 K za minútu. Temperačná kvapalina sa musí neustále miešať. Pri teplote približne 10 K pod predpokladanou teplotou varu sa intenzita zahrievania zníži na menej ako 1 K za minútu. V bezprostrednej blízkosti teploty varu sa vo varnej kapiláre začnú rýchlo tvoriť bublinky.

Teplota varu je tá teplota, keď pri momentálnom ochladení v kapiláre ustane tvorba reťazca bubliniek a zrazu začne stúpať stĺpec kvapaliny. Zodpovedajúci údaj na stupnici teplomeru bude predstavovať teplotu varu príslušnej testovanej látky.

V prípade modifikovaného princípu (obrázok 3) sa teplota varu stanovuje v kapiláre na meranie teploty topenia. Koniec kapiláry sa nataví a natiahne do hrotu v dĺžke asi 2 cm (a) a nasaje sa malé množstvo testovanej látky. Otvorený koniec jemnej kapiláry sa uzavrie zatavením tak, že na konci zostane malá vzduchová bublinka. Počas zohrievania v prístroji na stanovenie teploty topenia (b) sa vzduchová bublinka rozptína. Teplota varu zodpovedá teplote, pri ktorej testovaná látka dosiahne povrch temperačnej kvapaliny (c).

1.6.5. **Fotočlánková detekcia**

Testovaná vzorka sa zahrieva v kapiláre umiestnenej vo vyhrievanom kovovom bloku.

Cez vhodne umiestnené otvory v kovovom bloku sa nasmeruje svetelný lúč cez testovanú látku na dôkladne kalibrovaný fotočlánok.

Počas nárastu teploty testovanej vzorky sa vo varnej kapiláre začnú objavovať samostatné vzduchové bublinky. Keď sa dosiahne teplota varu, počet vzduchových bubliniek sa nápadne zvýši. Tento jav spôsobí zmenu v intenzite svetla zaznamenanú fotočlánkom, ktorý vyšle stop signál indikátoru odčítavajúcemu teplotu z platínového odporového teplomeru umiestneného v kovovom bloku.

Táto metóda je obzvlášť výhodná, pretože umožňuje stanovenie skúmaných hodnôt aj pri teplotách nižších ako bežná izbová teplota až do 253,15 K (–20 °C) bez akýchkoľvek zmien na prístroji. Inštrument stačí iba umiestniť do chladiaceho kúpeľa.

1.6.6. **Tepelná analýza**1.6.6.1. *Diferenciálna tepelná analýza*

Pozri dodatok.

1.6.6.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria*

Pozri dodatok.

2. **ÚDAJE**

Pri malých odchýlkach od normálneho tlaku (max. ± 5 kPa) sa teploty varu normalizujú na T_n pomocou tejto rovnice podľa Sidneyho Younga:

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

kde:

Δp = (101,325 – p) [pozor na znamienko!]

P = meranie tlaku v kPa

f_T = pomer zmeny teploty varu k tlaku v K/kPa

T = nameraná teplota varu v K

T_n = teplota varu korigovaná k normálnemu tlaku v K

Opravné koeficienty na teplotu, f_T , a rovnice na ich aproximáciu sú pre mnohé látky zahrnuté v uvedených medzinárodných a národných technických normách.

Napríklad v metóde podľa technickej normy DIN 53171 sa spomínajú tieto hrubé opravy pre rozpúšťadlá obsiahnuté v náterových farbách:

Tabuľka 2

Opravné koeficienty f_T na teplotu

Teplota T (K)	Opravný koeficient 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

Teplota T (K)	Opravný koeficient f_T (K/kPa)
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a nečistoty) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak boli takéto uskutočnené,
- odhad presnosti.

Ako teplota varu sa uvádza stredná hodnota najmenej dvoch meraní, ktoré sú v rozmedzí stanovenej presnosti (pozri tabuľku 1).

V správe musia byť zaznamenané namerané teploty varu a ich priemerné hodnoty a tlak, resp. tlaky, pri ktorých boli merania uskutočnené a sú uvedené v kPa. Odporúča sa, aby použitý tlak dosahoval hodnoty blížiacie sa normálnemu atmosférickému tlaku.

V správe musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímiesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

4. **ODKAZY**

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of the Council C (81) 30 final.
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, editions. Experimental thermodynamics, Butterworths, London, 1975, volume II.
- (3) R. Weissberger edition: Technique of organic chemistry, Physical methods of organic chemistry, Third Edition, Interscience Publications, New York, 1959, volume I, Part I, Chapter VIII.

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. **Ebuliometer**

1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalným kúpeľom

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

2. **Destilačný proces (rozmedzie varu)**

ISO/R 918	Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)
BS 4349/68	Method for determination of distillation of petroleum products
BS 4591/7 1	Method for the determination of distillation characteristics
DIN 53171	Losungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes
NF T 20-608	Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation

3. **Diferenciálna tepelná analýza a diferenciálna snímacia 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

A.3. RELATÍVNA HUSTOTA

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkaze (2).

1.1. ÚVOD

Opísané metódy na stanovenie relatívnej hustoty sa môžu použiť pre tuhé a kvapalné látky bez akýchkoľvek obmedzení v spojitosti so stupňom ich čistoty. Rozličné použiteľné metódy sú uvedené v tabuľke 1.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Relatívna hustota, D^{20}_4 , tuhých látok alebo kvapalín je pomer medzi hmotnosťou objemu príslušnej látky určenej na testovanie, stanovenou pri teplote 20 °C, a hmotnosťou toho istého objemu vody, stanovenou pri teplote 4 °C. Relatívna hustota nemá žiadny rozmer.

Hustota, P , danej látky je pomer hmotnosti, m , a jej objemu, v .

Hustota, P , sa udáva v jednotkách SI, v kg/m^3 .

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY (1) (3)

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka alebo nová chemická látka obsiahnutá v chemickom prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Používajú sa štyri triedy (skupiny) skúšobných metód.

1.4.1. Výtláčné metódy

1.4.1.1. Hustomer (pre kvapalné látky)

Dostatočne presné a rýchle stanovenia hustoty možno dosiahnuť ponorným hustomerom, ktorý umožňuje stanovenie hustoty testovanej kvapaliny na základe hĺbky ponorenia odčítaním príslušnej hodnoty z delenej stupnice.

1.4.1.2. Hydrostatické váhy (pre tuhé a kvapalné látky)

Na stanovenie hustoty možno použiť rozdiel medzi hmotnosťou príslušnej testovanej vzorky, meranou vo vzduchu a vo vhodnej kvapaline (napr. vo vode).

V prípade tuhých látok sa nameraná hustota vzťahuje iba na konkrétnu použitú vzorku. Na stanovenie hustoty kvapalín sa teleso so známym objemom, v , odváži najprv vo vzduchu a potom v kvapaline.

1.4.1.3. Metóda ponoreného telesa (pre kvapalné látky) (4)

V rámci tejto metódy sa hustota kvapaliny stanoví z rozdielu hodnôt váženia kvapaliny pred ponorením a po ponorení telesa so známym objemom do testovanej kvapaliny.

1.4.2. Pyknometrické metódy

Pre tuhé alebo kvapalné látky možno použiť pyknometre rozličných tvarov a so známymi objemami. Hustota sa vypočíta z rozdielu hmotnosti medzi plným a prázdny pyknometrom a jeho známeho objemu.

1.4.3. **Vzduchový porovnávací pyknometer** (pre tuhé látky)

Hustota tuhej látky v akejkoľvek forme sa môže merať pri teplote miestnosti pomocou plynového porovnávacieho pyknometra. Objem látky sa meria vo vzduchu alebo v inertnom plyne vo valci s meniteľným kalibrovaným objemom. Na výpočet hustoty sa jedno meranie hmotnosti vykoná po ukončení merania objemu.

1.4.4. **Oscilujúci hustomer** (5) (6) (7)

Hustota kvapaliny sa môže merať aj oscilujúcim hustomerom. Mechanický oscilátor zostrojený v tvare trubice do U sa rozkmitá na rezonančný kmitočet oscilátora, ktorý závisí od jeho hmotnosti. Vloženie testovanej látky zmení rezonančný kmitočet oscilátora. Prístroj musí byť kalibrovaný dvoma kvapalnými látkami známej hustoty. Tieto látky by sa mali zvoliť podľa možnosti tak, aby ich hustoty pokryli celý meraný rozsah.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Použiteľnosť rozdielnych metód používaných na stanovenie relatívnej hustoty je uvedená v tabuľke.

1.6. **OPIS METÓD**

Technické normy uvedené ako príklady, ktoré treba použiť pre dodatočné technické podrobnosti, sú uvedené v dodatku.

Testy sa musia vykonať pri teplote 20 °C, a zároveň je potrebné uskutočniť vždy aspoň dve merania.

2. **ÚDAJE**

Pozrite príslušné technické normy uvedené v dodatku.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímiesi) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak sa takéto uskutočnili.

Relatívna hustota, D_4^{20} , musí byť v správe uvedená podľa definície v bode 1.2, spolu s fyzikálnym stavom meranej látky.

Musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov, obzvlášť v súvislosti s prímiesami a s fyzikálnym skupenstvom testovanej látky.

Tabuľka

Použiteľnosť metód

Metóda merania	Hustota		Najvyššia možná hodnota dynamickej viskozity	Platná norma
	tuhé látky	kvapaliny		
1.4.1.1. Hustomer		áno	5 Pa s	ISO 387, ISO 649-2, NF T 20-050

Metóda merania	Hustota		Najvyššia možná hodnota dynamickej viskozity	Platná norma
	tuhé látky	kvapaliny		
1.4.1.2. Hydrostatické váhy				
a) tuhé látky	áno			
b) kvapaliny		áno	5 Pa s	ISO 1183 (A), ISO 901 a 758
1.4.1.3. Metóda ponoreného telesa		áno	22 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Pyknometer				ISO 3507
a) tuhé látky	áno			ISO 1183 (B), NF T 20-053
b) kvapaliny		áno	500 Pa s	ISO 758
1.4.3. Vzduchový porovnávací pyknometer	áno			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Oscilujúci hustomer		áno	5 Pa s	

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol I, Part 1.
- (3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.
- (4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol. 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.

Dodatok

V prípade potreby dodatočných technických podrobností možno použiť napríklad tieto technické normy:

1. Výtlačné metódy**1.1. Hydrometer**

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 – Aerometric method
DIN 12793	Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Hydrostatické váhy*Pre tuhé látky*

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

Pre kvapalné látky

ISO 901	ISO 758
DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and 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. Metóda ponoreného telesa

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

2. Pyknometrické metódy**2.1. Pre kvapalné látky**

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 $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 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 $100 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ 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)
DIN 12806	Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have too high a vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen)
DIN 12807	Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801)
DIN 12808	Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol – water mixture)
DIN 12809	Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous)
DIN 53217	Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer
DIN 51757	Point 7: Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 297	Section 15: Rubber products – chemical analysis
ASTM D 2111	Method C: Halogenated organic compounds
BS 4699	Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method)
BS 5903	Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary – stoppered pycnometer method
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method

2.2. Pre tuhé látky

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

3. Vzduchový porovnávací pyknometer

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

A.4. TLAK PARY

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie testov OECD (1). Základné princípy sú uvedené v odkazoch (2) a (3).

1.1. ÚVOD

Na účely úspešného uskutočnenia tohto testu sa odporúča získať predbežné informácie o štruktúre, resp. stavbe, teplote topenia a teplote varu príslušnej látky určenej na testovanie.

Neexistuje jediný postup merania, ktorý by sa dal aplikovať na celé rozmedzie tlakov pary. Z toho dôvodu sa na meranie tlaku od $< 10^{-4}$ Pa do 10^5 Pa odporúča uplatnenie viacerých metód.

Prímesi zvyčajne ovplyvnia tlak pary, a to do takej miery, ktorá závisí od druhu príslušnej prímesi.

V prípadoch, kde sa vo vzorke nachádzajú prchavé prímesi, ktoré by mohli nepriaznivo ovplyvniť výsledok, odporúča sa látku vopred očistiť, resp. zbaviť príslušných prímesí. Môže byť tiež vhodné stanoviť tlak pary pre technický materiál.

V rámci niektorých metód opísaných v tomto materiáli sa používajú prístroje s kovovými časťami. Túto skutočnosť je potrebné vziať do úvahy pri testovaní žieravých látok.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Tlak pary látky je definovaný ako tlak nasýtenej pary nad tuhou alebo kvapalnou látkou. Pri termodynamickej rovnováhe tlak pary čistej látky je výlučne funkciou teploty.

Jednotka SI pre tlak, ktorá sa má používať, je pascal (Pa).

Jednotky, ktoré sa postupne používali s vývojom doby, spolu s prepočítavacími koeficientmi, sú tieto:

$$1 \text{ Torr (= 1 mm Hg)} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ atmosféra} = 1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

Jednotkou teploty v rámci sústavy SI je kelvin (K).

Všeobecná mólová (molekulová) plynová konštanta R je $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$.

Teplotná závislosť tlaku pary je opísaná v Clausiusovej-Clapeyronovej rovnici:

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

kde:

p = tlak pary látky vyjadrený v pascaloch

ΔH_v = jej teplota vyparovania v J mol^{-1}

R = všeobecná mólová (molekulová) plynová konštanta $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = termodynamická teplota v K (kelvinoch)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka alebo nová chemická látka obsiahnutá v chemickom prípravku. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Na stanovenie tlaku bolo navrhnutých sedem metód, ktoré sa môžu aplikovať v rozdielnych rozmedziach tlaku pary. V rámci každej metódy sa tlak pary stanovuje pri rozličných teplotách. V limitovanom teplotnom rozmedzí je logaritmus tlaku pary čistej látky lineárnou funkciou inverzie teploty.

1.4.1. **Dynamická metóda**

V rámci dynamickej metódy sa meria teplota varu, ktorá prináleží špecifikovanému tlaku.

Odporúčané rozmedzie:

10^3 až 10^5 Pa.

Táto metóda sa odporúča aj na stanovenie normálnej teploty varu a na tento účel sa dá použiť až do teploty 600 K.

1.4.2. **Statická metóda**

V rámci statického procesu pri termodynamickej rovnováhe sa stanovuje tlak pary vytvorený v uzavretom systéme pri špecifikovanej teplote. Táto metóda je vhodná pre jednozložkové a viaczložkové tuhé látky a kvapaliny.

Odporúčané rozmedzie:

10 až 10^5 Pa.

Táto metóda sa dá použiť aj v rozmedzí od 1 do 10 Pa, avšak len za predpokladu, že sa bude postupovať pozorne a opatrne.

1.4.3. **Izoteniskop**

Táto štandardizovaná metóda je taktiež statickou metódou, avšak zvyčajne nie je vhodná pre viaczložkové systémy. Doplnkové informácie možno získať v technickej norme ASTM, metóda D-2879-86.

Odporúčané rozmedzie:

od 100 do 10^5 Pa.

1.4.4. **Výtoková metóda: Váhy na meranie tlaku pary**

Množstvo látky unikajúce z komôrky za jednotku času cez otvor známej veľkosti sa stanovuje vo vákuových podmienkach, pri ktorých je množstvo látky vracajúce sa späť do komôrky zanedbateľné (napríklad meraním impulzu vyvinutého na vysokocitlivé váhy prúdom pary alebo meraním úbytku hmotnosti).

Odporúčané rozmedzie:

10^{-3} až 1 Pa.

1.4.5. **Výtoková metóda: meraním úbytku hmotnosti alebo zachytávaním odparenej látky**

Táto metóda je založená na odhade hmotnosti testovanej látky, ktorá za jednotku času unikla z Knudsenovej komôrky (4) vo forme pary cez mikrootvor v ultravákuových podmienkach. Hmotnosť výtokovej uniknutej

pary sa dá zistiť buď stanovením úbytku hmotnosti komôrky, alebo kondenzáciou pary pri nízkej teplote a stanovením množstva vyprchanej látky použitím chromatografickej analýzy. Tlak pary sa vypočíta použitím Hertzovho-Knudsenovho vzťahu.

Odporúčané rozmedzie:

10^{-3} až 1 Pa.

1.4.6. Metóda plynovej saturácie

Prúd inertného nosného plynu sa prepúšťa nad testovanou látkou takým spôsobom, že plyn sa nasýti parou testovanej látky. Množstvo materiálu transportovaného známym množstvom nosného plynu sa dá merať buď jeho zachytením do vhodného zachytávača, alebo vhodnou „in-train“ analytickou metódou. Výsledná hodnota sa potom použije na výpočet tlaku pary pri danej teplote.

Odporúčané rozmedzie:

10^{-4} až 1 Pa.

Táto metóda sa dá použiť aj v rozmedzí od 1 do 10 Pa, avšak len za predpokladu, že sa bude postupovať pozorne a opatrne.

1.4.7. Metóda rotujúcej guľôčky

Bezprostredným meracím prvkom v rotačnom meracom prístroji je malá oceľová guľôčka, ktorá je zavesená do magnetického poľa a v ňom rotuje vysokou rýchlosťou. Tlak pary sa odvodzuje zo spomaľovania rotačného pohybu guľôčky, ktoré je závislé od tlaku.

Odporúčané rozmedzie:

10^{-4} až 0,5 Pa.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Rôzne metódy na stanovenie tlaku pary sa porovnávajú z hľadiska ich použiteľnosti, opakovateľnosti, reprodukovateľnosti, rozsahu merania a existujúcich technických noriem. Prehľadná forma porovnania týchto metód je uvedená v tejto tabuľke.

Tabuľka

Kritériá kvality

Metóda merania	Látky		Odhad opakovateľnosti ⁽¹⁾	Odhad reprodukovateľnosti ⁽¹⁾	Odporúčaná oblasť	Platná norma
	tuhé	kvapalné				
1.4.1. Dynamická metóda	s nízkou teplotou topenia	áno	do 25 % 1 až 5 %	do 25 % 1 až 5 %	10^3 Pa až 2×10^3 Pa 2×10^3 Pa až 10^5 Pa	— —
1.4.2. Statická metóda	áno	áno	5 až 10 %	5 až 10 %	10 Pa až 10^5 Pa ⁽²⁾	NF T 20-048(5)
1.4.3. Izoteniskop	áno	áno	5 až 10 %	5 až 10 %	10^2 Pa až 10^5 Pa	ASTMD 2879-86
1.4.4. Výtoková metóda – váhy na meranie tlaku pár	áno	áno	5 až 20 %	do 50 %	10^{-3} Pa až 1 Pa	NF T 20-047(6)

Metóda merania	Látky		Odhad opakovateľnosti ⁽¹⁾	Odhad reprodukovateľnosti ⁽¹⁾	Odporúčaná oblasť	Platná norma
	tuhé	kvapalné				
1.4.5. Výtoková metóda – meranie úbytku hmotnosti	áno	áno	10 až 30 %	—	10 ⁻³ Pa až 1 Pa	—
1.4.6. Metóda plynovej saturácie	áno	áno	10 až 30 %	do 50 %	10 ⁻⁴ Pa až 1 Pa ⁽¹⁾	—
1.4.7. Metóda rotujúcej guľôčky	áno	áno	10 až 20 %	—	10 ⁻⁴ Pa až 0,5 Pa	—

⁽¹⁾ V závislosti od stupňa čistoty látky.

⁽²⁾ Tieto metódy sa dajú použiť aj v rozmedzí od 1 do 10 Pa, avšak len za predpokladu, že sa bude postupovať pozorne a opatrne.

1.6. OPIS METÓD

1.6.1. Dynamické meranie

1.6.1.1. Prístroje

Merací prístroj obvyčajne pozostáva z varnej nádoby s pripojeným chladičom, vyrobenými zo skla alebo kovu (obrázok 1), zo zariadenia na meranie teploty a zariadenia na reguláciu a meranie tlaku. Typický merací prístroj, znázornený na kresbe, je vyrobený z teplovzdorného skla a pozostáva z piatich častí:

Veľká, čiastočne dvoj stenová trubica pozostáva zo zabrusenej plášťovej prípojky, chladiča, chladiacej nádoby a prívodu (vstupu).

Sklený valec opatrený „Cottrellovou pumpou“ je inštalovaný do varnej časti trubice a má hrubý povrch z drveného skla na zabránenie prudkého varu v priebehu procesu varu.

Teplota sa meria pomocou vhodného teplotne citlivého elementu (napríklad odporového teplomeru, plášťového termočlánku), zasunutého do prístroja až po miesto merania teploty (č. 5, obrázok 1) cez vhodný vstup (napríklad cez zasunovaciu zabrusenú prípojku).

Vytvorené sú potrebné spojenia so zariadením na reguláciu tlaku a s meracím zariadením. Banka, ktorá funguje ako oddeľujúci priestor, je spojená s meracím prístrojom kapilárou.

Varnú nádobu zohrieva ohrievací článok (napríklad výmenný patrónový ohrievač), ktorý sa zospodu zasúva do prístroja. Požadovaný ohrievací prúd sa nastavuje, reguluje a stabilizuje prostredníctvom termočlánku (tepelného článku).

Potrebné vákuum v rozmedzí od 10² Pa do približne 10⁵ Pa sa vytvorí pomocou vákuovej pumpy.

Vhodný ventil sa používa na dávkovanie vzduchu alebo dusíka na reguláciu tlaku (rozsah merania približne od 10² Pa do 10⁵ Pa) a ventiláciu.

Tlak sa meria tlakomerom.

1.6.1.2. Postup merania

Tlak pary sa meria stanovením teploty varu testovanej vzorky pri rôznych špecifikovaných tlakoch zhruba medzi 10³ Pa a 10⁵ Pa. Stála teplota pri konštantnom tlaku naznačuje, že bola dosiahnutá teplota varu. Peniace látky sa nemôžu merať použitím tejto metódy.

Testovaná látka sa umiestni do čistej a suchej nádoby na vzorky. S problémami sa možno stretnúť v prípade tuhých látok, ktoré nie sú vo forme prášku, avšak tieto problémy sa môžu v niektorých prípadoch vyriešiť zahriatím chladiaceho plášťa. Po naplnení nádoby sa prístroj tesne uzavrie v prírube a testovaná látka sa odplyní. Potom sa nastaví najnižší požadovaný tlak a zapne sa zohrievanie. Zároveň sa teplotne citlivý element pripojí na registračný prístroj.

Rovnováha sa dosiahne vtedy, keď sa zaregistruje konštantná teplota varu pri konštantnom tlaku. Treba obzvlášť dávať pozor na to, aby sa zabránilo prudkému varu. Okrem toho musí v chladiči dôjsť k úplnej kondenzácii. Keď sa stanovuje tlak pary tuhých látok s nízkou teplotou topenia, treba dbať na to, aby sa zabránilo zablokovaniu chladiča.

Po zaregistrovaní tohto rovnovážneho bodu sa nastaví vyšší tlak. Postup pokračuje rovnakým spôsobom až po dosiahnutie tlaku 10^5 Pa (spolu je to približne 5 až 10 meraní, t. j. meraní v rovnovážnych bodoch). V rámci kontroly sa musia rovnovážne body opakovať a merať pri klesajúcich tlakoch.

1.6.2. Statické meranie

1.6.2.1. Prístroje

Prístroj pozostáva z nádoby na testovanú vzorku, ohrievacieho a chladiaceho systému na reguláciu teploty testovanej vzorky a na meranie teploty. Prístroj je taktiež vybavený nástrojmi na nastavenie a meranie tlaku. Obrázky 2a a 2b ilustrujú príslušné základné princípy.

Komora na vzorku (obrázok 2a) je na jednej strane napojená na vhodný vysokovákuový ventil. Na druhej strane je pripojená trubica v tvare U, ktorá obsahuje vhodnú manometrovú (tlakomerovú) kvapalinu. Jeden koniec trubice v tvare U odbočuje k vákuovej výveve, valcu s dusíkom alebo ventilačnému ventilu a k manometru (tlakomeru).

Namiesto trubice v tvare U možno použiť snímač tlaku s tlakomerom (obrázok 2b).

Na účely regulácie teploty testovanej vzorky je nádoba na vzorku spolu s ventilom a trubicou do tvaru U alebo snímačom tlaku (tlakomerom) umiestnená do kúpeľa, ktorý sa udržiava pri konštantnej teplote s maximálnym výkyvom $\pm 0,2$ K. Merania teploty sa uskutočňujú na vonkajšej stene nádoby obsahujúcej testovanú vzorku alebo priamo v samotnej nádobe.

Vákuová výveva s chladiacim zachytávačom sa používa na vákuovanie prístroja.

V prípade metódy 2a sa tlak pary testovanej látky meria nepriamo použitím nulového indikátora (ukazovateľa s nulovým bodom). Toto zohľadňuje skutočnosť, že hustota kvapaliny v trubici tvaru U sa mení pri rýchlej zmene teploty.

Tieto kvapaliny sú vhodné na použitie ako nulové indikátory pre trubicu v tvare U v závislosti od tlakového rozmedzia a vlastností testovanej látky: silikónové tekutiny, ftaláty. Testovaná látka sa nesmie vo výraznejšej miere rozpúšťať v kvapaline nachádzajúcej sa v trubici tvaru U alebo s ňou reagovať.

Pre manometer (tlakomer) možno v rozsahu normálneho atmosférického tlaku do 10^2 Pa použiť ortuť, zatiaľ čo silikónové tekutiny a ftaláty sú vhodné na použitie pri tlakoch pod 10^2 Pa až po 10 Pa. Pri tlakoch pod 10^{-1} Pa sa môžu použiť kapacitné manometre (tlakomery) so zahrievateľnou membránou. Existujú aj iné tlakové snímače (tlakomery), ktoré možno použiť pri tlakoch pod 10^2 Pa.

1.6.2.2. Postup merania

Pred začatím merania sa musia všetky súčasti prístroja zobrazeného na obrázku 2 dôkladne očistiť a osušiť.

V prípade metódy 2a sa trubica v tvare U naplní zvolenou kvapalinou, ktorá sa musí pred odčítaním nameraných hodnôt odplyníť pri zvýšenej teplote.

Testovaná látka sa umiestni do prístroja, ktorý sa potom uzatvorí, a teplota sa dostatočne zredukuje na odplynenie. Teplota musí byť dostatočne nízka, aby sa tak zaručilo, že vzduch bude vysatý, ale v prípade viaczložkového systému nesmie zmeniť zloženie materiálu. Ak sa tak požaduje, rovnováha sa dá dosiahnuť rýchlejšie miešaním.

Testovaná vzorka môže byť podchladená napríklad skvapalneným dusíkom (pričom treba dbať na to, aby sa zabránilo kondenzácii vzduchu alebo nasatiu kvapaliny) alebo zmesou etanolu a suchého ľadu. Na merania nízkych teplôt sa odporúča použiť tepelne regulovaný kúpeľ napojený na ultrakryomat.

Pri otvorenej polohe ventilu nad nádobou obsahujúcou testovanú vzorku sa odsávaním počas niekoľkých minút odstráni prítomný vzduch. Ventil sa potom uzavrie a teplota testovanej vzorky sa redukuje na najnižšiu žiaducu úroveň. Ak je to potrebné, postup vákuovania sa musí opakovať niekoľkokrát za sebou.

Keď sa vzorka zahreje, tlak pary narastá. Toto zmení rovnováhu kvapaliny v trubici tvaru U. Na kompenzovanie tohto javu sa do prístroja cez ventil vpúšťa dusík alebo vzduch dovtedy, kým sa kvapalina na indikáciu tlaku opäť neustáli na nulovej hodnote. Tlak, ktorý je na toto potrebný, sa môže odčítať z presného kontrolného tlakomeru (manometra) pri teplote miestnosti. Tento tlak zodpovedá tlaku pary testovanej látky pri tejto danej konkrétnej teplote merania.

Metóda 2b je podobná, avšak tlak pary sa odčítava priamo.

Teplotná závislosť tlaku pary sa stanovuje vo vhodne krátkych intervaloch (spolu približne 5 až 10 meracích bodov) až po požadované maximum. Odčítania nízkych teplôt sa musia opakovať ako kontrola.

Ak sa hodnoty dosiahnuté z opakovaných odčítaní nezhodujú s krivkou dosiahnutou pre stúpajúcu teplotu, môže to byť následkom jednej z uvedených skutočností:

1. Testovaná vzorka naďalej obsahuje vzduch (napríklad materiály s vysokou viskozitou) alebo nízkovriace látky, ktoré sú uvoľňované počas zahrievania a môžu byť odstránené odsátím po ďalšom podchladení.
2. Chladiaca teplota nie je dostatočne nízka. V tomto prípade sa ako chladiaci činiteľ použije skvapalnený dusík.

V prípade, ak ide o bod 1 alebo 2, musia sa merania opakovať.

3. Testovaná látka podlieha reakcii v skúšanom teplotnom rozmedzí (napríklad rozkladu alebo polymerizácii).

1.6.3. Izoteniskop

Vyčerpávajúci opis tejto metódy možno nájsť v odkaze (7). Princíp meracieho zariadenia je znázornený na obrázku 3. Podobne ako statická metóda opísaná v odseku 1.6.2, aj izoteniskop je vhodný na skúmanie tuhých látok aj kvapalín.

V prípade kvapalín samotná testovaná látka slúži ako kvapalina v pomocnom tlakomere (manometri). Množstvo kvapaliny, ktoré je dostatočné na zaplnenie banky a krátkeho ramena tlakomerovej sekcie, sa umiestni do izoteniskopu. Izoteniskop sa napojí na vákuový systém a vákuuje, potom sa naplní dusíkom. Vákuovanie a prečistenie systému sa opakuje dvakrát, aby sa odstránil reziduálny kyslík. Naplnený izoteniskop sa umiestni v horizontálnej polohe, tak aby sa testovaná vzorka rozšírila v tenkej vrstve vo vzorkovej banke a tlakomerovej sekcii (časť v tvare U). Tlak systému sa redukuje na 133 Pa a testovaná vzorka sa mierne zahrieva, až kým nezačne vriieť (odstránenie rozpustených viazaných plynov). Izoteniskop sa potom umiestni tak, aby sa testovaná vzorka opäť vrátila do banky a krátkeho ramena tlakomeru a aby tieto boli opäť úplne naplnené kvapalinou. Tlak sa udržiava na takej úrovni ako pri odplynovaní; vytiahnutá špička banky so vzorkou sa zohrieva malým plameňom dovtedy, kým sa uvoľnená para zo vzorky nerozšíri v dostatočnej miere na to, aby vytlačila časť vzorky z hornej časti banky a ramena tlakomeru do tlakomerovej sekcie izoteniskopu, vytvoriac tak plynom naplnený priestor bez prítomnosti dusíka.

Izoteniskop sa potom umiestni do kúpeľa s konštantnou teplotou a tlak dusíka sa nastaví tak, aby sa rovnal tlaku testovanej vzorky. Rovnováhu tlaku ukáže tlakomerová sekcia izoteniskopu. V rovnovážnom stave sa tlak dusíka rovná tlaku pary testovanej látky.

V prípade tuhých látok sa použijú tlakomerové kvapaliny uvedené v odseku 1.6.2.1 v závislosti od tlakového a teplotného rozmedzia. Odplynená tlakomerová kvapalina sa naleje do vydutiny na dlhom ramene izoteniskopu. Potom sa tuhá látka určená na skúmanie umiestni do banky a odplyní sa pri zvýšenej teplote. Po tomto úkone sa izoteniskop nakloní tak, aby tlakomerová kvapalina mohla natiecť do trubice v tvare U. Meranie tlaku pary ako funkcie teploty sa uskutoční podľa postupu uvedeného v odseku 1.6.2.

1.6.4. Výtoková metóda: Váhy na meranie tlaku pary

1.6.4.1. Prístroje

Rozličné verzie prístroja sú opísané v odkaze (1). Prístroj, ktorý je opísaný v tejto časti, ilustruje všeobecný princíp tejto metódy (obrázok 4). Na obrázku 4 sú znázornené hlavné zložky prístroja, pozostávajúce z vysokovákuovej nádoby z nehrdzavejúcej ocele alebo zo skla, zariadenia na vytváranie a meranie vákua a zo vstavaných zložiek na meranie tlaku pary na váhach. Prístroj pozostáva z nasledujúcich vstavaných zložiek (komponentov):

- odparovacej piecky s prírubou a otočným vstupom. Odparovacia piecka je v podstate valcovitá nádoba, vyrobená napríklad z medi alebo chemicky odolnej zliatiny s dobrou tepelnou vodivosťou. Možno tiež použiť sklenú nádobu s medenou stenou. Piecka má priemer približne 3 cm až 5 cm a je vysoká 2 cm až

5 cm. Je opatrená jedným až tromi otvormi s rozdielnymi veľkosťami na umožnenie prúdenia pary. Piecka je vyhrievaná buď vyhrievacou platničkou umiestnenou pod ňou, alebo vyhrievacou špirálou ovinutou okolo jej vonkajšieho plášťa. Aby sa zabránilo strate tepla únikom cez podkladovú platňu, ohrievač je prichytený k tejto platni kovom s nízkou tepelnou vodivosťou (nové striebro, niklová mosadz alebo chrómniklová oceľ), napríklad rúrkou z niklovej mosadze pripojenou k otočnému vstupu, ak sa používa piecka s viacerými otvormi. Táto úprava má tú výhodu, že umožňuje zasunutie medenej tyče. Umožňuje to chladenie z vonkajšej strany použitím chladiaceho kúpeľa,

- ak má veko medenej piecky viacero otvorov rozličných priemerov pod vzájomným uhlom 90°, možno tak v rámci celkového rozmedzia merania pokryť rôzne rozmedzia tlaku pary (otvory s priermi v rozmedzí približne od 0,30 mm do 4,50 mm). Veľké otvory sa používajú pre nízke tlaky pary a naopak. Otáčaním piecky môže byť nastavený požadovaný otvor alebo medzipoloha na prúdenie pary (otvor v piecke – kryt – miska váh) a prúd molekúl sa uvoľní alebo odkloní cez otvor v piecke na miskú váh. Na účely merania teploty testovanej látky sa na vhodné miesto umiestni tepelný článok (termočlánok) alebo odporový teplomer,
- nad krytom je umiestnená miska váh prináležiaca vysokocitlivým mikrováham (pozri ďalej). Miska váh má priemer približne 30 mm. Pozlátý hliník predstavuje vhodný materiál,
- miska váh je obklopená valcovitým mosadzným alebo medeným chladiacim boxom. V závislosti od typu váh je vybavená otvormi pre rameno váh (vahadlo) a otvorom v ochrannom kryte pre prúd molekúl a jej úlohou je zaručiť úplnú kondenzáciu pary na miske váh. Odvádzanie tepla smerom von je zabezpečené napríklad medenou tyčou pripojenou k chladiacemu boxu. Tyč je vyvedená cez základovú platňu a je od nej tepelne izolovaná napríklad trubicou z chrómniklovej ocele. Tyč je zasunutá do Dewarovej nádoby obsahujúcej skvapalnený dusík, umiestnenej pod základovou platňou, alebo skvapalnený dusík cirkuluje priamo cez tyč. Chladiaci box sa takto udržiava pri teplote približne – 120 °C. Miska váh je chladená výlučne sálaním a vyhovuje skúšanému tlakovému rozmedziu (chladenie približne jednu hodinu pred začatím merania),
- váhy sú umiestnené nad chladiacim boxom. Vhodnými váhami pre túto metódu sú napríklad vysokocitlivé dvojramenné elektronické mikrováhy (8) alebo vysokocitlivý magneto-elektrický prístroj (pozri smernicu na vykonávanie OECD testov 104, vydanie z 12. mája 1981),
- v základovej platni sú zabudované aj elektrické prípojky pre tepelné články (termočlánky) (alebo odporové teplomery) a ohrievací rúrkový had,
- vákuum sa v nádobe vytvára použitím vákuovej vývevy na tvorbu čiastočného vákua (podtlaku) alebo použitím vysokovákuovej vývevy (požadované vákuum približne 1 Pa až 2×10^{-3} Pa sa dosiahne po 2 hodinách odčerpávania vzduchu). Tlak je regulovaný vhodným ionizačným tlakomerom (manometrom).

1.6.4.2. Postup merania

Nádoba sa naplní testovanou látkou a veko sa uzavrie. Kryt a chladiaci box sa posunú nad piecku. Prístroj sa uzavrie a zapnú sa vákuové vývevy. Konečný tlak pred začatím meraní by mal byť približne 10^{-4} Pa. Chladenie v chladiacom boxe sa začína pri tlaku 10^{-2} Pa.

Ak sa dosiahne požadované vákuum, začne sa so sériou kalibrácií pri najnižšej požadovanej teplote. Nastaví sa zodpovedajúci otvor na veku, prúd pary prechádza štítom umiestneným priamo nad otvorom a naráža na ochladený povrch misky váh. Miska váh musí byť dostatočne veľká, aby sa zabezpečilo, že celý prúd pary vedený krytom bude narážať na jej povrch. Impulz prúdu pary pôsobí ako sila proti miske váh a molekuly sa kondenzujú na jej chladnom povrchu.

Impulz a následná kondenzácia vytvárajú signál na registračnom prístroji. Vyhodnotenie signálov poskytuje dve informácie:

1. V prístroji, ktorý je tu opísaný, sa tlak pary stanovuje priamo z impulzu na miskú váh [nie je na to potrebné poznať molekulovú hmotnosť (2)]. Geometrické faktory ako otvor v piecke a uhol prúdenia molekúl musia byť zohľadnené pri vyhodnocovaní čítaní.
2. Zároveň sa môže merať aj hmotnosť kondenzátu a z nej možno vypočítať rýchlosť odparovania. Tlak pary sa môže tiež vypočítať z rýchlosti odparovania a molekulovej hmotnosti použitím Hertzovej rovnice (2).

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

kde:

G = rýchlosť odparovania ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$)

M = (relatívna) molekulová (mólová) hmotnosť (g mol^{-1})

T = teplota (K) (kelvin)

R = všeobecná molekulová plynová konštanta ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

p = tlak pary (Pa)

Po dosiahnutí potrebného vákua (podtlaku) sa séria meraní začne pri najnižšej želanej meracej teplote.

Pre ďalšie merania sa teplota zvyšuje v malých intervaloch, až kým sa nedosiahne maximálna želaná teplotná hodnota. Testovaná vzorka sa potom opäť ochladí a môže byť zaznamenaná druhá krivka tlaku pary. Ak druhé kolo nepotvrdí výsledky prvého kola meraní, potom je možné, že testovaná látka sa rozkladá v rámci meraného teplotného rozmedzia.

1.6.5. Výtoková metóda – stanovením úbytku hmotnosti

1.6.5.1. Prístroje

Výtokový prístroj pozostáva z týchto základných častí:

- nádoby (nádržky), ktorá môže byť termostaticky udržiavaná pri stálej teplote a vákuovaná a v ktorej sú umiestnené výtokové komôrky,
- vysokovákuovej vývevy (napríklad difúznej vývevy alebo turbomolekulárnej vývevy) s podtlakovým (vákuovým) ventilom,
- zachytávača s použitím skvapalneného dusíka alebo suchého ľadu.

Na obrázku 5 je ako príklad znázornená elektricky zohrievaná hliníková vákuová nádoba so štyrmi výtokovými komôrkami z nehrdzavejúcej ocele. Fólia z nehrdzavejúcej ocele s hrúbkou približne 0,3 mm je vybavená výtokovým otvorom s priemerom 0,2 mm až 1,0 mm a k výtokovej komôrke je prichytená závitovým vekom.

1.6.5.2. Postup merania

Referenčná a testovaná látka sa naplnia do jednotlivých výtokových komôrok, kovová medzistena s otvorom sa zaistí závitovým vekom a každá komôrka sa potom odváži s presnosťou na 0,1 mg. Komôrka sa umiestni do prístroja termostaticky udržiavaného pri stálej teplote, ktorý sa potom vákuuje na menej ako jednu desatinu predpokladaného tlaku. V stanovených časových intervaloch v rozmedzí od 5 hodín do 30 hodín sa do prístroja vpúšťa vzduch a opätovným odvážením sa stanoví úbytok hmotnosti výtokových komôrok.

Aby sa zabránilo ovplyvneniu výsledkov prchavými prísadami, komôrka sa opakovane preváža v stanovených časových intervaloch na účely skontrolovania, či je rýchlosť odparovania konštantná prinajmenšom v priebehu dvoch takýchto časových intervalov.

Tlak pary p vo výtokovej komôrke je daný nasledujúcou rovnicou:

$$p = \frac{m}{KA\tau} \sqrt{\frac{2\pi RT}{M}}$$

kde:

P = tlak pary (Pa)

m = hmotnosť testovanej látky, ktorá unikla z komôrky v priebehu času t (kg)

t = čas (s)

A = plocha otvoru (m^2)

K = opravný koeficient

R = všeobecná plynová konštanta ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

T = teplota (K)

M = relatívna (pomerná) molekulová hmotnosť (kg mol^{-1})

Korekčný činiteľ K závisí od pomeru dĺžky k polomeru valcovitého hrdla otvoru:

pomer	0,1	0,2	0,6	1,0	2,0
K	0,952	0,909	0,771	0,672	0,514

Vyššie uvedená rovnica môže byť napísaná aj v tomto tvare:

$$p = E \frac{m}{t} \sqrt{\frac{T}{M}}$$

kde $E = \frac{1}{KA} \sqrt{2\pi R}$ a predstavuje konštantu pre výtokovú komôрку.

Táto konštanta pre výtokovú komôрку E môže byť stanovená referenčnou látkou (2,9), pričom sa použije táto rovnica:

$$E = \frac{p(r)t}{m} \sqrt{\frac{M(r)}{T}}$$

kde:

$p(r)$ = tlak pary referenčnej látky (Pa)

$M(r)$ = relatívna molekulová hmotnosť referenčnej látky ($\text{kg} \times \text{mol}^{-1}$)

1.6.6. Metóda plynovej saturácie

1.6.6.1. Prístroje

Typický prístroj používaný na uskutočnenie tohto testu pozostáva z celého radu komponentov uvedených na obrázku 6a, ktoré sú opísané nižšie (1).

Inertný plyn:

Nosný plyn nesmie chemicky reagovať s testovanou látkou. Na tento účel zvyčajne stačí použiť dusík, avšak z prípadu na prípad sa môžu požadovať aj iné plyny (10). Použitý plyn musí byť suchý [pozri obrázok 6a, legenda 4: snímač (senzor) relatívnej vlhkosti].

Regulácia toku:

Vhodný systém na reguláciu plynu je žiaduci na zabezpečenie konštantného a upraveného toku plynu cez saturačný stĺpec (kolónu).

Zachytávače pary:

Tieto závisia od konkrétnych vlastností príslušnej testovanej vzorky a od zvolenej metódy analýzy. Para by mala byť zachytávaná kvantitatívne a v takej forme, ktorá umožňuje následnú analýzu. Pre niektoré testované látky budú vhodné aj také typy zachytávačov, ktoré obsahujú kvapaliny ako hexán alebo etylénglykol. Pre iné látky možno zasa použiť tuhé absorpčné činidlá.

Ako alternatívu zachytávania pary s následnou analýzou možno na kvantitatívne stanovenie množstva materiálu transportovaného známym množstvom nosného plynu použiť analytické techniky typu „in-train“, napríklad chromatografiu. Okrem toho možno merať aj úbytok hmotnosti testovanej vzorky.

Výmenník tepla:

Na merania pri rozdielnych teplotách môže byť potrebné do celkovej zostavy zahrnúť aj výmenník tepla.

Saturátorová kolóna:

Testovaná látka sa z roztoku naniesie na vhodný inertný nosič. Pokrytý nosič sa umiestni do saturátorovej kolóny, ktorej rozmery a prietok musia byť také, aby sa zaručila úplná saturácia nosného plynu. Saturátorová kolóna musí mať termostaticky udržiavanú teplotu. Na merania nad teplotu miestnosti by mal byť priestor medzi saturátorovou kolónou a zachytávacími ohrievaný, aby sa zabránilo kondenzácii testovanej látky.

Na účely zníženia transportu hmoty, ktorý sa prejavuje pri difúzii, môže byť v poradií za saturátorovou kolónou umiestnená kapilára (pozri obrázok 6b).

1.6.6.2. Postup merania*Príprava saturátorovej kolóny:*

Roztok testovanej látky v rozpúšťadle s vysokým stupňom prchavosti sa pridá k vhodnému množstvu nosiča. Je potrebné pridať dostatočné množstvo testovanej látky, aby sa saturácia udržiavala počas trvania celého testu. Rozpúšťadlo sa úplne odparí vo vzduchu alebo v rotačnom odparovači a dôkladne zmiešaný materiál sa pridá do saturátorovej kolóny. Po termostatickej úprave testovanej vzorky sa cez prístroj nechá prúdiť suchý dusík.

Meranie:

Zachytávače alebo „in-train“ detektor sú napojené na výtokovú linku kolóny a zaznamenáva sa čas. Prietok sa kontroluje na začiatku a potom v pravidelných intervaloch počas celého experimentu, pričom sa používa bublinomer (alebo priebežne, kontinuitne pomocou hmotového prietokomeru).

Musí sa merať tlak na výstupe zo saturátora. Tento úkon sa môže uskutočniť jedným z uvedených spôsobov:

- buď zapojením snímača tlaku (tlakomeru) medzi saturátor a zachytávače (toto však nebýva uspokojivé riešenie, pretože to zvyšuje mŕtvy priestor a adsorpčný povrch), alebo
- stanovením úbytku (poklesu) tlaku v rámci príslušného použitého zachytávacieho systému ako funkcie prietoku v samostatnom pokuse (tento postup nebýva veľmi uspokojivý v prípade kvapalných zachytávačov).

Čas požadovaný na zachytenie potrebného množstva testovanej látky pre rozdielne metódy analýzy je stanovený v predbežných cykloch alebo odhadom. Ako alternatívu zachytávania testovanej látky pre ďalšiu analýzu možno použiť „in-train“ kvantitatívny analytický postup (napríklad chromatografiu). Pred vypočítaním tlaku pary pri danej teplote je potrebné uskutočniť predbežné cykly na stanovenie maximálneho prietoku, ktorý úplne saturuje nosný plyn parou testovanej látky. Toto sa dá zaručiť, ak sa nosný plyn prepúšťa cez saturátor dostatočne pomaly, tak aby nižšia rýchlosť nedávala väčší vypočítaný tlak pary.

Konkrétna analytická metóda sa stanoví na základe charakteristických vlastností látky určenej na testovanie (napríklad plynová chromatografia alebo gravimetria).

Stanoví sa množstvo testovanej látky transportované známym objemom nosného plynu.

1.6.6.3. Výpočet tlaku pary

Tlak pary sa vypočíta z hustoty pary, W/V , pomocou nasledujúcej rovnice:

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

kde:

p = tlak pary (Pa)

W = hmotnosť odparenej testovanej látky (g)

V = objem nasýteného (saturovaného) plynu (m^3)

R = všeobecná molekulová plynová konštanta ($J \text{ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

T = teplota (K) (kelvin)

M = relatívna molekulová hmotnosť testovanej látky ($g \text{ mol}^{-1}$)

Namerané objemy musia byť opravené z hľadiska tlakových a teplotných rozdielov medzi prietokomerom a termostaticky upraveným saturátorom. Ak je prietokomer umiestnený smerom po prúde od zachytávača pary, môžu byť potrebné opravy zohľadňujúce všetky odparené ingrediencie zachytávača (1).

1.6.7. Metóda rotujúcej guľôčky (8, 11, 13)

1.6.7.1. Prístroje

Metóda rotujúcej guľôčky sa môže uskutočniť použitím meradla viskozity rotujúceho rotora podľa znázornenia na obrázku 8. Schematický náčrt pokusného systému je zobrazený na obrázku 7.

Merací prístroj zvyčajne pozostáva z meracej hlavy rotujúceho rotora umiestnenej v termostaticky upravovanom uzavretom priestore (s presnosťou regulácie na 0,1 °C). Nádoba so vzorkou je umiestnená v termostaticky upravovanom uzavretom priestore (s presnosťou regulácie na 0,01 °C) a všetky ostatné časti systému sú udržiavané pri vyššej teplote, aby sa zabránilo kondenzácii. Vysokovákuové vývevové zariadenie je napojené na systém pomocou vysokovákuových ventilov.

Meracia hlava rotujúceho rotora pozostáva z ocelevej guľôčky (s priemerom 4 mm až 5 mm) v rúrke. Guľôčka je zavesená a stabilizovaná v magnetickom poli, zvyčajne s použitím kombinácie permanentných magnetov a regulačných cievok.

Guľôčka sa privádza do otáčavého pohybu rotačnými poľami vytváranými cievkami. Snímacie cievky, ktoré merajú neustále prítomnú nízku laterálnu magnetizáciu guľôčky, umožňujú meranie jej rýchlosti otáčania.

1.6.7.2. Postup merania

Keď guľôčka dosiahla danú rotačnú rýchlosť $v(o)$ (približne 400 otáčok za sekundu), ďalšie budenie sa zastaví, a následkom trenia plynu dochádza k spomaľovaniu.

Pokles rýchlosti otáčania sa meria ako funkcia času. Keďže trenie spôsobené magnetickou suspenziou je zanedbateľné v porovnaní s trením plynu, tlak plynu je daný nasledujúcou rovnicou:

$$p = \frac{\pi \bar{c} r \rho}{\sigma 10 t} \times \ln \frac{v(t)}{v(o)}$$

kde:

$\bar{c}$ = priemerná rýchlosť molekúl plynu

ρ = polomer guľôčky

σ = hustota hmoty guľôčky

t = koeficient tangenciálneho prenosu hybnosti ($\epsilon = 1$ pre ideálnu guľovú plochu guľôčky)

$v(t)$ = čas

= rýchlosť otáčania po uplynutí času

$tv(o)$ = počiatočná rýchlosť otáčania

Túto rovnicu možno napísať aj v tejto forme:

$$p = \frac{\pi \bar{c} r \rho}{10 \sigma} \times \frac{t_n - t_{n-1}}{t_n \times t_{n-1}}$$

kde t_n , t_{n-1} sú časy potrebné pre daný počet N otáčok. Tieto časové intervaly t_n a t_{n-1} nasledujú za sebou a $t_n > t_{n-1}$.

Priemerná rýchlosť molekuly plynu $\bar{c}$ je daná nasledujúcou rovnicou:

$$\bar{c} = \left(\frac{8 RT}{\pi M} \right)^{\frac{1}{2}}$$

kde:

T = teplota

R = všeobecná molárna plynová konštanta

M = relatívna molekulová hmotnosť

2. ÚDAJE

Tlak pary zo všetkých predchádzajúcich metód musí byť stanovený pre minimálne dve teploty. V rozmedzí od 0 °C do 50 °C sa odporúčajú tri alebo viac teplôt, aby sa dala skontrolovať lineárnosť krivky tlaku plynu.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- použitú metódu,
- presnú špecifikáciu látky (identifikáciu a prímеси) a opatrenia v rámci predbežnej purifikácie testovanej látky, ak sa takéto uskutočnili,
- minimálne dve tlakové a teplotné hodnoty, podľa možnosti v rozmedzí od 0 °C do 50 °C,
- všetky prvotné, nespracované údaje,
- log p verzus 1/T krivku,
- odhad tlaku pary pri 20 °C alebo 25 °C.

Ak sa pozoruje premena (zmena skupenstva, rozklad), treba uviesť nasledujúce informácie:

- charakter zmeny,
- teplotu, pri ktorej sa zmena prejavuje pri atmosférickom tlaku,
- tlak pary pri 10 °C a 20 °C pod teplotou premeny a 10 °C a 20 °C nad touto teplotou (s výnimkou premeny z tuhej látky na plyn).

V správe z testu musia byť uvedené všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímеси a fyzikálneho stavu (skupenstva) testovanej látky.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 104, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) Ambrose, D. in 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, 3rd ed., Chapter IX, Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I.
- (4) Knudsen, M. Ann. Phys. Lpz., 1909, vol. 29, 1979; 1911, vol. 34, 593.
- (5) NF T 20-048 AFNOR (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-1} to 10^5 Pa – Static method.

-
- (6) NF T 20-047 AFNOR (Sept. 85). 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.
 - (7) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
 - (8) G. Messer, P. Röhl, G. Grosse and W. Jitschin. J. Vac. Sci. Technol.(A), 1987, Vol. 5 (4), 2440.
 - (9) Ambrose, D., Lawrenson, I. J., Sprake, C.H.S. J. Chem. Thermodynamics 1975, Vol. 7, 1173.
 - (10) B. F. Rordorf. Thermochimica Acta, 1985, vol. 85, 435.
 - (11) G. Comsa, J. K. Fremerey and B. Lindenau. J. Vac. Sci. Technol., 1980, Vol. 17 (2), 642.
 - (12) G. Reich. J. Vac. Sci. Technol., 1982, Vol. 20 (4), 1148.
 - (13) J. K. Fremerey. J. Vac. Sci. Technol. (A), 1985, Vol. 3 (3), 1715.

Dodatok 1

Metóda odhadu (predbežného výpočtu)

ÚVOD

Vypočítané hodnoty tlaku pary sa môžu použiť:

- na rozhodnutie, ktorá z existujúcich pokusných metód sa hodí najlepšie,
- na poskytnutie odhadu alebo medznej hodnoty v prípadoch, kde sa pokusná metóda nemôže uplatniť z technických príčin (vrátane situácie, kde tlak pary je veľmi nízky),
- ako pomôcka na identifikáciu tých prípadov, kde vynechanie pokusného merania je zdôvodnené tým, že tlak pary je pri teplote okolitého prostredia (vzduchu) pravdepodobne $< 10^{-5}$ Pa.

METÓDA ODHADU (PREDBEŽNÉHO VÝPOČTU)

Tlak pary kvapalín a tuhých látok sa môže odhadnúť (predbežne vypočítať) použitím modifikovanej Watsonovej korelácie (a). Jediným potrebným pokusným údajom je normálna teplota varu. Táto metóda sa dá použiť v celom rozmedzí tlaku od 10 Pa^5 až po 10^{-5} Pa.

Podrobné informácie o tejto metóde sú uvedené v príručke Handbook of Chemical Property Estimation Methods (Príručka metód na odhadovanie vlastností) (b).

POSTUP VÝPOČTU

Podľa (b) sa tlak pary vypočíta týmto spôsobom:

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

kde:

T = daná teplota

T_b = normálna teplota (bod) varu

P_{vp} = tlak pary pri teplote T

ΔH_{vb} = výparné teplo, skupenské teplo vyparovania

b =

ΔZ_b = korekcia na stlačiteľnosť, koeficient stlačiteľnosti (odhadovaný pri 0,97)

m = empirický koeficient závislý od fyzikálneho skupenstva pri danej teplote T

Ďalej

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

kde K_F je empirický koeficient (faktor) zohľadňujúci polaritu testovanej látky. Pre viaceré typy zlúčenín sú koeficienty (faktory) K_F uvedené v odkazoch (b).

Často sú k dispozícii údaje uvádzajúce teplotu varu pri redukovanom tlaku. V takom prípade sa podľa (b) tlak pary vypočíta nasledujúcim spôsobom:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1} \left[1 - \left(3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^m \frac{T_1}{T} - 2m \left(3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1} \right]$$

kde T_1 je teplota varu pri redukovanom tlaku P_1

SPRÁVA

Ak sa použije metóda odhadu, správa z testu musí obsahovať úplnú dokumentáciu výpočtov.

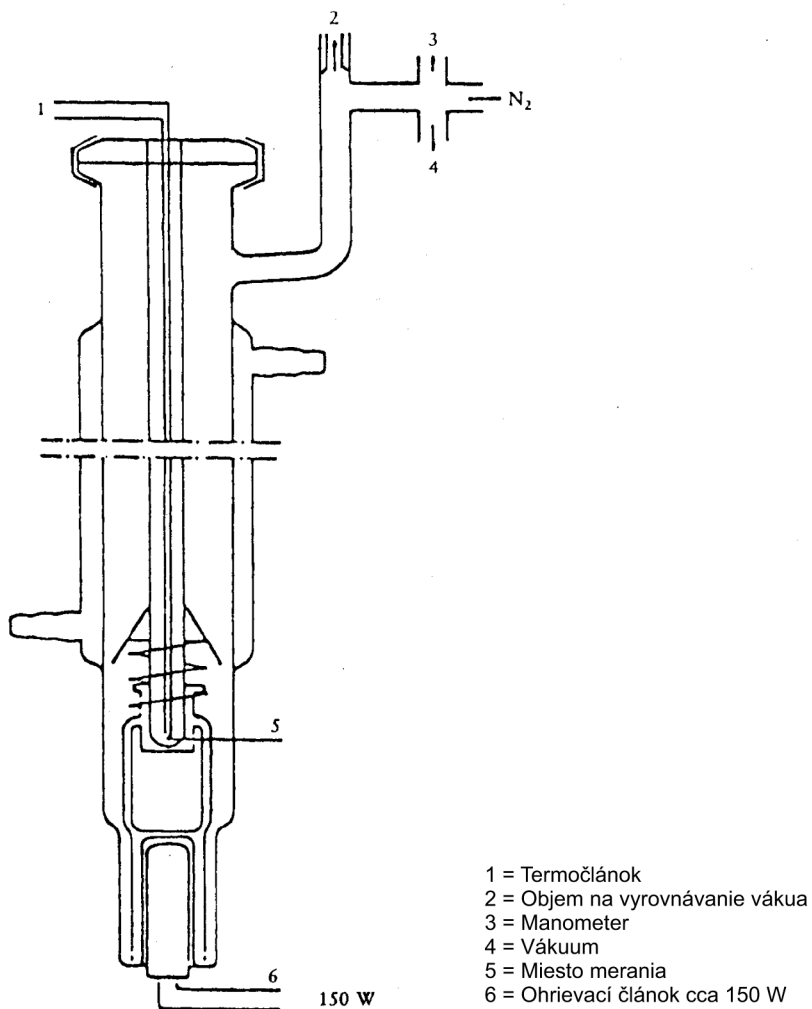
ODKAZY

- (a) K. M. Watson, Ind. Eng. Chem., 1943, vol. 35, 398.
- (b) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt, Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982.

Dodatok 2

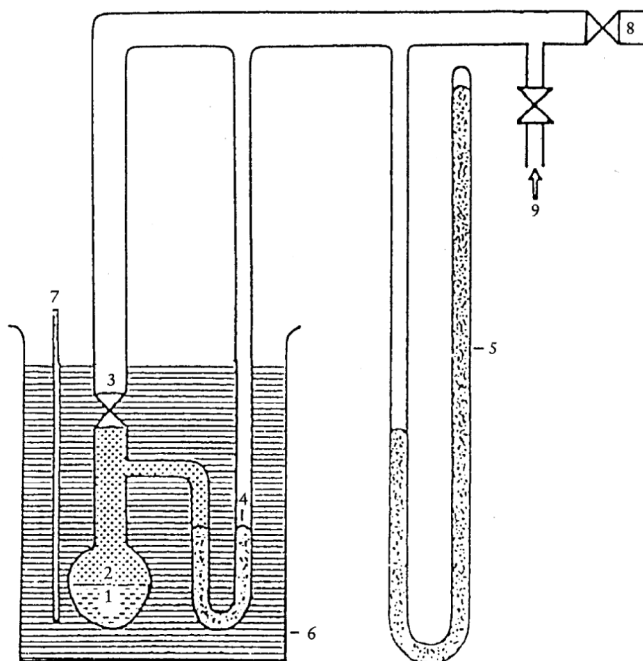
Obrázok 1

Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa dynamickej metódy



Obrázok 2a

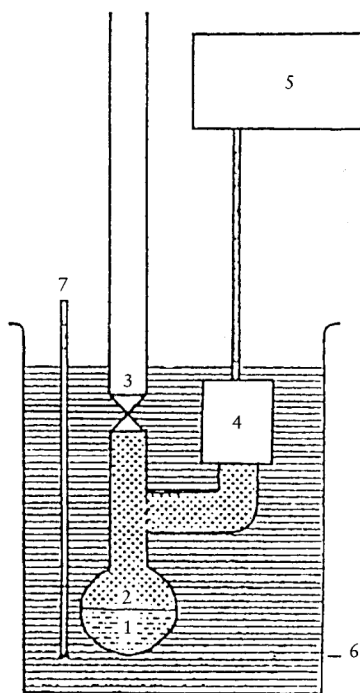
Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa statickej metódy (s použitím tlakomeru v podobe trubice v tvare U)



1. Testovaná chemická látka	6. Tepelný kúpeľ
2. Para, plynná fáza	7. Prístroj na meranie teploty
3. Vysokovákuový ventil	8. K vákuovej výveve
4. Trubica v tvare U (pomocný manometer)	9. Ventilácia
5. Manometer	

Obrázok 2b

Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa statickej metódy (s použitím ukazovateľa tlaku)

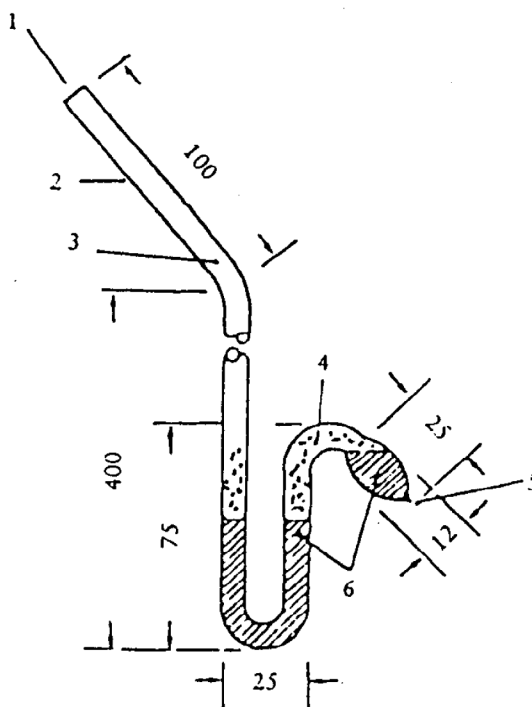


1. Testovaná chemická látka
2. Para, plynná fáza
3. Vysokovákuový ventil
4. Manometer

5. Ukazovateľ tlaku
6. Tepelný kúpeľ
7. Prístroj na meranie teploty

Obrázok 3

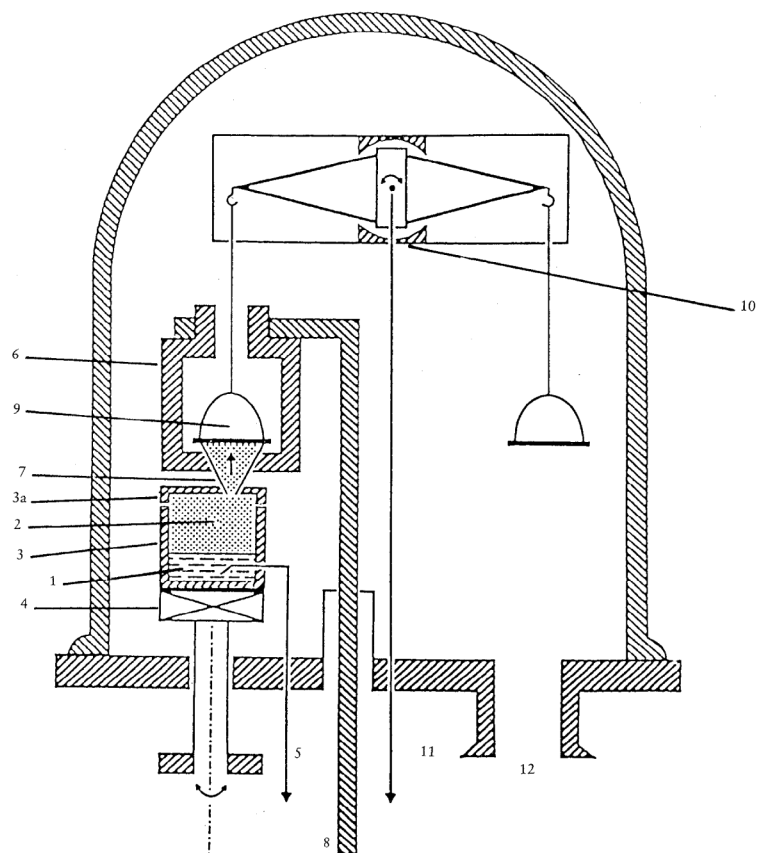
Izoteniskop [pozri odkaz (7)]



1. K systému na reguláciu teploty a merania
2. Rúra s vonkajším priemerom 8 mm
3. Suchý dusík v tlakovom systéme
4. Para na vzorky
5. Malý hrot
6. Kvapalná testovaná vzorka

Obrázok 4

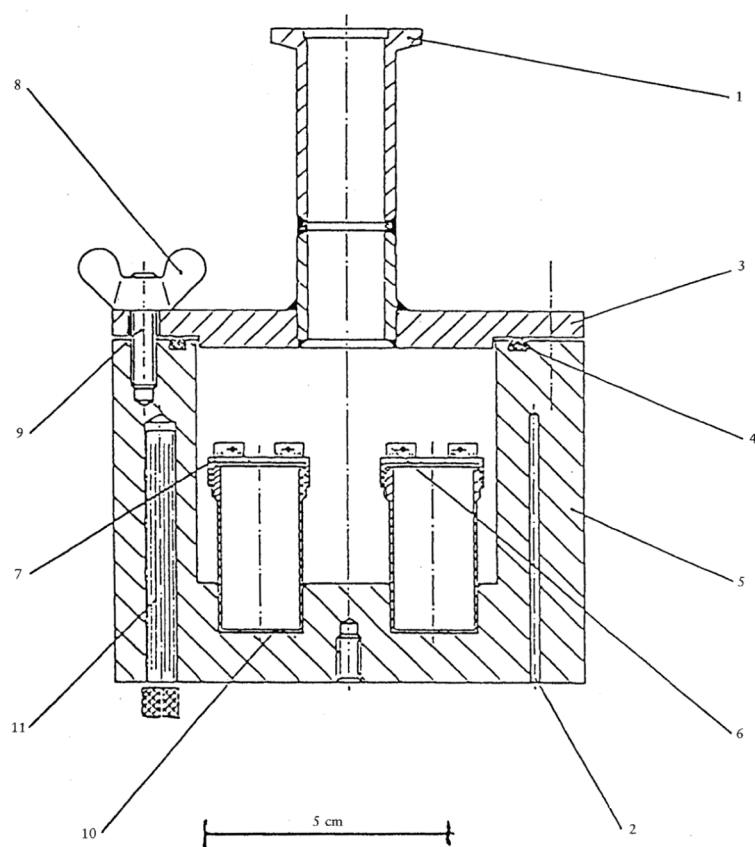
Prístroj na stanovenie krivky tlaku pary podľa efúznej metódy s použitím váh na meranie tlaku pary



1. Testovaná látka	7. Kryt
2. Plynná fáza s prúdom pary	8. Chladiaca tyč pre chladiaci box
3. Odparovacia piecka s otočným vstupom	9. Miska váh
3a. Veko piecky s otvorom	10. Mikrováhy
4. Ohrievanie (chladenie) vzorky	11. K registračnému prístroju
5. Meranie teploty testovanej vzorky	12. K vysokovákuovej výveve
6. Chladiaci box	

Obrázok 5

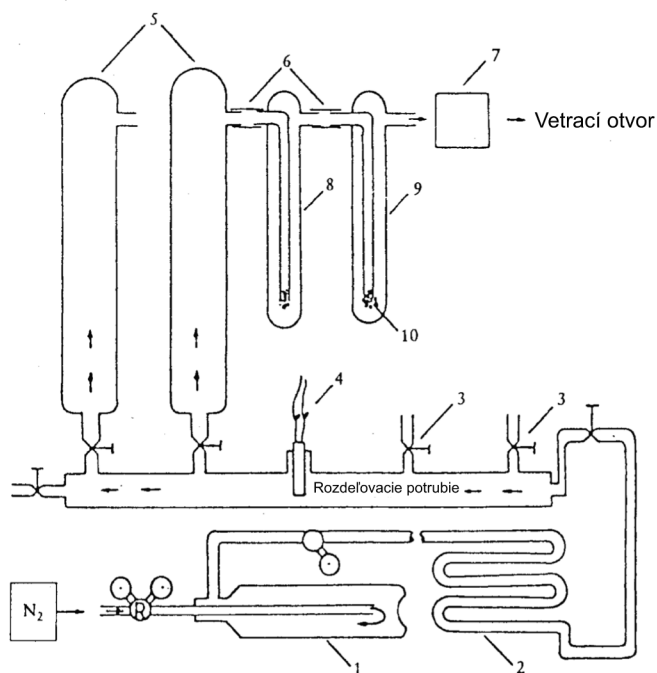
Príklad prístroja na odparovanie pri nízkom tlaku efúznou metódou s objemom efúznej komory 8 cm



1. Pripojenie na vákuum
2. Dutina na zasunutie odporového teplomera alebo na odmeranie a reguláciu teploty
3. Veko vákuovej komory
4. Tesniaci o-kružok
5. Hliníková vákuová nádoba
6. Zariadenie na inštalovanie a vyberanie efúzných komôr
7. Veko so závitom
8. Kridlové matice
9. Skrutky
10. Efúzne komôrky z nehrdzavejúcej ocele
11. Ohrievacie telesá (6)

Obrázok 6a

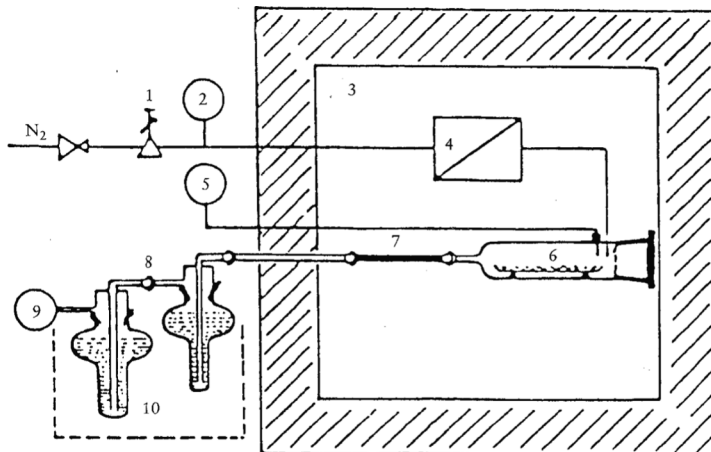
Príklad prietokového systému na stanovenie tlaku pary metódou plynnej saturácie



1. Regulátor toku
2. Výmenník tepla
3. Ihlové ventily
4. Snímač relatívnej vlhkosti
5. Saturačné kolóny
6. PTFE spojky
7. Prietokomer
8. Zachytávač
9. Olejový zachytávač
10. Fritová prebublávačka

Obrázok 6b

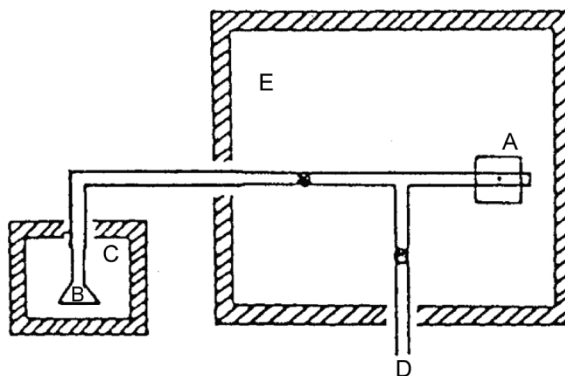
Príklad systému na stanovenie tlaku pary plynou saturáčnou metódou s kapilárou umiestnenou v slede za saturáčnou komorou



1. Teplotný hmotnostný prietokomer	6. Plyná saturáčna komora
2. Tlakomer, manometer	7. Kapilára
3. Komora s teplotnou reguláciou	8. Absorpčné nádoby
4. Termostatová cievka pre nosný plyn	9. Plynomer
5. Teplomer (Pt 100)	10. Chladený zachytávač

Obrázok 7

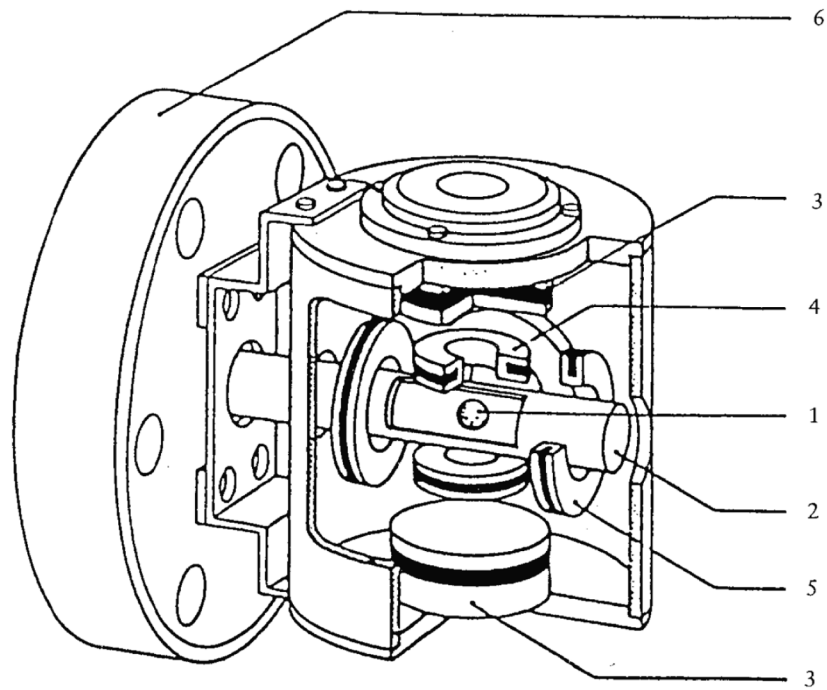
Príklad potrubného systému pre metódu rotujúcej guľôčky



- Prístroj na meranie tlaku pary
- A. Snímacia hlava rotujúceho rotora
 - B. Komôrka s testovanou vzorkou
 - C. Termostat
 - D. Podtlaková rúrka (turbočerpadlo)
 - E. Vzduchový termostat

Obrázok 8

Príklad meracej hlavy rotujúceho rotora



1. Gulička
2. Vákuová rúrková extenzia spojovej príruby
3. Permanentné magnety
4. Cievky (2) pre vertikálnu stabilizáciu
5. Vodiace cievky (4)
6. Spojková príruha

A.5. POVRCHOVÉ NAPÄTIE

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1). Základné princípy sú uvedené v odkaze (2).

1.1. ÚVOD

Opísané metódy sú určené na meranie povrchového napätia vodných roztokov.

Pred vykonaním týchto testov sa odporúča získať predbežné informácie o rozpustnosti vo vode, hydrolyznych vlastnostiach a kritickej koncentrácii pre tvorbu micel testovanej látky.

Nasledujúce uvedené metódy sa dajú použiť pre väčšinu chemikálií bez akýchkoľvek obmedzení v spojitosti s ich stupňom čistoty.

Meranie povrchového napätia metódou krúžkového tenzometra sa obmedzuje na vodné roztoky s dynamickou viskozitou nižšou ako približne 200 mPa s.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Entalpia voľnej hladiny na jednotku povrchovej plochy sa vzťahuje na povrchové napätie.

Povrchové napätie sa udáva ako:

N/m (jednotka SI) alebo

mN/m (podjednotka SI)

1 N/m = 10³ dyn/cm

1 N/m = 1 dyn/cm v zastaranej jednotkovej sústave cgs

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nemusia byť použité vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Referenčné látky, ktoré pokrývajú široký rozsah povrchových napätí, sú uvedené v odkazoch (1) a (3).

1.4. PRINCÍP METÓD

Metódy sú založené na meraní maximálnej sily, ktorá musí byť vynaložená vertikálne na strmienok alebo krúžok v kontakte s hladinou testovanej kvapaliny umiestnenej v meracej miske na účely jeho oddelenia od tejto hladiny alebo na doštičku s jednou hranou v kontakte s povrchom na účely zdvihnutia filmu, ktorý sa vytvoril.

Látky, ktoré sú rozpustné vo vode pri koncentrácii aspoň 1 mg/l, sú testované vo vodnom roztoku pri jednej koncentrácii.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Tieto metódy sa dajú realizovať s väčšou presnosťou, než aká sa pravdepodobne bude požadovať na environmentálne zhodnocovanie.

1.6. OPIS METÓD

Roztok testovanej látky sa pripraví v destilovanej vode. Koncentrácia tohto roztoku by mala predstavovať 90 % nasýtenej rozpustnosti testovanej látky vo vode; keď táto koncentrácia prevyšuje 1 g/l, na účely testovania sa použije koncentrácia 1 g/l. Látky s rozpustnosťou vo vode nižšou ako 1 mg/l sa nemusia testovať.

1.6.1. Doštičková metóda

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.2. Strmienková metóda

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.3. Krúžková metóda

Pozri technické normy ISO 304 a NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films) (Povrchovo aktívne činidlá – stanovenie povrchového napätia pomocou kvapalinových filmov).

1.6.4. Harmonizovaná krúžková metóda podľa OECD**1.6.4.1. Prístroje**

Na účely tohto merania postačujú komerčne dostupné tenzometre. Pozostávajú z nasledujúcich častí:

- pohyblivá doska na vzorky,
- systém na meranie sily,
- meracie teleso (krúžok),
- meracia nádoba.

1.6.4.1.1. Pohyblivá doska na vzorky

Pohyblivá doska na vzorky sa používa ako podložka pod termoregulovanú meraciu nádobu obsahujúcu kvapalinu určenú na testovanie. Spolu s meracím systémom je prichytená na stojan.

1.6.4.1.2. Systém na meranie sily

Systém na meranie sily (pozrite obrázok) je umiestnený nad dosku na vzorky. Odchýlka merania sily nemá presahovať hodnotu $\pm 10^{-6}$ N, zodpovedajúc tak dovolenej chybe $\pm 0,1$ mg pri meraní hmotnosti. Vo väčšine prípadov je meracia stupnica komerčne dostupných tenzometrov kalibrovaná v mN/m, takže povrchové napätie môže byť odčítané priamo v mN/m s presnosťou na 0,1 mN/m.

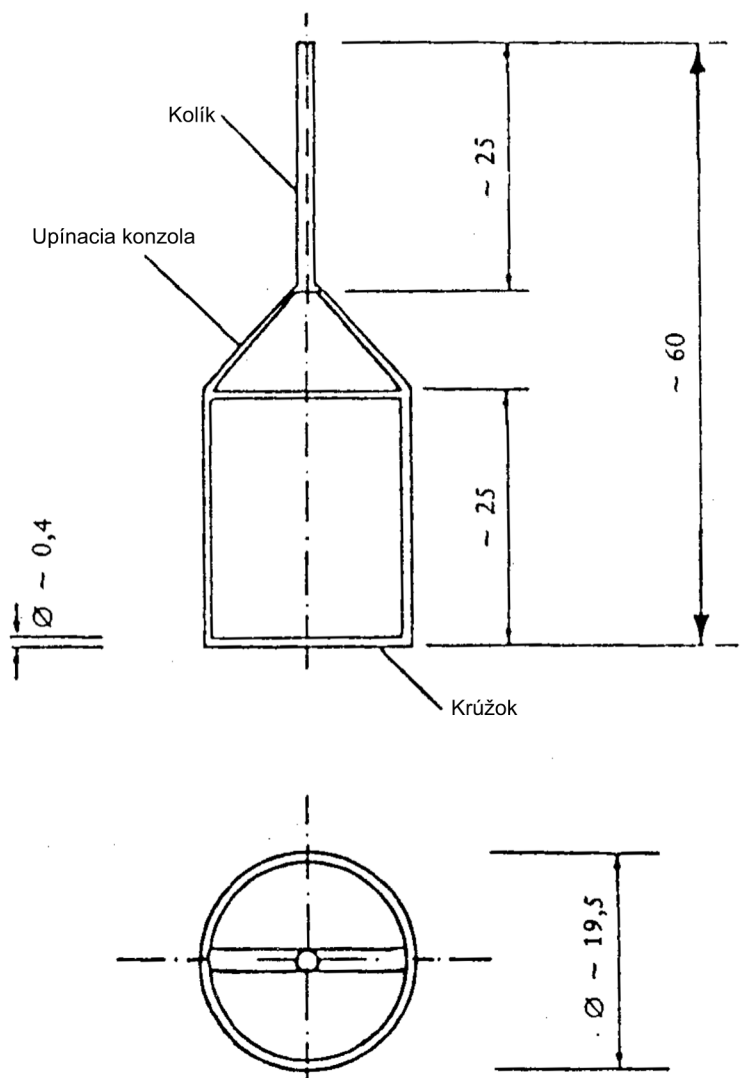
1.6.4.1.3. Meracie teleso (krúžok)

Krúžok je zvyčajne vyrobený z platino-irídiového drôtu s hrúbkou približne 0,4 mm a so stredným obvodom 60 mm. Drôtený krúžok je zavesený horizontálne na kovový kolík a drôtenú upínaciu konzolu, aby sa tak vytvorilo prepojenie so systémom na meranie sily (pozri obrázok).

Obrázok

Meracie teleso (krúžok)

(Všetky rozmery sú vyjadrené v milimetroch)

**1.6.4.1.4. Meracia nádoba**

Meracia nádoba určená pre testovanú látku musí byť termoregulovaná sklená nádoba. Musí mať také vlastnosti, aby počas merania teplota testovaného kvapalinového roztoku a plynová fáza nad jeho povrchom zostali konštantné a aby sa testovaná vzorka nemohla odparovať. Vyhovujúce sú valcovité sklené nádoby s vnútorným priemerom najmenej 45 mm.

1.6.4.2. Príprava prístroja**1.6.4.2.1. Čistenie**

Sklené nádoby musia byť dôkladne vyčistené. Ak je to potrebné, musia sa umyť horúcou kyselinou chrómsírovou a následne sirupovitou kyselinou fosforečnou (83 až 98 hmotnostných % H_3PO_4), dôkladne opláchnuť pod vodou z vodovodu a nakoniec umyť v dvakrát destilovanej vode, až kým sa nedosiahne neutrálna reakcia, a potom sa musia osušiť alebo vymyť časťou kvapalnej vzorky určenej na testovanie, resp. meranie.

Krúžok sa musí najprv dôkladne opláchnuť vo vode, aby sa odstránili všetky látky, ktoré sú rozpustné vo vode, potom sa krátko ponorí do kyseliny chrómsírovej, umyje v dvakrát destilovanej vode, až kým sa nedosiahne neutrálna reakcia, a nakoniec sa krátko ohreje nad metanolovým plameňom.

Upozornenie:

Kontaminácia látkami, ktoré sa nerozpustili alebo nerozrušili kyselinou chrómsírovou alebo kyselinou fosforečnou, ako napríklad silikónmi, sa musí odstrániť pomocou vhodného organického rozpúšťadla.

1.6.4.2.2. Kalibrácia prístroja

Kalibrácia prístroja spočíva v kontrole nulového bodu a jeho nastavení takým spôsobom, aby označenie prístroja umožňovalo spoľahlivé stanovenie hodnôt v mN/m.

Inštalácia:

Prístroj musí byť vyvážený napríklad pomocou liehovej vodováhy na tenzometrovej základni nastavovacími skrutkami umiestnenými naspodku základovej platne.

Nastavenie nulového bodu:

Po inštalácii krúžku na prístroj a pred jeho ponorením do kyseliny musí byť ukazovateľ tenzometra nastavený na nulu a musí sa skontrolovať, či je krúžok rovnobežný s hladinou kvapaliny. Na tento účel možno použiť hladinu kvapaliny ako zrkadlo.

Kalibrácie:

Vlastná testová kalibrácia sa môže uskutočniť jedným z týchto dvoch postupov:

- a) použitím závažia: postup používajúci závažia známej hmotnosti medzi 0,1 g a 1,0 g umiestnené na krúžku. Kalibračná konštanta (konštanta pri ciachovaní), Φ_a , ktorou musia byť vynásobené všetky hodnoty odčítané na inštrumente, sa stanoví podľa rovnice (1):

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

kde:

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

m = hmotnosť závažia (g)

g = gravitačné zrýchlenie (981 cm s⁻² pri hladine mora)

b = stredný obvod krúžku (cm)

σ_a = údaj na stupnici tenzometra po umiestnení závažia na krúžok (mN/m);

- b) použitím vody: postup používajúci čistú vodu, ktorej povrchové napätie sa napríklad pri teplote 23 °C rovná 72,3 mN/m. Tento postup sa dá uskutočniť rýchlejšie ako hmotnostná kalibrácia, len je tu stále riziko, že povrchové napätie vody bude skreslené stopami kontaminácie povrchovo aktívnymi činidlami.

Kalibračná konštanta, Φ_b , ktorou musia byť vynásobené všetky údaje odčítané na prístroji, sa stanoví podľa rovnice (2):

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

kde:

σ_o = hodnota citovaná v literatúre pre povrchové napätie vody (mN/m)

σ_g = nameraná hodnota povrchového napätia vody (mN/m) obidve hodnoty pri tej istej teplote.

1.6.4.3. Príprava vzoriek

Pri príprave vodných roztokov látok určených na testovanie treba použiť požadované koncentrácie vo vode, pričom roztoky nesmú obsahovať žiadne nerozpustené látky.

Roztok sa musí udržiavať pri konštantnej teplote ($\pm 0,5$ °C). Keďže povrchové napätie roztoku sa v meracej nádobe mení v priebehu času, treba uskutočniť viacero meraní v rozličných časoch, ako aj vynášať hodnoty vo forme krivky diagramu ako funkcie času. Keď sa ďalšie zmeny už neobjavia, dosiahol sa rovnovážny stav.

Prach a plynová kontaminácia inými látkami rušivo pôsobia na výsledky meraní. Celý postup sa preto uskutoční pod ochranným krytom.

1.6.5. Podmienky skúšania

Meranie sa musí uskutočniť pri teplote približne 20 °C a táto teplota sa udržiava v rozmedzí $\pm 0,5$ °C.

1.6.6. Realizácia testu

Roztoky určené na meranie treba premiestniť do dôkladne očistenej meracej nádoby, pričom treba dbať na to, aby sa zabránilo peneniu. Meracia nádoba sa potom položí na dosku prístroja. Dosku potom treba dvíhať až dovtedy, kým sa krúžok neponorí pod hladinu roztoku určeného na meranie. Doska sa potom pozvoľna a rovnomerne spúšťa nadol (rýchlosťou približne 0,5 cm/min), akoby sme krúžok chceli oddeliť od hladiny kvapaliny, a to až dovtedy, kým sa nedosiahne maximálna sila. Vrstva kvapaliny prilipnutá ku krúžku sa však od neho nesmie oddeliť. Po ukončení merania treba krúžok opäť ponoriť pod hladinu a merania sa takto opakujú až dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná hodnota povrchového napätia. Čas, ktorý uplynul od premiestnenia testovaného roztoku do meracej nádoby, sa musí zaznamenať pre každé jedno stanovenie. Hodnoty sa odčítajú vždy pri maximálnej sile vyvinutej pri snahe o oddelenie krúžku od povrchu hladiny kvapaliny.

2. ÚDAJE

Na výpočet povrchového napätia sa hodnota odčítaná v mN/m zo stupnice prístroja najprv vynásobí kalibračným koeficientom Φ_a alebo Φ_b (v závislosti od použitého kalibračného postupu). Takto získame hodnotu, ktorá je iba približná, a vyžaduje si preto korekciu.

Harkins a Jordan (4) empiricky stanovili korekčné koeficienty pre hodnoty povrchového napätia meraného krúžkovou metódou, ktoré sú závislé od rozmerov krúžku, hustoty testovanej kvapaliny a od jej povrchového napätia.

Keďže je veľmi ťažké stanoviť korekčný koeficient pre každé jedno samostatné meranie z Harkinsonových a Jordanových tabuliek, na účely výpočtu povrchového napätia vodných roztokov možno použiť zjednodušený postup odčítania korekčných hodnôt povrchového napätia priamo z tabuľky. (Na odčítanie v rozmedzí tabuľkových hodnôt treba použiť interpoláciu.)

Tabuľka

Korekcia nameraného povrchového napätia

Platí iba pre vodné roztoky, $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

r	= 9,55 mm (stredný polomer krúžku)	
r	= 0,185 mm (polomer drôtu, z ktorého je krúžok zhotovený)	
Experimentálna hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrácia závažiami [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. a)]	Kalibrácia vodou [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1

Experimentálna hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrácia závažiami [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. a)]	Kalibrácia vodou [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. b)]
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
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	—

Táto tabuľka bola zostavená na základe Harkinsovej-Jordanovej korekcie. Je podobná tabuľke uvedenej v technickej norme DIN Standard (DIN 53914) pre vodu a vodné roztoky (hustota $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$) a je vhodná pre komerčne dostupný krúžok s rozmermi $R = 9,55 \text{ mm}$ (stredný polomer krúžku) a $r = 0,185 \text{ mm}$ (polomer drôtu, z ktorého je krúžok zhotovený). Tabuľka udáva korigované hodnoty pre merania povrchového napätia vykonané po kalibrácii závažiami alebo vodou.

Alternatívne, bez predchádzajúcej kalibrácie, sa povrchové napätie môže vypočítať podľa tohto vzorca:

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

kde:

F = sila nameraná na dynamometri v bode prerušenia filmu

R = polomer krúžku

f = korekčný (opravný) koeficient (1)

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- použitú metódu,
- typ použitej vody alebo roztoku,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- výsledky merania: povrchové napätie (hodnoty odčítané zo stupnice) uvádzajúce jednotlivé samostatné odčítania hodnôt a ich aritmetický priemer, ako aj korigované stredné hodnoty (zohľadňujúce koeficient zariadenia a korekčnú tabuľku),
- koncentráciu roztoku,
- testovaciu teplotu,
- vek použitého roztoku, obzvlášť čas medzi prípravou a meraním roztoku,
- opis časovej závislosti povrchového napätia po premiestnení roztoku do meracej nádoby,
- všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímеси a fyzikálneho skupenstva testovanej látky.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Za predpokladu, že destilovaná voda má povrchové napätie 72,75 mN/m pri teplote 20 °C, látky prejavujúce povrchové napätie nižšie ako 60 mN/m za podmienok tejto metódy treba považovať za povrchovo aktívne materiály.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, Vol. I, Part I, Chapter XIV.
- (3) Pure Appl. Chem., 1976, vol. 48, 511.
- (4) Harkins, W. D., Jordan, H. F., J. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

A.6. ROZPUSTNOSŤ VO VODE

1. METÓDA

Opísané metódy sú upravené smernicou na vykonávanie OECD testov (1).

1.1. ÚVOD

Na účely realizácie tejto metódy sa odporúča získať predbežné informácie o štruktúrnom vzorci, tlaku pary, disociačnej konštante a hydrolyze (ako funkcie pH) látky určenej na testovanie.

Neexistuje jediná dostupná metóda, ktorá by pokrývala celý rozsah rozpustnosti vo vode.

Dve skúšobné metódy, ktoré sú opísané v nasledujúcom texte, pokrývajú síce celý rozsah rozpustnosti, avšak nedajú sa použiť v prípade prchavých látok:

- jedna, ktorá sa vzťahuje na absolútne čisté látky s nízkou rozpustnosťou ($< 10^{-2}$ gramov na liter), ktoré sú stabilné vo vode, sa nazýva „metóda vypierania z kolóny“;
- druhá, ktorá sa vzťahuje na absolútne čisté látky s vyššou rozpustnosťou ($> 10^{-2}$ gramov na liter), ktoré sú stabilné vo vode, sa nazýva „banková metóda“.

Rozpustnosť látok vo vode môže byť do značnej miery ovplyvnená prítomnosťou prímiesí.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozpustnosť látky vo vode je špecifikovaná saturačnou hmotnostnou koncentráciou látky vo vode pri danej teplote. Rozpustnosť vo vode je špecifikovaná v jednotkách hmotnosti na objem roztoku. Príslušnou jednotkou SI je kg/m^3 (možno však použiť aj g/l).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Približné množstvo testovanej vzorky a čas potrebný na dosiahnutie saturačnej hmotnostnej koncentrácie sa stanoví v jednoduchom predbežnom teste.

1.4.1. Metóda vypierania z kolóny

Táto metóda je založená na vypieraní testovanej látky vodou z mikrokolóny, ktorá je naplnená inertným nosným materiálom, napr. sklenenými guľôčkami alebo pieskom. Tento nosný materiál je pokrytý nadbytkom testovanej látky. Rozpustnosť vo vode sa stanovuje vtedy, keď je hmotnostná koncentrácia eluátu konštantná. Vyjadruje sa úrovňou koncentrácie ako funkcia času.

1.4.2. Banková metóda

V rámci tejto metódy sa testovaná látka (tuhé látky musia byť rozomleté na prach) rozpustí vo vode pri teplote o niečo vyššej, ako je testovacia teplota. Keď sa dosiahne saturácia, zmes sa ochladí a udržiava sa pri skúšobnej teplote, pričom sa mieša dovtedy, kým je to potrebné na dosiahnutie rovnovážneho stavu. Meranie sa môže alternatívne uskutočniť priamo pri skúšobnej teplote, ak sa vhodným vzorkovaním zabezpečí, že sa dosiahne saturačný rovnovážny stav. Následne sa hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnom roztoku, ktorý nesmie obsahovať žiadne nerozpustené častice, stanoví vhodnou analytickou metódou.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. **Opakovateľnosť**

V prípade metódy vypierania z kolóny možno dosiahnuť < 30 %, v prípade bankovej metódy by sa malo dodržiavať < 15 %.

1.5.2. **Citlivosť**

Citlivosť závisí od metódy analýzy, avšak stanovenia hmotnostnej koncentrácie môžu byť stanovované až do 10^{-6} gramov na liter.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Podmienky skúšania**

Odporúča sa uskutočniť test pri teplote 20 °C s výkyvom maximálne $\pm 0,5$ °C. Ak sa v spojitosti s rozpustnosťou považuje za možnú teplotná závislosť (> 3 % na každý jeden °C), mali by sa použiť dve ďalšie teploty minimálne 10 °C nad a pod hodnotou pôvodne zvolenej teploty. V tomto prípade by teplotná regulácia mala byť $\pm 0,1$ °C. Zvolená teplota by sa mala udržiavať na konštantnej úrovni vo všetkých relevantných častiach skúšobného zariadenia.

1.6.2. **Predbežný test**

K približne 0,1 g testovanej vzorky (tuhé látky musia byť rozdrvené na prach) v ciachovanom odmernom valci so zabrušenou sklenenou zátkou sa pridávajú narastajúce objemy destilovanej vody pri teplote miestnosti podľa krokov uvedených v tejto tabuľke:

0,1 g rozpustiteľná v „x“ ml vody	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Približná rozpust- nosť (g/l)	> 1 000	1 000 až 200	200 až 100	100 až 50	50 až 10	10 až 1	< 1

Po každom pridaní stanoveného množstva vody sa zmes intenzívne trepe 10 minút a vizuálne sa skontroluje z hľadiska akýchkoľvek nerozpustených častí testovanej vzorky. Ak po pridaní 10 ml vody testovaná vzorka alebo jej časti zostanú nerozpustené, pokus sa musí zopakovať v 100 ml odmernom valci s väčším objemom vody. Pri nižších mierach rozpustnosti môže byť čas potrebný na rozpustenie testovanej látky podstatne dlhší (treba počítať minimálne s 24 hodinami). Približná rozpustnosť je uvedená v tabuľke pod tým objemom pridanej vody, v ktorom dôjde k úplnému rozpusteniu testovanej vzorky. Ak je testovaná vzorka naďalej zjavne nerozpustná, treba predĺžiť čas na rozpustenie z 24 hodín na maximálne 96 hodín alebo treba pokračovať v zriedovaní, aby sa zistilo, ktorú metódu použiť, či metódu vypierania z kolóny, alebo metódu rozpúšťania v banke (fľaši).

1.6.3. **Metóda vypierania z kolóny**1.6.3.1. *Nosný materiál, rozpúšťadlo a eluent*

Nosný materiál pre metódu vypierania z kolóny musí byť inertný. Vhodné použiteľné materiály sú sklené guľôčky a piesok. Na nanosenie testovanej látky na nosný materiál treba použiť vhodné prchavé rozpúšťadlo kvality analytického činidla. Ako eluent sa použije voda, ktorá bola dvakrát destilovaná v sklenom alebo kremennom destilačnom prístroji.

Upozornenie:

Nesmie byť použitá voda pochádzajúca priamo z výmenníka organických iónov.

1.6.3.2. *Aplikácia testovanej látky na nosný materiál*

Odváži sa približne 600 mg nosného materiálu a tento sa potom premiestni do 50 ml banky s guľatým dnom.

Vhodné odvážené množstvo testovanej látky sa rozpustí vo zvolenom rozpúšťadle. Primerané množstvo tohto roztoku sa pridá do nosného materiálu. Rozpúšťadlo sa musí úplne odpariť napr. v rotačnom odparovacom prístroji, pretože inak sa nedosiahne saturácia nosiča vodou kvôli separačným účinkom na povrchu nosného materiálu.

Aplikácia testovanej látky na nosný materiál môže spôsobovať problémy (chybné výsledky), ak sa testovaná látka nanáša ako olej alebo odlišná kryštalická fáza. Problém treba experimentálne preskúmať a podrobnosti musia byť uvedené v správe o teste.

Nosný materiál s aplikovanou testovanou látkou sa nechá máčať približne v 5 ml vody asi dve hodiny. Suspenzia sa potom pridá do mikrokolóny. Suchý nosný materiál s aplikovanou testovanou látkou sa môže alternatívne pridať do mikrokolóny, ktorá bola naplnená vodou, a potom vyvažovať približne dve hodiny.

Testovací postup:

Vypieranie testovanej látky z nosného materiálu sa môže uskutočniť jedným z dvoch odlišných uvedených spôsobov:

- recirkulačným čerpadlom (pozri obrázok 1),
- egalizačnou nádobou (pozri obrázok 4).

1.6.3.3. Metóda vypierania z kolóny s recirkulačným čerpadlom

Prístroje

Schematická zostava typického systému je znázornená na obrázku 1. Vhodná mikrokolóna je znázornená na obrázku 2, hoci akceptovateľná je akákoľvek veľkosť za predpokladu, že bude spĺňať kritériá reprodukovateľnosti a citlivosti. V kolóne musí byť voľný priestor zodpovedajúci minimálne piatim úložným objemom vody a samotná musí byť schopná pojať minimálne päť vzoriek. Veľkosť sa môže alternatívne redukovať, ak sa použije doplnkové riedidlo ako náhrada za počiatočných päť úložných objemov vody vypustených zo systému spolu s rozpustenými prísadami.

Kolóna musí byť napojená na recirkulačné čerpadlo, ktoré je schopné regulovať tok približne 25 ml/h. Čerpadlo je pripojené polytetrafluóretylénom (P.T.F.E.), resp. sklenými spojkami. Kolóna a čerpadlo musia po zostavení zabezpečiť vzorkovanie výtoku a vyváženie voľného priestoru pri atmosférickom tlaku. Materiál v kolóne spočíva na malom tesnení (5 mm) zo sklenej vaty (vlňy), ktoré zároveň slúži na filtráciu čistočiek. Recirkulačné čerpadlo môže byť napríklad peristaltické čerpadlo alebo membránové čerpadlo (musí sa dbať na to, aby sa zabránilo akejkoľvek kontaminácii, resp. absorpcii materiálom, z ktorého sú zhotovené rúrky).

Postup merania

Spustí sa prúdenie cez kolónu. Odporúča sa použiť prietok približne 25 ml/h (v prípade opisanej kolóny to zodpovedá 10 úložným objemom/h). Prvých päť úložných objemov (minimálne) sa vypustí s cieľom odstránenia prísad rozpustných vo vode. Po tomto sa recirkulačné čerpadlo nechá bežať až dovtedy, kým sa nedosiahne vyváženie definované piatimi za sebou nasledujúcimi vzorkami, ktorých koncentrácie sa nelíšia viac ako $\pm 30\%$ v náhodnom slede. Vzorky musia byť od seba oddelené časovými intervalmi zodpovedajúcimi prietoku najmenej 10 úložných objemov eluentu.

1.6.3.4. Metóda vypierania z kolóny s egalizačnou nádobou

Prístroje (pozri obrázky 3 a 4)

Egalizačná nádoba: Spojenie s egalizačnou nádobou sa uskutoční použitím zabrušeného skleneného spoja napojeného na polytetrafluóretylénové (P.T.F.E.) rúrky. Odporúča sa použiť prietok približne 25 ml za hodinu. Za sebou nasledujúce eluátové frakcie by sa potom mali zachytávať a analyzovať podľa zvolenej metódy.

Postup merania

Tie frakcie zo stredného eluátového rozsahu, v ktorých sú koncentrácie konštantné ($\pm 30\%$) minimálne v piatich následných frakciách, sa použijú na stanovenie rozpustnosti vo vode.

V oboch prípadoch (pri použití recirkulačného čerpadla alebo egalizačnej nádoby) je potrebné uskutočniť druhé kolo merania pri polovičnej miere prvého (pôvodného) prietoku. Ak sú výsledky oboch kôl meraní súhlasné, test bol uskutočnený na uspokojivej úrovni; ak sa však pri nižšom prietoku prejaví vyššia skutočne pozorovaná rozpustnosť, znižovanie miery prietoku na polovicu musí pokračovať dovtedy, kým dve za sebou nasledujúce kolá meraní nevykážu rovnakú rozpustnosť.

V obidvoch prípadoch (pri použití recirkulačného čerpadla alebo egalizačnej nádoby) sa musia frakcie kontrolovať z hľadiska prítomnosti koloidného materiálu skúmaním Tyndallovho efektu (rozptyl svetla). Prítomnosť takýchto častíc znehodnocuje výsledky a test sa musí zopakovať po zdokonalení postupu filtrácie v kolóne.

Je potrebné zaznamenať hodnoty pH pre každú vzorku. Druhé kolo meraní sa musí uskutočniť pri tej istej teplote ako prvé.

1.6.4. **Banková (fľašová) metóda**

1.6.4.1. *Prístroje*

Pri použití bankovej (fľašovej) metódy je potrebný tento materiál:

- normálne laboratórne sklené nádoby a vybavenie laboratórnymi prístrojmi,
- zariadenie vhodné na premiešavanie, resp. pretrepávanie, roztokov pri kontrolovaných a regulovaných konštantných teplotách,
- odstredivka (podľa možnosti termostatovaná), ak sa tak požaduje pri emulziách,
- zariadenie na analytické stanovenie hodnôt.

1.6.4.2. *Postup merania*

Množstvo materiálu potrebného na saturáciu želaného objemu vody sa odhaduje, resp. stanovuje, z predbežného testu. Požadovaný objem vody bude závisieť od použitej analytickej metódy a rozsahu rozpustnosti. Približne päťnásobok stanoveného množstva materiálu sa odváži do každej z troch sklených nádob vybavených sklenými zátkami (napr. do odstredivkových skúmaviek, sklených baniek). Do každej nádoby sa potom pridá zvolený objem vody a nádoby sa tesne uzatvoria. Uzavreté nádoby sa potom premiešavajú, resp. pretrepávajú, pri teplote 30 °C. (Odporúča sa použiť trepačku alebo miešačku schopnú fungovať pri konštantnej teplote, napr. magnetické miešadlo v termostaticky kontrolovanom a regulovanom vodnom kúpeli.) Po uplynutí jedného dňa sa jedna z nádob vyberie a ďalších 24 hodín sa opätovne vyváži pri skúšobnej teplote s občasným premiešaním, resp. pretrepaním. Obsah nádoby sa odstredí pri skúšobnej teplote a pomocou vhodnej analytickej metódy sa stanoví koncentrácia testovanej látky v čírej vodnej fáze. So zvyšnými dvoma bankami sa naloží podobne po počiatočnom vyvážení pri teplote 30 °C počas dvoch dní v prípade jednej a počas troch dní v prípade druhej. Ak výsledky koncentrácií aspoň z dvoch posledných nádob súhlasia s požadovanou reprodukovateľnosťou, výsledky testu sú uspokojivé. Ak výsledky z nádob 1, 2 a 3 prejavia tendenciu narastajúcich hodnôt, celý test sa musí zopakovať pri použití dlhších vyvažovacích časov.

Postup merania sa môže uskutočniť aj bez predchádzajúcej inkubácie pri teplote 30 °C. Na účely odhadu rýchlosti vzniku saturačnej rovnováhy sa vzorky odoberú, až keď už čas miešania neovplyvňuje koncentráciu testovaného roztoku.

Je potrebné zaznamenať hodnoty pH pre každú vzorku.

1.6.5. **Analýza**

Na účely týchto stanovení sa odporúča použiť špecifickú analytickú metódu pre príslušnú testovanú látku, pretože malé množstvá rozpustných prímiesí môžu spôsobiť veľké chyby v nameranej rozpustnosti. Príkladmi takýchto metód sú plynová alebo kvapalinová chromatografia, titračné metódy, fotometrické metódy, voltamperometrické metódy.

2. **ÚDAJE**

2.1. **METÓDA VYPIERANIA Z KOLÓNY**

Pre každé kolo meraní sa musí vypočítať stredná hodnota najmenej z piatich za sebou nasledujúcich vzoriek odobratých zo saturačnej úrovne, to isté platí aj o štandardnej odchýlke (smerodajnej odchýlke). Výsledky sa musia uvádzať v jednotkách hmotnosti na objem roztoku.

Porovnávajú sa stredné hodnoty vypočítané pre dva testy s použitím odlišných prietokov a mali by mať opakovateľnosť menšiu ako 30 %.

2.2. BANKOVÁ METÓDA

Pre každú z troch baniek musia byť uvedené samostatné výsledky, pričom tie výsledky, ktoré sa považujú za konštantné (opakovateľnosť menšia ako 15 %), treba spriemerovať a uviesť v jednotkách hmotnosti na objem roztoku. Tento postup si môže vyžadovať spätnú premenu hmotnostných jednotiek na objemové jednotky, používajúc hustotu, keď je rozpustnosť veľmi vysoká (> 100 g/l).

3. SPRÁVA

3.1. METÓDA VYPIERANIA Z KOLÓNY

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- výsledky predbežného testu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identitu a prímеси),
- samostatné hodnoty koncentrácií, prietokov a pH pre každú vzorku,
- stredné hodnoty a smerodajné odchýlky namerané najmenej pri piatich vzorkách zo saturačnej úrovne každého kola meraní,
- priemer dvoch za sebou nasledujúcich a akceptovateľných kôl meraní,
- teplotu vody počas saturačného procesu,
- použitú metódu analýzy,
- charakteristické vlastnosti použitého nosného materiálu,
- spôsob aplikácie testovanej látky na nosný materiál,
- druh použitého riedidla,
- dôkazy akejkoľvek nestálosti testovanej látky počas testu a príslušné použité metódy,
- všetky informácie dôležité pre interpretáciu výsledkov, najmä týkajúce sa prímеси a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

3.2. BANKOVÁ METÓDA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- výsledky predbežného testu,
- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- samostatné analytické stanovenia hodnôt a ich priemer v prípadoch, kde boli pre každú banku stanovené viaceré hodnoty,
- hodnotu pH osobitne pre každú vzorku,
- priemer hodnoty pre rozdielne banky, pri ktorých sa dosiahla súhlasnosť výsledkov,
- testovaciu teplotu,

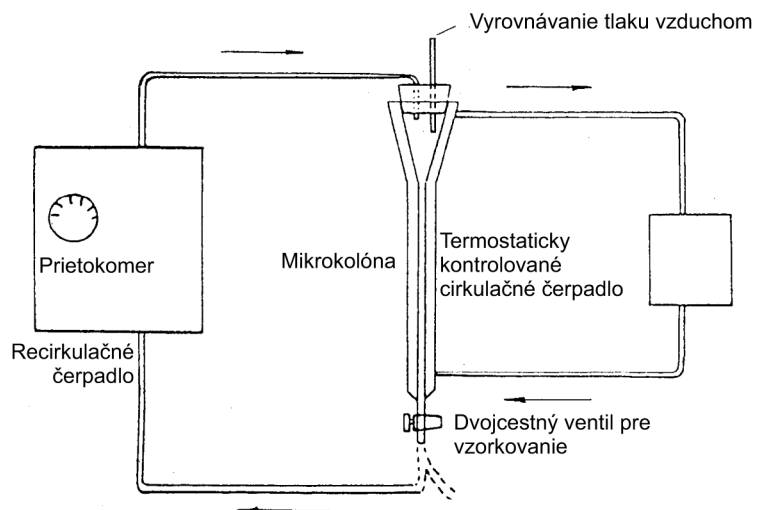
- použitú analytickú metódu,
- dôkazy o akejkoľvek nestálosti testovanej látky počas testu a príslušnú použitú metódu,
- všetky informácie dôležité pre interpretáciu výsledkov, najmä týkajúce sa prímiesí a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). 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) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

Dodatok

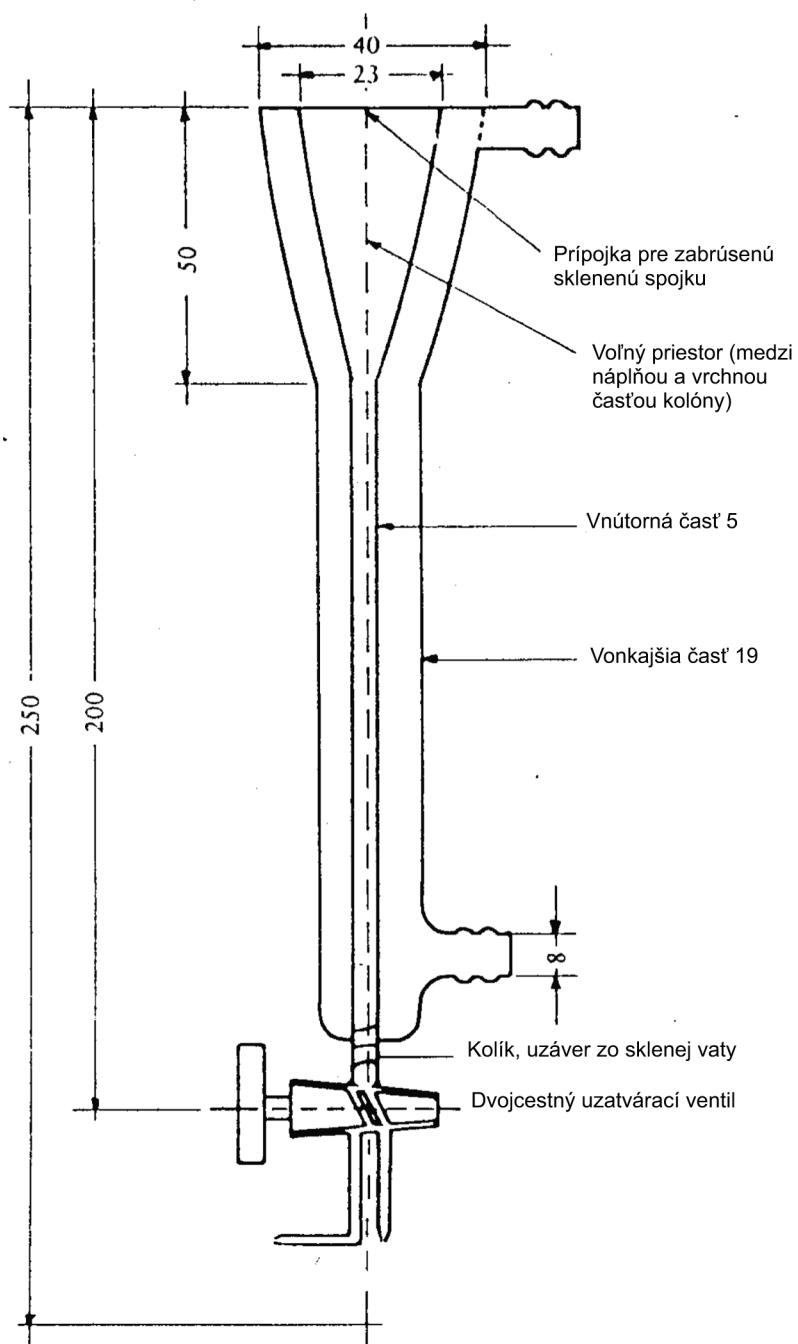
Obrázok 1

Metóda eluovania z kolóny s recirkulačným čerpadlom

Obrázok 2

Typická mikrokolóna

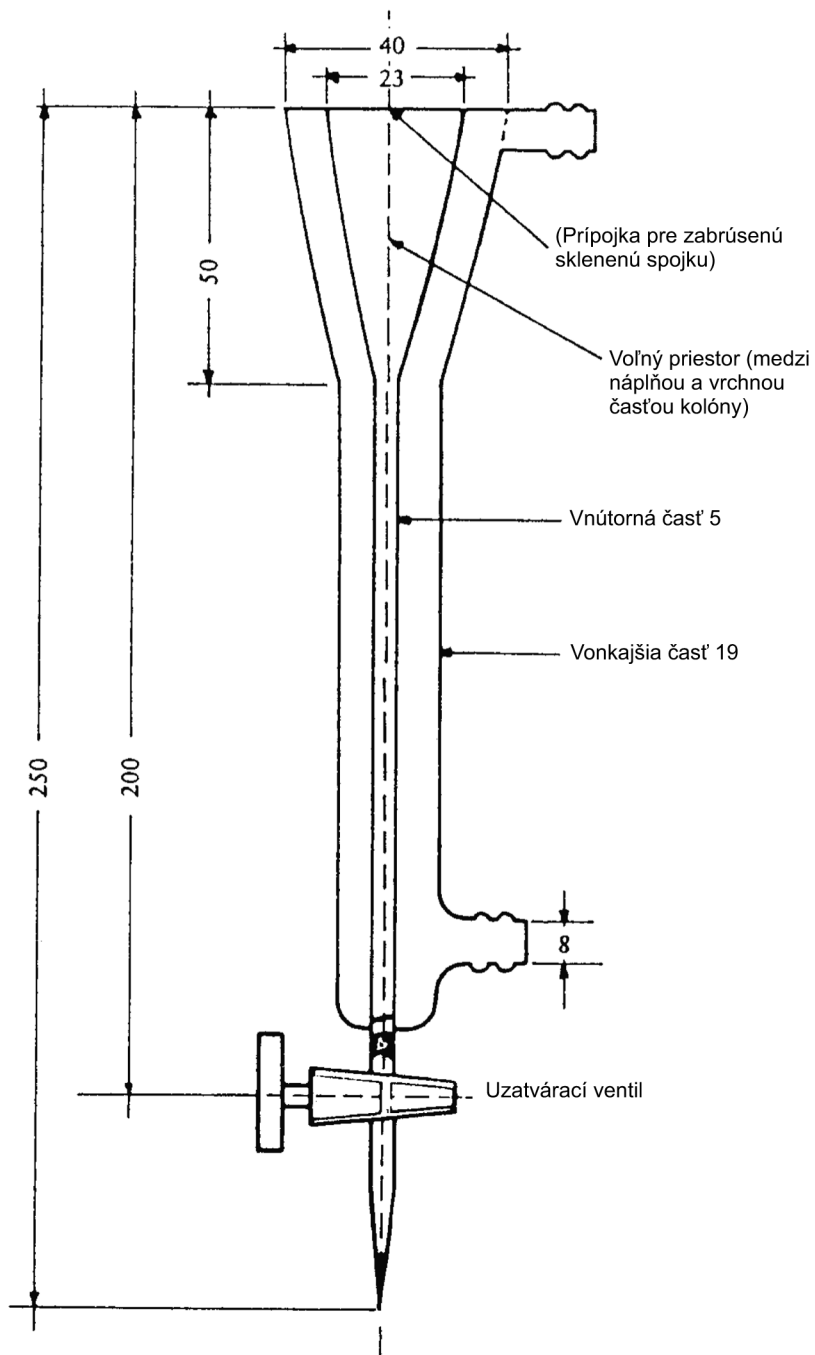
(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obrázok 3

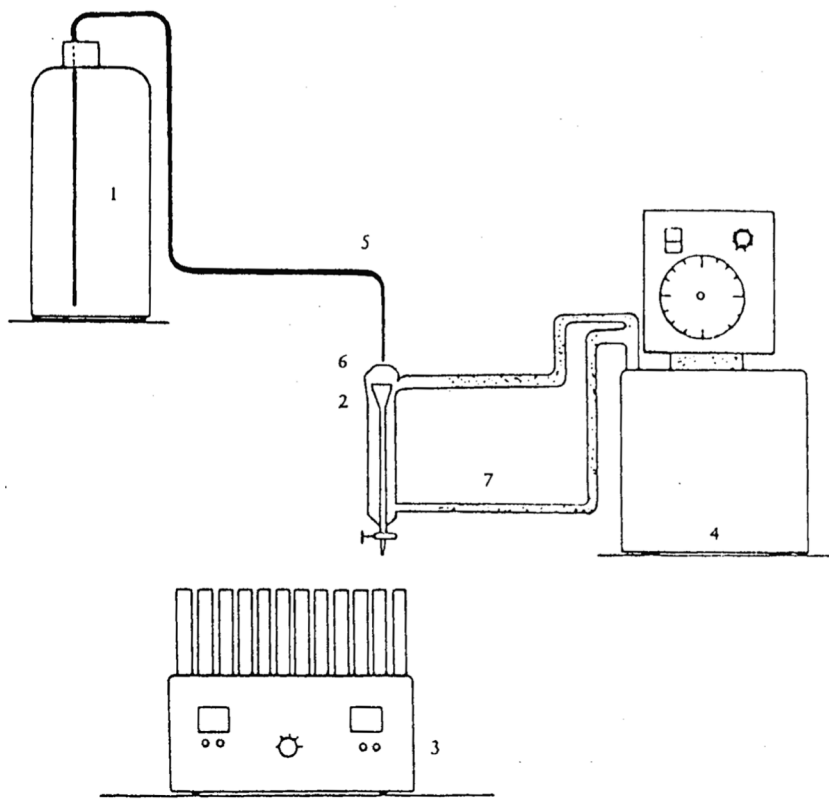
Typická mikrokolóna

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obrázok 4

Metóda eluovania z kolóny s egalizačnou nádobou



1 = Egalizačná nádoba (napr. 2,5 litrová banka)

2 = Kolóna (pozri obr. 3)

3 = Frakčný kolektor

4 = Termostat

5 = Teflónová rúrka (hadička)

6 = Zabrusená sklenená spojka

7 = Vodné potrubie (medzi termostatom a kolónou, s vnútorným priemerom približne 8 mm)

A.8. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT

1. METÓDA

Opísaná metóda „trepačkovej banky“ je upravená smernicou na vykonávanie testov OECD (1).

1.1. ÚVOD

Na účely realizácie tejto metódy sa odporúča získať predbežné informácie o štruktúrnom vzorci, disociačnej konstante, rozpustnosti vo vode, hydrolýze, rozpustnosti v n-oktanele a povrchovom napätí látky určenej na testovanie.

Merania na ionizovateľných testovaných látkach by sa mali realizovať iba v ich neionizovanej forme (voľná kyselina alebo voľná zásada) dosiahnutej použitím vhodného tlmivého roztoku s hodnotou pH minimálne o jednu jednotku pH pod (voľná kyselina) alebo nad (voľná zásada) hodnotou pH.

Táto testovacia metóda pozostáva z dvoch samostatných postupov: z metódy trepačkovej banky a vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC). Prvý z uvedených postupov sa dá aplikovať, keď hodnota $\log P_{ow}$ patrí do rozsahu od -2 do 4, a druhý, keď táto hodnota patrí do rozsahu od 0 do 6. Pred uskutočnením ktoréhokoľvek z uvedených postupov je potrebné najprv získať predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu.

Metóda trepačkovej banky sa dá použiť iba v prípade absolútne čistých testovaných látok rozpustných vo vode a n-oktanele. Nemožno ju uplatniť v prípade povrchovo aktívnych látok (pre ktoré treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na rozpustnosti vo vode a n-oktanele).

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) sa nedá použiť v prípade silných kyselín a zásad, polymetalických látok, povrchovo aktívnych látok alebo látok, ktoré reagujú s eluentom. Pre tieto materiály treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na rozpustnosti vo vode a n-oktanele.

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) je menej citlivá na prítomnosť prímiesí v testovanej látke alebo prípravku než metóda trepačkovej banky. Napriek tomu však prímiesi v niektorých prípadoch môžu značne skomplikovať interpretáciu výsledkov, pretože vrcholová špecifikácia sa stáva neistou. Pre zmesi, ktoré vykazujú nerozpustené pásмо, treba určiť vrchné a spodné medzné hodnoty $\log P$.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozdeľovací koeficient (P) je definovaný ako pomer rovnovážnych koncentrácií (c_i) rozpustenej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom z dvoch do značnej miery nezmiešateľných rozpúšťadiel. V prípade n-oktanolu a vody platí:

$$P_{ow} = \frac{c_{n-oktan-1-ol}}{c_{voda}}$$

Rozdeľovací koeficient (P) je preto kvocientom dvoch koncentrácií a udáva sa vo forme dekadického logaritmu ($\log P$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Metóda trepačkovej banky

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

Metóda HPLC

Na účely korelácie nameraných údajov HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie) príslušnej zlúčeniny s jej hodnotou P treba zostrojiť kalibračný graf údajov $\log P$ verus chromatografické údaje s použitím najmenej 6 referenčných bodov. Zostáva na užívateľovi, aby si zvolil príslušné vhodné referenčné látky. Vždy keď je to možné, najmenej jedna referenčná látka má mať hodnotu P_{ow} vyššiu než testovaná látka a iná zasa hodnotu P_{ow} nižšiu než testovaná látka. Pre hodnoty $\log P$ nižšie ako 4 môže byť kalibrácia založená na údajoch nadobudnutých v rámci metódy trepačkovej banky. Pre hodnoty $\log P$ vyššie ako 4 môže byť kalibrácia založená na literárnych údajoch s potvrdenou platnosťou, ak tieto súhlasia s vypočítanými hodnotami. Pre väčšiu presnosť sa odporúča radšej vybrať také referenčné látky, ktoré majú podobnú štruktúru ako príslušná testovaná látka.

Existujú obsiahle zoznamy hodnôt $\log P_{ow}$ pre mnohé skupiny chemických látok a prípravkov (2) (3). Ak údaje týkajúce sa rozdeľovacích koeficientov štruktúralne príbuzných látok nie sú dostupné, možno použiť všeobecnejšiu kalibráciu uskutočnenú s inými referenčnými látkami.

Zoznam odporúčaných referenčných látok a ich hodnoty P_{ow} sú uvedené v dodatku 2.

1.4. PRINCÍP METÓDY

1.4.1. Metóda trepačkovej banky

Na účely stanovenia rozdeľovacieho koeficientu musí byť dosiahnutá rovnováha medzi všetkými vzájomne pôsobiacimi zložkami systému a musia byť stanovené koncentrácie látok rozpustených v dvoch fázach. Štúdium odbornej literatúry týkajúcej sa tejto otázky ukazuje, že na vyriešenie problému dôkladného premiešania dvoch fáz s ich následnou separáciou na účely stanovenia rovnovážnej koncentrácie pre testovanú látku možno použiť viacero odlišných technických postupov.

1.4.2. Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)

Vysokoúčinnná kvapalinová chromatografia sa uskutočňuje na analytických kolónach naplnených komerčne dostupnou tuhrou fázou obsahujúcou dlhé uhlíkovodíkové reťazce (napr. C_8 , C_{18}), ktoré sú chemicky viazané na kremík. Látky injektované na takúto kolónu sa pohybujú pozdĺž nej rozdielnymi rýchlosťami, pretože dochádza k rozdielnym stupňom rozdeľovania medzi pohyblivú fázou a uhlíkovodíkovú nepohyblivú fázou. Zmesi látok sa vypierajú v poradí za sebou v závislosti od ich hydrofóbnosti, pričom látky rozpustné vo vode sa vypierajú ako prvé a látky rozpustné v oleji ako posledné, proporcionálne k ich rozdeľovaciemu koeficientu medzi uhlíkovodíkom a vodou. Toto umožňuje vytvorenie vzájomného vzťahu medzi dobou zdržania na takejto kolóne s reverznou fázou a rozdeľovacím koeficientom n-oktanol/voda. Rozdeľovací koeficient je odvodený z činiteľa využitia (kapacitného faktora) k , daného výrazom:

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

v ktorom t_r = doba zdržania (retencie) testovanej látky a t_o = priemerný čas, ktorý potrebuje molekula rozpúšťadla na to, aby prešla kolónou (nečinná doba).

Kvantitatívne analytické metódy sa nepožadujú a potrebné je iba stanovenie časov vypierania.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. Opakovateľnosť

Metóda trepačkovej banky

Na účely zaistenia presnosti rozdeľovacieho koeficientu je potrebné vykonať duplikátne stanovenia za troch odlišných skúšobných podmienok, pričom možno meniť množstvo špecifikovanej látky, ako aj pomer objemov rozpúšťadiel. Stanovené hodnoty rozdeľovacieho koeficientu vyjadrené ako ich dekadické (Briggsove) logaritmy musia patriť do rozsahu $\pm 0,3$ log jednotiek.

Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)

Na účely zvýšenia dôveryhodnosti merania sa musia uskutočniť duplikátne stanovenia. Hodnoty $\log P$ odvodené z jednotlivých meraní musia patriť do rozsahu $\pm 0,1$ log jednotiek.

1.5.2. Citlivosť

Metóda trepačkovej banky

Rozsah merania v rámci tejto metódy je určený možnosťou sledovania analytického postupu. Toto by malo umožniť stanovenie hodnôt $\log P_{ow}$ v rozmedzí od -2 do 4 (príležitostne, keď sú na to podmienky, toto rozmedzie môže byť rozšírené na $\log P_{ow}$ s hodnotou až 5), keď koncentrácia rozpustenej látky ani v jednej fáze nepresiahne hodnotu $0,01$ mol na jeden liter.

Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)

Metóda vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie umožňuje odhadovanie rozdeľovacích koeficientov v rozmedzí $\log P_{ow}$ od 0 do 6.

Za normálnych okolností možno rozdeľovací koeficient látky alebo prípravku odhadnúť s presnosťou na ± 1 log jednotku hodnoty v rámci metódy trepačkovej banky. Typické korelácie možno nájsť v odkazoch (4) (5) (6) (7) (8). Vyššia presnosť sa môže zvyčajne dosiahnuť vtedy, keď sú korelačné diagramy založené na štruktúrne príbuzných referenčných látkach (9).

1.5.3. Špecifickosť*Metóda trepačkovej banky*

Nernstov rozdeľovací zákon sa dá použiť iba pri konštantnej teplote, tlaku a hodnote pH pre zriedené roztoky. Uplatňuje sa výlučne pre čisté látky dispergované medzi dve čisté riedidlá. Ak sa v tom istom čase objavajú v jednej alebo oboch fázach viaceré odlišné rozpustené látky, môže to nepriaznivo ovplyvniť výsledky.

Disociácia alebo spájanie rozpustených molekúl má za následok odchýlky od Nernstovho rozdeľovacieho zákona. Takéto odchýlky sú naznačované skutočnosťou, že rozdeľovací koeficient sa stane závislý od koncentrácie roztoku.

Kvôli viacnásobným rovnovážnym stavom by sa táto testovacia metóda nemala aplikovať na ionizovateľné prípravky bez uplatnenia korekcie. V prípade takýchto prípravkov by sa malo uvažovať o použití tlmivých roztokov namiesto vody, pričom hodnota pH tlmivého roztoku by mala predstavovať minimálne jednu jednotku pH z pKa testovanej látky, a zároveň treba mať na pamäti závažnosť tejto hodnoty pH pre životné prostredie.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu**

Uprednostňuje sa odhad rozdeľovacieho koeficientu použitím výpočtovej metódy (dodatok 1) alebo, kde je to vhodné, z pomeru rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách (10).

1.6.2. Metóda trepačkovej banky**1.6.2.1. Príprava**

n-oktanol: stanovenie rozdeľovacieho koeficientu by sa malo uskutočniť s reagentom analytickej triedy vysokej čistoty.

Voda: použije sa voda destilovaná alebo dvakrát destilovaná v sklenom alebo kremennom destilačnom prístroji. V zdôvodnených prípadoch treba na ionizovateľné prípravky namiesto vody použiť tlmivé roztoky.

Upozornenie:

Nesmie sa používať voda odoberaná priamo z ionexu (vymieňača iónov).

1.6.2.1.1. Predsaturácia rozpúšťadiel

Predtým než sa stanoví rozdeľovací koeficient, fázy rozpúšťadlového systému sa vzájomne nasýtia trepaním pri teplote pokusu. Na tento účel je praktické pretrepávať dve veľké a vysoké fľaše s n-oktanolom analytickej triedy vysokej čistoty alebo s vodou, pričom každá musí obsahovať dostatočné množstvo druhého rozpúšťadla, počas 24 hodín na mechanickej trepačke a potom sa nechajú odstáť dostatočne dlhý čas na to, aby sa fázy od seba oddelili a aby sa dosiahol stav saturácie.

1.6.2.1.2. Príprava na test

Celý objem sústavy dvoch fáz by mal skoro úplne naplniť testovaciu nádobu. Toto pomôže zabrániť stratám materiálu následkom vyprchávania. Objemový pomer a množstvá látky, ktoré sa majú použiť, sú stanovené týmto:

— predbežným odhadom rozdeľovacieho koeficientu (pozri vyššie),

- minimálnym množstvom testovanej látky potrebným pre analytický postup a
- obmedzením maximálnej koncentrácie v každej fáze na 0,01 mol na liter.

Uskutočňujú sa tri testy. V prvom teste sa použije vypočítaný objemový pomer n-oktanolu k vode; v druhom teste sa tento pomer vydělí dvoma; a v treťom teste sa tento pomer vynásobí dvoma (napr. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Testovaná látka

V n-oktane predsaturovanom vodou sa pripraví základný zásobný roztok. Koncentrácia tohto základného zásobného roztoku musí byť presne stanovená ešte predtým, než sa použije na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu. Tento roztok by mal byť uskladnený v takých podmienkach, ktoré zaručia jeho stabilitu.

1.6.2.2. Podmienky skúšania

Testovacia teplota sa musí udržiavať na konštantnej úrovni (± 1 °C) a musí byť v rozmedzí od 20 °C do 25 °C.

1.6.2.3. Postup merania

1.6.2.3.1. Vytvorenie rozdeľovacej rovnováhy

Pre každú zo skúšobných podmienok treba pripraviť duplikátne skúšobné nádoby obsahujúce požadované, presne odmerané množstvá dvoch rozpúšťadiel spolu s potrebným množstvom základného zásobného roztoku.

Fázy n-oktanolu (n-oktanolové fázy) sa musia merať podľa objemu. Skúšobné nádoby treba buď umiestniť na vhodnú trepačku, alebo ich pretrepávať ručne. V prípade použitia odstredivkovej skúmavky spočíva odporúčaná metóda v rýchlom obrácaní skúmavky o 180 stupňov okolo jej priečnej osi tak, aby všetok zachytený vzduch vystúpil cez obidve fázy. Skúsenosti ukázali, že na vytvorenie rozdeľovacej rovnováhy zvyčajne postačí 50 takýchto obrátov. Na zabezpečenie želaného výsledku sa odporúča 100 obrátov v priebehu piatich minút.

1.6.2.3.2. Oddeľovanie fáz odstreďovaním

Keď je to potrebné, na účely oddelenia fáz by malo byť vykonané odstredenie zmesi. Tento úkon by sa mal uskutočniť v laboratórnej odstredivke s udržiavanou stálou teplotou miestnosti alebo v prípade, ak sa použije odstredivka bez tepelnej regulácie, odstredivkové skúmavky by mali byť ponechané pri skúšobnej teplote počas najmenej jednej hodiny pred začatím analýzy.

1.6.2.4. Analýza

Na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej látky v oboch fázach. Toto možno uskutočniť odobratím alikvotnej časti oboch fáz z každej skúmavky pre každú zo skúšobných podmienok a ich analyzovaním zvoleným postupom. Celkové množstvo látky prítomné v oboch fázach treba vypočítať a porovnať s množstvom látky, ktoré sa pôvodne použilo.

Vodná fáza by sa mala vzorkovať takým postupom, ktorý by minimalizoval riziko prítomnosti stopových množstiev n-oktanolu: na odber vzorky z vodnej fázy sa môže použiť sklená injekčná striekačka s oddeliteľnou ihlou. Injekčná striekačka by mala byť spočiatku čiastočne naplnená vzduchom. Počas prenikania ihly cez vrstvu n-oktanolu treba mierne vypudzovať vzduch z injekčnej striekačky. Potom sa do striekačky naberie primeraný objem vodnej fázy. Striekačka sa rýchlym pohybom vytiahne z roztoku a ihla sa odstráni. Obsah striekačky potom možno použiť ako vodnú vzorku. Koncentrácia v oboch odstredení oddelených fázach by sa podľa možnosti mala stanoviť metódou špecifickou pre príslušnú testovanú látku. Príklady analytických metód, ktoré tu možno použiť, sú:

- fotometrické metódy,
- plynová chromatografia,
- vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC).

1.6.3. Metóda HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie)**1.6.3.1. Príprava***Prístroje*

Požaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený impulzovým čerpadlom a vhodným zariadením na detekciu. Odporúča sa použitie vstrekovacieho ventilu so vstrekovacími slučkami. Prítomnosť polárnych skupín v nepohyblivej fáze môže vážne narušiť fungovanie kolóny vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Z toho dôvodu by mali stacionárne fázy obsahovať minimálne percento polárnych skupín (11). Možno použiť aj komerčné mikročasticové náplne so spätnou fázou alebo kolóny s hotovou náplňou. Medzi vstrekovací systém a analytickú kolónu sa môže umiestniť ochranná kolóna.

Pohyblivá fáza

Na prípravu elučného rozpúšťadla, ktoré treba pred použitím odplyniť, sa použije metanol kvalitatívnej triedy HPLC a voda kvalitatívnej triedy HPLC. Treba použiť izokratické vypieranie. Ďalej treba použiť pomery metanolu a vody s minimálnym obsahom vody 25 %. Na vypieranie prípravkov s hodnotou log P 6 v priebehu jednej hodiny pri prietoku 1 ml za minútu postačí typický pomer zmesi metanolu a vody 3:1 (v/v). Pre prípravky s vysokým log P môže byť potrebné skrátiť čas vypierania (ako aj časy referenčných látok) znížením polaritu pohyblivej fázy alebo skrátením dĺžky kolóny.

Látky s veľmi nízkou rozpustnosťou v n-oktane majú pri použití metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie tendenciu vykazovať abnormálne nízke hodnoty log P_{ow} , pričom zóny takýchto prípravkov sa niekedy spájajú s čelom rozpúšťadla. Toto pravdepodobne vyplýva zo skutočnosti, že rozdeľovací proces je príliš pomalý na to, aby dosiahol rovnovážny stav v čase potrebnom za normálnych okolností v rámci separácie metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie. Na dosiahnutie spoľahlivej hodnoty môže byť potom účinné zníženie prietoku, resp. zmenšenie pomeru metanolu a vody.

Testované a referenčné látky by mali byť rozpustné v pohyblivej fáze v dostatočných koncentráciách, aby sa umožnila ich detekcia. Iba vo výnimočných prípadoch sa môžu so zmesou metanolu a vody použiť aj aditíva, pretože tieto menia vlastnosti kolóny. V prípade chromatografu s aditívami je povinné použiť samostatnú kolónu toho istého typu. Ak zmes metanolu a vody nie je vhodná, môžu sa použiť iné zmesi organického rozpúšťadla a vody, napr. zmes etanolu a vody alebo acetonitrilu (nitrilu kyseliny etánovej) a vody.

Hodnota pH eluentu je kritická pre ionizovateľné látky. Tieto hodnoty musia patriť do operačného rozmedzia pH kolóny, ktoré leží zvyčajne medzi hodnotami 2 až 8. Odporúča sa pufrovanie. Treba dbať na to, aby sa zabránilo zrážaniu solí a poškodeniu kolóny, ku ktorým dochádza v prípade použitia niektorých organických zmesí fázy a pufra. Merania metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s nepohyblivými fázami na báze kremíka s hodnotami pH nad 8 sa neodporúčajú, pretože použitie alkalickéj pohyblivej fázy môže zapríčiniť rýchle poškodenie funkčnosti kolóny.

Rozpustené látky

Referenčné látky sa musia vyznačovať maximálnou možnou čistotou. Ak je to možné, látky alebo prípravky určené na použitie v rámci testu alebo kalibrácie sú rozpustené v pohyblivej fáze.

Podmienky skúšania

Teplota počas merania by sa nemala meniť v rozsahu väčšom ako ± 2 K (kelvin).

1.6.3.2. Meranie*Výpočet nečinnnej doby t_0*

Nečinnná doba t_0 môže byť stanovená použitím buď homologického radu (napr. n-alkylmetylových ketónov), alebo nezadržaných, resp. neeluovaných, organických látok alebo prípravkov (napr. tiomočoviny alebo formamidu, amidu kyseliny metánovej). Na výpočet nečinnnej doby t_0 s použitím homologického radu sa injektuje najmenej sedem členov homologického radu a stanovia sa príslušné doby zdržania. Prvotné (nespracované) doby zdržania $t_{r(n_c + 1)}$ sú graficky znázornené v diagrame ako funkcia $t_{r(n_c)}$ a stanovený je úsek a a sklon b regresnej rovnice:

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

(kde n_c = počet atómov uhlíka). Nečinnná doba t_0 je potom daná vzťahom:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

Kalibračný graf

Ďalším krokom postupu je zostrojenie korelačného diagramu hodnôt $\log k$ verzus $\log P$ pre príslušné referenčné látky. V praktickom postupe sa súčasne vstreknú súbory piatich až desiatich štandardných referenčných látok, ktorých hodnota $\log P$ sa nachádza v blízkosti predpokladaného rozmedzia, a stanoví sa doba zdržania, podľa možnosti na záznamovej integračnej jednotke napojenej na detekčný systém. Zodpovedajúce logaritmy kapacitných faktorov $\log k$ sa vypočítajú a nanesú do diagramu ako funkcia $\log P$ stanovenou metódou trepačkovej banky. Kalibrácia sa uskutočňuje v pravidelných časových intervaloch, a to najmenej raz denne, aby sa tak dali vziať do úvahy možné zmeny v činnosti kolóny.

Stanovenie kapacitného faktora testovanej látky

Testovaná látka sa vstreknú do čo najmenšieho možného množstva mobilnej fázy. Stanoví sa (duplikátne) doba zdržania, čo umožní výpočet kapacitného faktora k . Z korelačného grafu referenčných látok sa dá interpolovať rozdeľovací koeficient testovanej látky. Pre veľmi nízke a veľmi vysoké rozdeľovacie koeficienty je potrebná extrapolácia. V takýchto prípadoch treba dávať mimoriadny pozor na hranice významnosti regresnej čiary.

2. ÚDAJE*Metóda trepačkovej banky*

Spôľahlivosť stanovených hodnôt P sa môže overiť porovnaním stredných hodnôt duplikátnych stanovení s celkovou strednou hodnotou.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímiesi),
- keď sa dané metódy nedajú uplatniť (napr. povrchovo aktívny materiál), treba zabezpečiť vypočítanú hodnotu alebo odhad založený na jednotlivých rozpustnostiach v *n*-oktane a vo vode,
- všetky informácie a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov testu, najmä týkajúce sa prímiesi a fyzikálneho skupenstva (stavu) testovanej látky.

V prípade metódy trepačkovej banky:

- výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,
- teplotu, pri ktorej sa hodnoty stanovovali,
- údaje o analytických postupoch uplatnených pri stanovovaní koncentrácií,
- čas a rýchlosť odstredovania, ak sa použilo,
- namerané koncentrácie v oboch fázach pre každé stanovenie (to znamená, že dohromady sa uvedú hodnoty 12 koncentrácií),
- hmotnosť testovanej látky, objem každej fázy použitý v každej skúšobnej nádobe a celkové vypočítané množstvo testovanej látky prítomné v každej fáze po vyvážení (po dosiahnutí rovnovážneho stavu),
- vypočítané hodnoty rozdeľovacieho koeficientu (P) a stredná hodnota musia byť uvedené pre každú sériu skúšobných podmienok, ako aj stredné hodnoty pre všetky stanovenia. Ak existujú náznaky závislosti rozdeľovacieho koeficientu od koncentrácie, táto skutočnosť sa musí taktiež uviesť v správe,
- v správe sa musí uviesť smerodajná odchýlka jednotlivých hodnôt P od ich strednej hodnoty,

- stredná hodnota P zo všetkých stanovení sa musí tiež vyjadriť ako jej logaritmus (základ 10),
- vypočítanú teoretickú hodnotu P_{ow} , keď bola táto hodnota stanovená alebo keď je nameraná hodnota $> 10^4$,
- hodnotu pH použitej vody a vodnej fázy počas pokusu,
- ak boli použité tlmivé roztoky, tak zdôvodnenie použitia tlmivých roztokov namiesto vody, ďalej zloženie, koncentráciu a hodnoty pH tlmivých roztokov, hodnotu pH vodnej fázy pred uskutočnením pokusu a po jeho ukončení.

V prípade metódy HPLC (vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie):

- výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,
- testované a referenčné látky a ich čistotu,
- teplotné rozmedzie jednotlivých stanovení,
- hodnoty pH, pri ktorých sa stanovenia vykonali,
- podrobnosti o analytickej a ochrannej kolóne, pohyblivej (mobilnej) fáze a detekčných prostriedkoch,
- retenčné údaje a hodnoty $\log P$ z odbornej literatúry pre referenčné látky použité v rámci kalibrácie,
- podrobnosti o zodpovedajúcej regresnej čiare ($\log k$ verzus $\log P$),
- priemerné retenčné údaje a interpolovanú hodnotu P pre testovanú látku alebo prípravok,
- opis zariadenia a prevádzkových, resp. pracovných, podmienok,
- eluačné profily,
- množstvá testovaných a referenčných látok zavedených do kolóny,
- nečinnú dobu a spôsob, akým sa merala.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) C. Hansch and A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.
- (3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A. J. Leo, dir.) – Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College Claremont, California 91711.
- (4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygård, 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 Laboratoriumspraxis* (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223 – 339.
- (11) R. F. Rekker and H. M. de Kort, *Euro. J. Med. Chem.*, 1979, vol. 14, 479.
- (12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, *Partition coefficients and their uses. Chem. Rev.*, 1971, vol. 71, 525.
- (13) R. F. Rekker, *The Hydrophobic Fragmental Constant*, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- (14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.
- (15) C. V. Eadsforth and P. Moser, *Chemosphere*, 1983, vol. 12, 1459.
- (16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, *Chem. Rev.*, 1971, vol. 71, 525.
- (17) C. Hansch, A. Leo, S. H. Unger, K. H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien, *J. Med. Chem.*, 1973, vol. 16, 1207.
- (18) W. B. Neely, D. R. Branson and G. E. Blau, *Environ. Sci. Technol.*, 1974, vol. 8, 1113.
- (19) D. S. Brown and E. W. Flagg, *J. Environ. Qual.*, 1981, vol. 10, 382.
- (20) J. K. Seydel and K. J. Schaper, *Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen*. Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.
- (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.

Dodatok 1

Výpočtové/odhadové metódy**ÚVOD**

Všeobecný úvod k výpočtovým metódam, údaje a príklady sú uvedené v publikácii Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Vypočítané hodnoty P_{ow} sa môžu použiť týmito spôsobmi:

- na rozhodnutie o tom, ktorá z experimentálnych metód je vhodná (rozmedzie pri metóde trepačkovej banky: $\log P_{ow}$: – 2 až 4, rozmedzie pri metóde HPLC: $\log P_{ow}$: 0 až 6),
- na voľbu vhodných testových podmienok (napr. referenčných látok pre postupy HPLC, objemového pomeru n-oktanolu a vody pre metódu trepačkovej banky),
- ako laboratórna vnútorná (interná) kontrola z hľadiska výskytu možných chýb v pokusoch,
- na umožnenie odhadu hodnôt P_{ow} v prípadoch, kde sa nemôžu použiť experimentálne metódy z technických dôvodov.

ODHADOVÁ METÓDA

Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu

Hodnota rozdeľovacieho koeficientu sa môže odhadnúť použitím rozpustností testovanej látky v čistých rozpúšťadlách:

$$P_{odhad} = \frac{\text{nasýtenie } c_{n\text{-oktanol}}}{\text{nasýtenie } c_{voda}}$$

VÝPOČTOVÉ METÓDY

Princíp výpočtových metód

Všetky výpočtové metódy sú založené na formálnom triedení molekuly na vhodné subštruktúry, pre ktoré sú známe spoľahlivé prírastky hodnoty $\log P_{ow}$. Hodnota $\log P_{ow}$ celej molekuly sa potom vypočíta ako súčet jej zodpovedajúcich čiastkových hodnôt plus súčet korekčných členov pre vnútromolekulové interakcie.

Zoznamy fragmentových konštánt a korekčných členov sú uvedené v odkazoch (b) (c) (d) (e). Niektoré z nich sa pravidelne aktualizujú (b).

Kritériá kvality

Spoľahlivosť výpočtovej metódy vo všeobecnosti klesá s narastajúcou komplexnosťou skúmanej látky alebo prípravku. V prípade jednoduchých molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou a jednej alebo dvoch funkčných skupín možno predpokladať odchýlku 0,1 až 0,3 jednotiek $\log P_{ow}$ medzi výsledkami rozličných fragmentačných metód a nameranou hodnotou. V prípade komplexnejších molekúl môžu byť hranice chyby väčšie. Bude to závisieť od spoľahlivosti a dostupnosti fragmentových konštánt, ako aj od schopnosti rozoznať vnútromolekulové interakcie (napr. vodíkové väzby) a správneho použitia korekčných členov (problém je jednoduchší pri použití počítačového softvéru CLOGP-3) (b). V prípade ionizujúcich prípravkov je dôležité správne zohľadnenie náboja alebo stupňa ionizácie.

Postupy výpočtov

Hanschova π -metóda

Pôvodná hydrofóbná substituenčná konštanta, π , ktorú zaviedol Fujita a kol. (f), je definovaná ako:

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

kde $P_{ow}(\text{PhX})$ je rozdeľovací koeficient aromatického derivátu a $P_{ow}(\text{PhH})$ je rozdeľovací koeficient pôvodnej látky alebo prípravku

$$(\text{napr. } \pi_{\text{Cl}} = \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71).$$

Podľa tejto definície je metóda π (π -metóda) použiteľná predovšetkým na aromatickú substitúciu. Hodnoty π pre väčší počet substituentov boli zostavené do tabuľky (b) (c) (d). Používajú sa na výpočet hodnoty $\log P_{ow}$ pre aromatické molekuly alebo subštruktúry.

Rekkerova metóda

Podľa Rekkera (g) sa hodnota $\log P_{ow}$ vypočíta týmto spôsobom:

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

kde f_i predstavuje konštanty rozdielnych molekulových fragmentov a a_i frekvenciu ich výskytu v skúmanej molekule. Korekčné členy môžu byť vyjadrené ako integrálny (celý) násobok jednej jedinej konštanty C_m (tzv. „magickej konštanty“). Fragmentové konštanty f_i a C_m boli stanovené zo zoznamu 1 054 experimentálnych hodnôt P_{ow} (825 prípravkov) použitím zloženej regresnej analýzy (c) (h). Stanovenie interakčných členov sa vykonáva podľa stanovených pravidiel opísaných v odkazoch (e) (h) (i).

Hanschova-Leova metóda

Podľa Hanscha a Lea (c) sa hodnota $\log P_{ow}$ vypočíta z tohto vzťahu:

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

kde f_i predstavuje konštanty rozdielnych molekulových fragmentov, F_j korekčné členy a a_i, b_j príslušné frekvencie výskytu. Deriváciou z pokusných hodnôt P_{ow} bol metódou pokusov a chýb stanovený zoznam atómových a skupinových fragmentových hodnôt a zoznam korekčných členov F (tzv. „faktorov“). Korekčné členy boli usporiadané do niekoľkých rozdielnych tried (a) (c). Je relatívne komplikované a náročné načas zohľadniť všetky pravidlá a korekčné členy. Vyvinuté boli rôzne súbory programov (b).

Kombinovaná metóda

Výpočet hodnoty $\log P_{ow}$ komplexných molekúl sa dá do značnej miery zdokonaľiť, ak sa molekula rozdelí na väčšie subštruktúry, pre ktoré existujú spoľahlivé hodnoty $\log P_{ow}$, a to buď z tabuliek (b) (c), alebo z vlastných meraní príslušného laboratória. Takéto fragmenty (napr. heterocykly, antrachinón, azobenzén) sa potom môžu kombinovať s Hanschovými hodnotami π alebo s Rekkerovými, alebo Leovými fragmentovými konštantami.

Poznámky

- Výpočtové metódy sa dajú použiť iba pre čiastočne alebo úplne ionizované prípravky, keď možno vziať do úvahy potrebné korekčné faktory.
- Ak možno predpokladať vnútromolekulové väzby, je potrebné prirábať zodpovedajúci korekčný člen (približne + 0,6 až + 1,0 $\log P_{ow}$ jednotiek). Indikácie týkajúce sa prítomnosti takýchto väzieb možno získať zo stereomodelov príslušnej molekuly alebo zo spektroskopických údajov o nej.
- Ak sú možné viaceré tautomérmé formy, za základ výpočtu by sa mala použiť najpravdepodobnejšia forma.

- iv) Je potrebné pozorne sledovať všetky úpravy, resp. revidované vydania, zoznamov fragmentových konštánt.

Správa

Ak sa použijú výpočtové alebo odhadové metódy, potom správa z testu obsahuje nasledujúce informácie:

- opis testovanej látky (zmes, prímеси atď.),
- indikácie (údaje) týkajúce sa všetkých možných vnútromolekulových vodíkových väzieb, disociácií, nábojov a všetkých ostatných nezvyčajných efektov (napr. tautomérie),
- opis použitej výpočtovej metódy,
- identifikáciu alebo spôsob zásobovania databázy,
- zvláštnosti vo výbere (voľbe) fragmentov,
- kompletnú dokumentáciu výpočtov.

ODKAZY

- (a) W. J. Lyman, W. F. Reehl and D. H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.
- (b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (c) C. Hansch, A. J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- (d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- (e) R. F. Rekker, H. M. de Kort, Eur. J. Med. Chem.-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, Pharmacochimistry Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.
- (h) C. V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.
- (i) R. A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

Dodatok 2

Odporúčané referenčné látky pre metódu HPLC

Číslo	Referenčná látka	log P _{ow}	pK _a
1	2-butanón	0,3	
2	4acetylpyridín	0,5	
3	anilín	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	4-metoxyfenol	1,3	pK _a = 10,26
7	kyselina fenoxycetová	1,4	pK _a = 3,12
8	fenol	1,5	pK _a = 9,92
9	2,4-dinitrofenol	1,5	pK _a = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenylacetonitril	1,6	
12	4-metylbenzylalkohol	1,6	
13	acetofenón	1,7	
14	2-nitrofenol	1,8	pK _a = 7,17
15	kyselina 3-nitrobenzoová	1,8	pK _a = 3,47
16	4-chlóranilín	1,8	pK _a = 4,15
17	nitrobenzén	1,9	
18	3-fenylpropán-2-ol	1,9	
19	kyselina benzoová	1,9	pK _a = 4,19
20	p-krezol	1,9	pK _a = 10,17
21	kyselina škoricová	2,1	pK _a = 3,89 cis 4,44 trans
22	anizol	2,1	
23	metylbenzoát	2,1	
24	benzén	2,1	
25	kyselina 3-metylbenzoová	2,4	pK _a = 4,27
26	4-chlórfenol	2,4	pK _a = 9,1
27	trichlóretylén	2,4	
28	atrazín	2,6	
29	etylbenzoát	2,6	
30	2,6-dichlórbenzonitril	2,6	
31	kyselina 3-chlórbenzoová	2,7	pK _a = 3,82
32	toluén	2,7	
33	naftalénol	2,7	pK _a = 9,34
34	2,3-dichlóranilín	2,8	
35	chlórbenzén	2,8	
36	allylfenyléter	2,9	
37	brómbenzén	3,0	
38	etylbenzén	3,2	
39	benzofenón	3,2	
40	4-fenylfenol	3,2	pK _a = 9,54
41	tymol	3,3	

Číslo	Referenčná látka	log P _{ow}	pK _a
42	1,4dichlórbenzén	3,4	
43	difenylamín	3,4	pK _a = 0,79
44	naftalén	3,6	
45	fenylbenzoát	3,6	
46	izopropylbenzén	3,7	
47	2,4,6trichlórfenol	3,7	pK _a = 6
48	bifenyľ	4,0	
49	benzylbenzoát	4,0	
50	2,4dinitro6sekbutylienol	4,1	
51	1,2,4 trichlórbenzén	4,2	
52	kyselina dodekánová	4,2	
53	difenyléter	4,2	
54	nbutylbenzén	4,5	
55	fenantrén	4,5	
56	fluorantén	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6difenylpyridín	4,9	
59	trifenylamín	5,7	
60	DDT	6,2	
Iné referenčné látky s nízkou log P _{ow} látky s nízkou hodnotou log P _{ow}			
1	kyselina nikotínová	- 0,07	

A.9. TEPLOTA VZPLANUTIA

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Odporúča sa získať predbežné informácie o zápalnosti, resp. horľavosti, látky ešte pred uskutočnením tohto testu. Postup testu sa dá aplikovať na kvapalné látky, ktorých pary môžu byť zapálené zapáľovacími zdrojmi. Skúšobné metódy uvedené v tomto texte sú spoľahlivé iba pre rozmedzia teploty vzplanutia, ktoré sú špecifikované v jednotlivých metódach.

Pri voľbe metódy, ktorá sa má použiť, by sa malo uvážiť, či nemôže dôjsť k chemickým reakciám medzi látkou a nosičom vzorky.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota vzplanutia je najnižšia teplota korigovaná na tlak 101,325 kPa, pri ktorej kvapalina uvoľňuje pary, za podmienok definovaných v skúšobnej metóde v takom množstve, že v skúšobnej nádobe sa vytvorí zápalná (horľavá) zmes pár a vzduchu.

Jednotky: °C

$$t = T - 273,15$$

(t v °C a T v K)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa nemusia použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová chemická látka. V prvom rade slúžia na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Látka sa umiestni do skúšobnej nádoby a zohrieva sa na testovaciu teplotu podľa postupu opísaného v príslušnej skúšobnej metóde. Zápalné (horľavé) pokusy sa uskutočňujú na účely zistenia, či testovaná vzorka pri počiatkovej teplote vzplanie, alebo nie.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. Opakovateľnosť

Opakovateľnosť sa mení v závislosti od rozmedzia teploty vzplanutia a od použitej skúšobnej metódy; maximum 2 °C.

1.5.2. Citlivosť

Citlivosť závisí od použitej skúšobnej metódy.

1.5.3. Špecifickosť

Špecifickosť niektorých skúšobných metód je obmedzená na určité rozmedzia teploty vzplanutia a je závislá od údajov týkajúcich sa vlastností testovanej látky (napr. vysoká viskozita).

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. Príprava

Vzorka príslušnej testovanej látky sa umiestni do skúšobného prístroja podľa 1.6.3.1 a/alebo 1.6.3.2.

Kvôli bezpečnosti sa odporúča, aby sa pre látky s vysokou energiou alebo pre jedovaté látky použila metóda, v rámci ktorej sa testujú iba vzorky s malým objemom, približne 2 cm³.

1.6.2. Podmienky skúšania

Ak to zodpovedá bezpečnostným predpisom, prístroj sa postaví na miesto, kde nie je vystavený prievanu.

1.6.3. Realizácia testu**1.6.3.1. Rovnovážna metóda**

Pozri technické normy ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. Nerovnovážna metóda

Abelov prístroj:

Pozri technické normy BS 2000, časť 170, NF M 07-011, NF T 66-009.

Abelov-Penskyho prístroj:

Pozri technické normy EN 57, DIN 51755 časť 1 (pre teploty od 5 °C do 65 °C), DIN 51755 časť 2 (pre teploty pod 5 °C), NF M07-036.

Tagov prístroj:

Pozri technickú normu ASTM D 56.

Penskyho-Martensov prístroj:

Pozri technické normy ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 NF M07-019.

Poznámky:

Ak sa zistí, že teplota vzplanutia stanovená nerovnovážnou metódou uvedenou v 1.6.3.2 je $0\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ alebo $55\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, mala by byť potvrdená rovnovážnou metódou pri použití toho istého prístroja.

Na oznamovanie sa smú použiť iba tie metódy, ktoré sú schopné vyvinúť teplotu vzplanutia predmetnej testovanej látky.

Na stanovenie teploty vzplanutia viskózných kvapalín (farbív, živíc a podobných látok) obsahujúcich rozpúšťadlá sa smú použiť iba prístroje a skúšobné metódy vhodné na stanovovanie teploty vzplanutia viskózných kvapalín.

Pozri technické normy ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 časť 1.

2. ÚDAJE**3. SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- treba uviesť použitú metódu, ako aj všetky prípadné odchýlky,
- výsledky a všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

Žiadne.

A.10. **HORLAVOSŤ (TUHÉ LÁTKY)**1. **METÓDA**1.1. **ÚVOD**

Pred realizáciou tohto testu sa odporúča získať predbežné informácie o potenciálne explozívnych vlastnostiach látky.

Tento test by sa mal použiť iba v prípade práškových, granulovaných alebo pastovitých látok.

Aby neboli zahrnuté všetky látky, ktoré môžu byť zapálené, ale iba tie, ktoré horia rýchlo, alebo tie, ktorých spôsob horenia je v každom prípade mimoriadne nebezpečný, za veľmi horľavé sa považujú iba tie látky, ktorých rýchlosť horenia presahuje určitú medznú hodnotu.

Môže byť mimoriadne nebezpečné, ak sa žeravenie šíri kovovým práškom, pretože je potom veľmi ťažké zhasiť oheň. Kovové prášky treba považovať za vysokohorľavé, ak podporujú šírenie žeravenia cez hmotu v priebehu stanoveného času.

1.2. **POJMY A JEDNOTKY**

Čas horenia je vyjadrený v sekundách.

1.3. **REFERENČNÉ LÁTKY**

Nie sú špecifikované.

1.4. **PRINCÍP METÓDY**

Látka sa sformuje do neprerušeneho prúžku alebo práškovej čiary v dĺžke asi 250 mm a uskutoční sa predbežný skríningový test na stanovenie toho, či po zapálení plameňom plynového horáka dôjde k šíreniu horenia plameňom alebo tlením. Ak dôjde k šíreniu po dĺžke čiary aspoň 200 mm v priebehu stanoveného času, uskutoční sa následne kompletný testový program na stanovenie rýchlosti horenia.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Nie sú stanovené.

1.6. **OPIS METÓDY**1.6.1. **Predbežný skríningový test**

Látka sa sformuje do neprerušeneho prúžku alebo práškovej čiary v dĺžke asi 250 mm, so šírkou 20 mm a hrúbkou 10 mm na nehorľavej (ohňovzdornej), nepórovitej podkladovej doske s nízkou tepelnou vodivosťou. K jednému koncu práškovej čiary sa priloží horúci plameň plynového horáka (s minimálnym priemerom 5 mm) a podrží sa, kým sa prášok nezapáli (nevznieti), alebo počas maximálne 2 minút (5 minút v prípade kovových práškov alebo práškov kovových zliatin). Treba sledovať, či sa horenie rozšíri po dĺžke 200 mm práškovej čiary v priebehu 4-minútovej testovej periódy (alebo 40-minútovej periódy v prípade kovových práškov). Ak sa látka nezapáli a spaľovanie sa nerozšíri buď horením plameňom, alebo tlením po dĺžke 200 mm práškovej čiary v priebehu 4-minútovej (alebo 40-minútovej) testovej periódy, príslušná testovaná látka sa nepovažuje za vysokohorľavú, v takom prípade sa nepožaduje jej ďalšie testovanie. Ak sa horenie látky rozšíri po 200 mm dĺžke práškovej čiary za čas kratší ako 4 minúty alebo za čas kratší ako 40 minút v prípade kovových práškov, treba uskutočniť postup uvedený v nasledujúcom texte (bod 1.6.2 a nasledujúce body).

1.6.2. **Test rýchlosti horenia**1.6.2.1. *Príprava*

Práškové alebo granulované testované látky sa zvolna nasypú do formy s dĺžkou 250 mm, s trojuholníkovitým prierezom, s vnútornou výškou 10 mm a šírkou 20 mm. Na oboch stranách formy sú v pozdĺžnom smere namontované dve kovové lišty, ktoré slúžia ako bočné ohraničenie a ktoré prečnievajú 2 mm ponad vrchný okraj trojuholníkovitého prierezu (pozri obrázok). Forma sa potom zdvihne do výšky 2 cm a trikrát za sebou sa pustí, aby dopadla na tvrdý podklad, čím sa prášok utrasie. Ak je to potrebné, forma sa znova doplní

práškom. Bočné kovové lišty sa potom odstránia a prebytočná testovaná látka (vo forme prášku) sa zhrnie. Na vrchnú stranu formy sa potom položí nehorľavá (ohňovzdorná), nepórovitá podkladová doska s nízkou tepelnou vodivosťou, prístroj sa obráti spodnou časťou navrch a forma sa odstráni.

Pastovité látky sa nanesú vo forme črievka s dĺžkou 250 mm a s prierezom s plochou približne 1 cm² na nehorľavú (ohňovzdornú), nepórovitú podkladovú dosku s nízkou tepelnou vodivosťou.

1.6.2.2. Podmienky skúšania

V prípade látky, ktorá je citlivá na vlhkosť, sa musí test uskutočniť v čo najkratšom čase po vyňatí látky z obalu.

1.6.2.3. Realizácia testu

Umiestnite hranicu z práškovej testovanej látky do digestora priečne na smer prúdenia vzduchu.

Rýchlosť prúdenia vzduchu musí byť dostatočná na to, aby sa zabránilo úniku spalín do ovzdušia laboratória, a počas testu by sa nemala meniť. Okolo prístroja by mala byť postavená protiprievanová zástena.

Hranica z práškovej testovanej látky sa na jednom konci zapáli pomocou horúceho plameňa plynového horáka (minimálny priemer 5 mm). Keď hranica prehorela vzdialenosť 80 mm, na úseku ďalších 100 mm sa zmeria rýchlosť horenia.

Test sa opakuje šesťkrát, pokiaľ sa pozitívny výsledok nezaregistroval už skôr, pričom zakaždým sa použije čistá a chladná podkladová doska.

2. ÚDAJE

Na vyhodnotenie je smerodajný čas horenia z predbežného skríningového testu (1.6.1) a najkratší čas horenia z maximálne šiestich opakovaní hlavného testu (1.6.2.3).

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- opis látky určenej na testovanie, jej fyzikálny stav vrátane obsahu vlhkosti,
- výsledky z predbežného skríningového testu a z testu rýchlosti horenia, ak sa tento test tiež uskutočnil,
- všetky doplňujúce poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

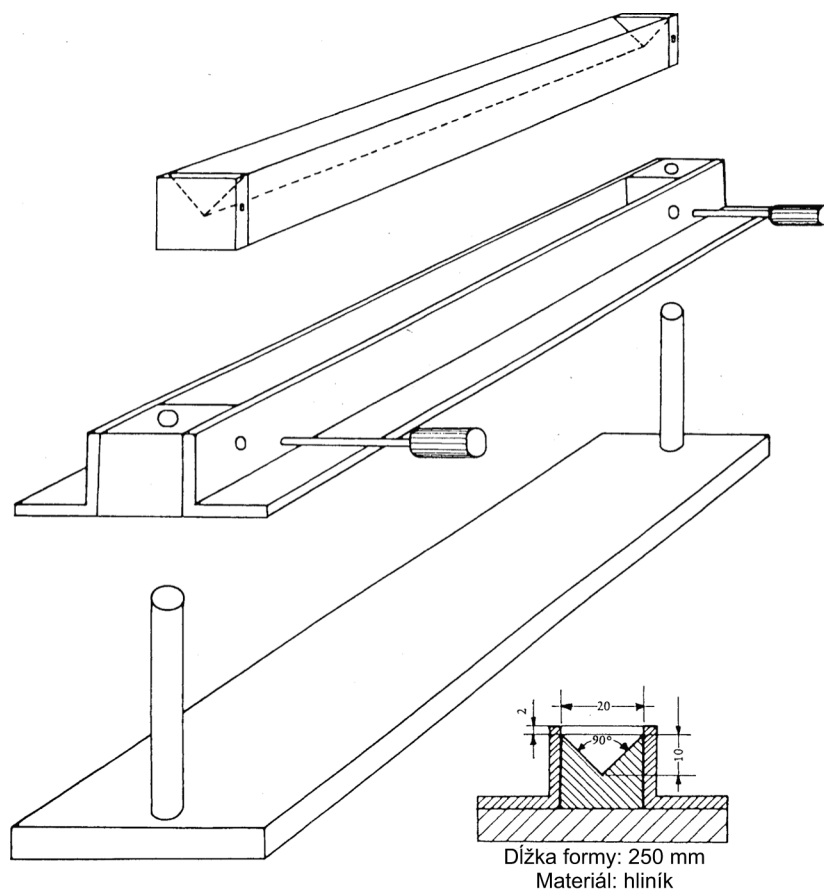
Práškovité, granulované alebo pastovité látky treba považovať za veľmi horľavé, ak čas horenia v každom teste uskutočnenom podľa skúšobného postupu opísaného v 1.6.2 je kratší ako 45 sekúnd. Kovové prášky alebo prášky kovových zliatin sa považujú za vysokohorľavé, keď sa dajú zapáliť a ak sa plameň alebo zóna reakcie rozšíri po celej dĺžke vzorky za 10 minút alebo za kratší čas.

4. ODKAZY

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

*Dodatok**Obrázok***Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z práškovitej testovanej látky**

(všetky rozmery sa uvádzajú v milimetroch)



A.11. HORLAVOSŤ (PLYNY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Táto metóda umožňuje stanovenie toho, či sú plyny zmiešané so vzduchom pri teplote miestnosti (približne 20 °C) a pri atmosférickom tlaku horľavé, a ak áno, v akom rozsahu koncentrácií. Zmesi s narastajúcimi koncentraciami plynu vo vzduchu sú vystavené elektrickej iskre a sleduje sa, či dôjde k zapáleniu (vzplanutiu).

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Rozsah zápalnosti je rozmedzie koncentrácie medzi dolnou a hornou medzou výbušnosti. Dolná a horná medza výbušnosti predstavuje tie medzné hodnoty koncentrácie horľavého plynu v prímеси so vzduchom, pri ktorých sa neobjavuje šírenie plameňa.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Koncentrácia plynu vo vzduchu sa postupne zvyšuje a zmes je vystavená pri každej koncentrácii elektrickej iskre.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. Prístroje

Testovacou nádobou je stĺpcovitý sklený valec s minimálnym vnútorným priemerom 50 mm a s minimálnou výškou 300 mm. Zapaľovacie elektródy sú oddelené vzdialenosťou 3 mm až 5 mm a sú umiestnené vo výške 60 mm nad dnom valca. Valec je vybavený otvorom na znižovanie tlaku. Prístroj musí byť chránený krytom, aby sa obmedzili akékoľvek škody spôsobené výbuchom.

Ako zapaľovací zdroj sa používa stojatá indukovaná iskra s 0,5-sekundovým trvaním, ktorá sa generuje z vysokonapäťového transformátora s výstupným koncovým napätím 10 až 15 kV (maximálny príkon 300 W). Príklad vhodného použiteľného prístroja je opísaný v odkazoch (2).

1.6.2. Podmienky skúšania

Test sa musí uskutočniť pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.3. Realizácia testu

S použitím dávkovacích čerpadiel sa do skleného valca napustí známa koncentrácia plynu vo vzduchu. Cez zmes sa nechá preletieť iskra a sleduje sa, či sa zo zapaľovacieho zdroja oddelí plameň a začne sa nezávisle šíriť alebo nie. Koncentrácia plynu sa mení, resp. zvyšuje, postupne po jednom objemovom percente, až kým nedôjde k zapáleniu zmesi podľa vyššie uvedeného opisu.

Ak štruktúra plynu naznačuje, že daný plyn je pravdepodobne nehorľavý a že sa dá vypočítať stechiometrická zmes so vzduchom, treba v jednopercenčných krokoch testovať iba zmesi v rozmedzí od 10 % pod stechiometrickou koncentráciou do 10 % nad touto koncentráciou.

2. ÚDAJE

Šírenie plameňa je jediným relevantným informačným údajom na stanovenie tejto vlastnosti.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- opis použitého prístroja s uvedenými rozmermi,
- teplotu, pri ktorej sa test uskutočnil,
- testované koncentrácie a získané výsledky,
- výsledok testu: nehorľavý alebo mimoriadne horľavý plyn,
- ak sa dospelo k záveru, že testovaný plyn je nehorľavý, treba uviesť rozsah koncentrácií, v rámci ktorého bol testovaný v 1 % krokoch,
- musia byť uvedené všetky informácie a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

- (1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.
- (2) W. Berthold, D. Conrad, T. Greuer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker und H. Schacke. „Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen“. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, 126 – 127.

A.12. **HORĽAVOSŤ (KONTAKT S VODOU)**1. **METÓDA**1.1. **ÚVOD**

Táto testovacia metóda sa môže použiť na stanovenie toho, či reakcia testovanej látky s vodou alebo vlhkým vzduchom vedie k vyvíjaniu nebezpečných množstiev plynu alebo plynov, ktoré môžu byť mimoriadne horľavé.

Testovacia metóda sa môže použiť pre tuhé, ako aj kvapalné látky. Táto metóda sa nedá použiť pre látky, ktoré sa spontánne zapália (vznecujú) pri kontakte so vzduchom.

1.2. **POJMY A JEDNOTKY**

Mimoriadne horľavé: látky, ktoré v kontakte s vodou alebo vzdušnou vlhkosťou uvoľňujú mimoriadne horľavé plyny v nebezpečných množstvách pri minimálnej rýchlosti 1 l/kg za hodinu.

1.3. **PRINCÍP METÓDY**

Látka sa testuje podľa poradia krokov opísaných v nasledujúcich odsekoch. Ak v rámci ktoréhokoľvek kroku dôjde k zapáleniu (vznieteniu), ďalšie testovanie už nie je potrebné. Ak je známe, že testovaná látka nereaguje búrlivo s vodou, možno postúpiť rovno ku kroku 4 (1.3.4).

1.3.1. **Krok 1**

Testovaná látka sa umiestni do vaničky obsahujúcej destilovanú vodu pri teplote 20 °C a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti) alebo nie.

1.3.2. **Krok 2**

Testovaná látka sa umiestni pri teplote 20 °C na filtračný papier plávajúci na hladine destilovanej vody v nádobe a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti) alebo nie. Filtračný papier slúži výlučne na to, aby sa testovaná látka udržiavala na jednom mieste na účely zvýšenia pravdepodobnosti zapálenia (vznietenia) látky.

1.3.3. **Krok 3**

Z testovanej látky sa urobí kôпка približne 2 cm vysoká s priemerom 3 cm. Do kôpky sa pridá niekoľko kvapiek vody a sleduje sa, či sa uvoľnený plyn zapáli (vznieti) alebo nie.

1.3.4. **Krok 4**

Testovaná látka sa zmieša s destilovanou vodou pri teplote 20 °C a rýchlosť uvoľňovania plynu sa meria sedem hodín, vždy v jednohodinových intervaloch. Ak je rýchlosť uvoľňovania plynu po uplynutí siedmich hodín nestála alebo narastá, čas merania možno predĺžiť na maximálny čas piatich dní. Test možno kedykoľvek zastaviť, ak rýchlosť uvoľňovania plynu prekročí hodnotu 1 l/kg za hodinu.

1.4. **REFERENČNÉ LÁTKY**

Nie sú špecifikované.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓD

1.6.1. **Krok 1**1.6.1.1. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.1.2. *Realizácia testu*

Malé množstvo testovanej látky (s priemerom približne 2 mm) sa umiestni do vaničky obsahujúcej destilovanú vodu. Treba sledovať a zaznamenať, či i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.2. **Krok 2**1.6.2.1. *Prístroje*

Filtračný papier sa naplocho položí na hladinu destilovanej vody naliatkej do vhodnej nádoby, napr. do odparovacej misky s priemerom 100 mm.

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.2.3. *Realizácia testu*

Malé množstvo testovanej látky (s priemerom približne 2 mm) sa umiestni do stredu filtračného papiera. Treba sledovať a zaznamenať, či i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.3. **Krok 3**1.6.3.1. *Podmienky skúšania*

Test sa uskutočňuje pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

1.6.3.2. *Realizácia testu*

Z testovanej látky sa urobí kôпка približne 2 cm vysoká, s priemerom 3 cm, s vrúbkovaním na vrcholku kôpky. Pridá sa niekoľko kvapiek vody a sleduje sa a zaznamenáva, či i) sa vôbec nejaký plyn uvoľnil a či ii) došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu. Ak došlo k zapáleniu (vznieteniu) plynu, tak už nie je potrebné ďalšie testovanie látky, pretože látka sa týmto považuje za nebezpečnú.

1.6.4. **Krok 4**1.6.4.1. *Prístroje*

Prístroj je zostavený podľa nákresu na obrázku.

1.6.4.2. *Podmienky skúšania*

Skontrolujte testovanú látku v prepravnom obale z hľadiska prítomnosti prášku s veľkosťou častíc < 500 µm. Ak prášok tvorí viac ako 1 % hmotnosti alebo ak je vzorka drobná, tak sa pred uskutočnením testu musí celé množstvo látky rozomlieť na prach vzhľadom na redukciu veľkosti častíc počas skladovania a manipulácie. V ostatných prípadoch sa látka testuje v takom stave, v akom bola doručená. Test sa musí uskutočniť pri teplote miestnosti (približne 20 °C) a pri normálnom atmosférickom tlaku.

1.6.4.3. Realizácia testu

Do odkvapkávajúceho lievika prístroja sa pridá 10 až 20 ml vody a do Erlenmeyerovej banky sa pridá 10 g testovanej látky. Objem uvoľneného plynu sa dá merať akýmkoľvek vhodným prostriedkom. Kohútik oddeľovacieho lievika sa otvorí, aby sa voda dostala do Erlenmeyerovej banky, a zároveň sa zapnú stopky. Uvoľňovanie plynu sa meria každú hodinu počas siedmich hodín. Ak je počas tohto času uvoľňovanie plynu nestále (kolísavé) alebo ak po uplynutí tohto času uvoľňovanie plynu ešte narastá, meranie môže pokračovať ešte maximálne päť dní. Ak v ktoromkoľvek čase rýchlosť uvoľňovania plynu prekročí hodnotu 1 l/kg/hod, test možno zastaviť. Tento test sa musí trojnásobne zopakovať.

Ak je identita plynu neznáma, plyn sa musí analyzovať. Keď plyn obsahuje mimoriadne horľavé zložky a nie je známe, či je celá zmes mimoriadne horľavá, treba pripraviť zmes toho istého zloženia a potom ju testovať podľa metódy A.11.

2. ÚDAJE

Testovaná látka sa považuje za nebezpečnú, ak:

- dôjde k spontánnemu zapáleniu (vznieteniu) počas ktoréhokoľvek kroku skúšobného postupu alebo
- dochádza k uvoľňovaniu horľavého (vznetlivého) plynu pri rýchlosti (miere) väčšej ako 1 l/kg látky za hodinu.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- podrobnosti o akejkoľvek počiatočnej príprave testovanej látky,
- výsledky testu (kroky 1, 2, 3 a 4),
- identifikáciu uvoľneného plynu,
- rýchlosť (mieru) uvoľňovania plynu, ak sa uskutočňuje krok 4 (1.6.4),
- všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

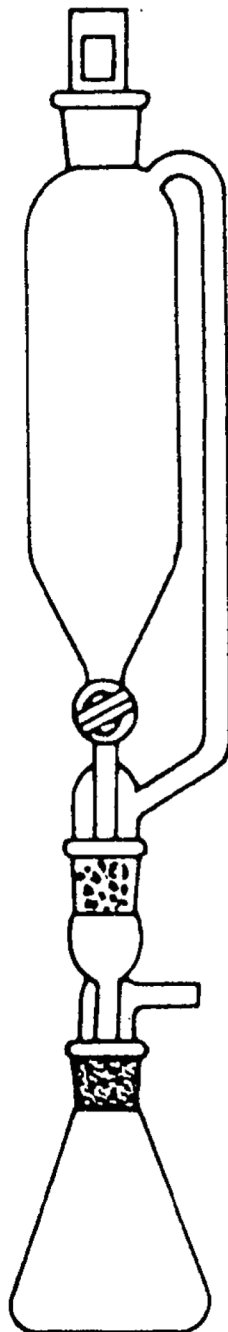
4. ODKAZY

- (1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
- (2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

Dodatok

Obrázok

Prístroj



A.13. SAMOZÁPALNÉ VLASTNOSTI TUHÝCH LÁTKO A KVAPALÍN

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Postup testu sa dá použiť pre tuhé alebo kvapalné látky, ktoré sa v malých množstvách samovoľne vznietia krátky čas po tom, čo sa dostali do kontaktu so vzduchom pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

Látky, ktoré musia byť vystavené pôsobeniu vzduchu počas niekoľkých hodín alebo dní pri teplote miestnosti alebo pri zvýšenej teplote, kým dôjde k ich vznieteniu, nie sú pokryté touto testovacou metódou.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Látky so sklonom k samovznieteniu sa považujú za také vtedy, ak sa vznietia alebo spôsobia zuhoľnatie za podmienok opísaných v 1.6.

Môže byť potrebné testovať aj samozápalnosť kvapalín použitím metódy A.15 – Teplota samovznietenia (kvapaliny a plyny).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Testovaná látka, či už tuhá, alebo kvapalná, sa pridá do inertnej nosnej látky a vystaví sa kontaktu so vzduchom pri teplote okolitého prostredia na päť minút. Ak sa kvapalné látky nevznietia, tak sa absorbujú do filtračného papiera a vystavia sa pôsobeniu vzduchu pri teplote okolitého prostredia (približne 20 °C) na päť minút. Ak sa testovaná tuhá látka alebo kvapalina vznieti alebo ak kvapalina zapáli alebo zuhoľnatí filtračný papier, testovaná látka sa považuje za látku so sklonom k samovznieteniu.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Opakovateľnosť: z bezpečnostných dôvodov na potvrdenie sklonu samovznietenia testovanej látky postačí jediný pozitívny výsledok.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. Prístroje

Porcelánová miska s priemerom približne 10 cm sa naplní kremelinou do výšky asi 5 mm pri teplote miestnosti (približne 20 °C).

Poznámka:

Kremelinu alebo akúkoľvek inú porovnateľnú inertnú látku, ktorá je bežne k dispozícii, treba považovať za látku zastupujúcu zemínu, na ktorú sa v prípade nehody testovaná látka môže roztrieť.

Suchý filtračný papier sa požaduje na testovanie kvapalín, ktoré sa nevznietia pri kontakte so vzduchom, keď sú v kontakte s inertnou nosnou látkou.

1.6.2. Realizácia testu

a) Práškové tuhé látky

Množstvo 1 cm³ až 2 cm³ práškovej látky určenej na testovanie sa nasype z výšky približne 1 m na nehorľavý (ohňovzdorný) povrch a sleduje sa, či sa testovaná látka vznieti počas pádu alebo v priebehu piatich minút po spočinutí na nehorľavom povrchu.

Test sa opakuje šesťkrát za sebou, pokiaľ nedôjde k vznieteniu testovanej látky.

b) *Kvapaliny*

Približne 5 cm³ kvapaliny určenej na testovanie sa naleje do pripravenej porcelánovej misky a sleduje sa, či sa testovaná látka vznieti v priebehu piatich minút.

Ak v rámci šiestich opakovaných testov nedôjde k vznieteniu testovanej látky, treba vykonať nasledujúci test:

Testovaná vzorka s objemom 0,5 ml sa nanesie injekčnou striekačkou na zvlhnený filtračný papier a sleduje sa, či dôjde k zapáleniu alebo zuhoľnateniu filtračného papiera v priebehu piatich minút od prídania testovanej kvapaliny. Test sa opakuje trikrát za sebou, pokiaľ nedôjde k zapáleniu alebo zuhoľnateniu.

2. ÚDAJE

2.1. PRÁCA S VÝSLEDKAMI

Testovanie môže byť zastavené, len čo sa v ktoromkoľvek čiastkovom teste objaví pozitívny výsledok.

2.2. VYHODNOTENIE

Ak sa testovaná látka vznieti v priebehu piatich minút po pridaní do inertnej nosnej látky a vystavení pôsobeniu vzduchu alebo ak kvapalná testovaná látka zuhoľnatie alebo zapáli filtračný papier po jej pridaní na toto médium a po vystavení pôsobeniu vzduchu, tak sa považuje za samozápalnú.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- výsledky testov,
- všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

- (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.

A.14. VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Metóda schematicky opisuje spôsob testovania na účely stanovenia, či tuhá alebo pastovitá látka predstavuje nebezpečenstvo výbuchu, keď je vystavená účinku plameňa (citlivosť na teplo) alebo nárazu, alebo treniu (citlivosť na mechanické podnety), a či kvapalná látka predstavuje nebezpečenstvo výbuchu, keď je vystavená účinku plameňa alebo nárazu.

Metóda pozostáva z troch častí:

- a) testu citlivosti na teplo (1);
- b) testu citlivosti na mechanické podnety vo forme nárazu (1);
- c) testu citlivosti na mechanické podnety vo forme trenia (1).

Metóda poskytuje údaje na zhodnotenie a stanovenie pravdepodobnosti vyvolania výbuchu určitými bežnými podnetmi. Metóda nie je určená na zisťovanie skutočnosti, či určitá látka je schopná výbuchu za akýchkoľvek podmienok.

Metóda je vhodná na stanovenie toho, či príslušná látka bude predstavovať nebezpečenstvo výbuchu (citlivosť na teplo a mechanické podnety) za konkrétnych podmienok špecifikovaných v smernici. Je založená na celom rade typov prístroja, ktoré sa vo veľkej miere používajú medzinárodne (1) a ktoré dávajú účelné a jednoznačné výsledky. Platí však všeobecný názor, že metóda nie je definitívna. Ako alternatívu k špecifikovanému prístroju možno použiť aj iné prístroje, avšak za predpokladu, že tieto sú medzinárodne uznané a že ich výsledky sa dajú adekvátne zostáadiť s príslušnými výsledkami získanými pomocou špecifikovaného prístroja.

Testy sa nemusia uskutočniť, ak existujúce termodynamické informácie (napr. zlučovacie teplo, rozkladné teplo), resp. absencia určitých reaktívnych skupín (2) v štruktúrnom vzorci, dôvodne potvrdzujú domnienku, že príslušná látka nie je schopná rýchleho rozkladu s tvorbou plynov alebo uvoľňovaním tepla (t. j. že materiál nepredstavuje žiadne riziko výbuchu). Pre kvapaliny sa nepožaduje test citlivosti na mechanické podnety vo forme trenia.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Výbušné látky:

Látky, ktoré v špecifikovanom prístroji môžu vybuchnúť účinkom plameňa alebo ktoré sú citlivé na nárazy alebo trenie (alebo sú citlivejšie na mechanické podnety než 1,3-dinitrobenzén v alternatívnom prístroji).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

1,3-dinitrobenzén, technický kryštalický produkt preosiaty na jemnosť častíc 0,5 mm pre metódu testovania citlivosti na trenie a nárazy.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazín (čiže RDX, hexogén, cyklonit – CAS 121-82-4), rekryštalizovaný z vodného cyklohexanónu, navlhko preosievavý cez 250 µm a zachytávaný na 150 µm site a sušený pri teplote 103 °C ± 2 °C (počas 4 hodín) pre druhú sériu testov citlivosti na trenie a nárazy.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Predbežné testy sú potrebné na vytvorenie bezpečných podmienok na uskutočnenie hlavných troch testov citlivosti.

1.4.1. Testy bezpečnosti manipulácie (3)

Z bezpečnostných dôvodov sa pred uskutočnením hlavných testov veľmi malé vzorky (približne 10 mg) látky určenej na testovanie vystavia zahrievaniu bez obmedzenia v plynovom plameni v akejkoľvek vhodnej forme prístroja, nárazu udieraním kyjaničky o nákovu a treniu v akejkoľvek forme trecieho mechanizmu. Cieľom je zistiť, či predmetná látka je taká citlivá a výbušná, že predpísané testy citlivosti, obzvlášť test citlivosti na teplo, sa musia uskutočniť so zvláštnou opatrnosťou, aby sa zabránilo prípadnému zraneniu laboratórneho pracovníka.

1.4.2. Citlivosť na teplo

Metóda spočíva v zohrievaní testovanej látky v oceleovej rúre uzavretej doštičkami s rozdielnymi priermi otvoru na účely stanovenia, či má testovaná látka tendenciu vybuchovať v podmienkach intenzívneho tepla a definovaného obmedzenia.

1.4.3. Citlivosť na mechanické podnety (náraz)

Metóda spočíva vo vystavení testovanej látky nárazu spôsobenému telesom so špecifikovanou hmotnosťou pusteným zo špecifikovanej výšky.

1.4.4. Citlivosť na mechanické podnety (trenie)

Metóda spočíva vo vystavení tuhých alebo pastovitých látok treniu medzi štandardnými povrchmi za špecifikovaných podmienok zaťaženia a relatívneho pohybu.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY**1.6.1. Citlivosť na teplo (účinnosť plameňa)****1.6.1.1. Prístroje**

Prístroj pozostáva z jednorazovo použiteľnej oceleovej rúry s opakovateľne použiteľným uzavieracím zariadením (obrázok 1), inštalovanej do zohrievacieho a ochranného zariadenia. Každá rúra je zhotovená z hlbokotažného oceleového plechu (pozri dodatok) a má vnútorný priemer 24 mm, dĺžku 75 mm a hrúbku steny 0,5 mm. Rúry sú na otvorenom konci upravené prírubou tak, aby sa umožnilo ich uzavretie zostavou uzáveru. Zostava uzáveru pozostáva z tlakovzdornej doštičky s otvorom uprostred, tesne prímknutej k rúre použitím dvojdielného závitového spoja (matice a závitového goliera, okružia). Matica aj závitový golier sú vyrobené z chrómmangánovej ocele (pozri dodatok), ktorá je neiskrivá až do teploty 800 °C. Doštičky majú hrúbku 6 mm, sú vyrobené zo žiaruvzdornej ocele (pozri dodatok) a sú k dispozícii s rozličnými priermi otvorov.

1.6.1.2. Podmienky skúšania

Za normálnych okolností sa látka testuje v takom stave, v akom ju dostali, hoci v niektorých prípadoch, napr. ak bola zlisovaná, liata alebo iným spôsobom kondenzovaná, je potrebné ju pred testovaním rozdrviť.

V prípade tuhých látok množstvo materiálu, ktoré sa má použiť v každom teste, sa stanoví použitím predbežného prípravného postupu „nasucho“. Dechtovaná rúra sa naplní množstvom 9 cm³ testovanej látky, látka sa potom ubije silou 80 N vyvinutou na celý priečny profil rúry. Z bezpečnostných dôvodov alebo v prípade, kde fyzikálna forma látky môže byť zmenená tlakom, sa môžu použiť iné postupy jej plnenia do rúry, napr. ak je testovaná látka nadmerne citlivá na trenie, ubíjanie nepredstavuje vhodný postup. Ak je materiál stlačiteľný, pridá sa ho viac a potom sa ubíja dovtedy, kým v rúre nedosiahne úroveň 55 mm od vrchnej časti. Stanoví sa celkové množstvo použité na naplnenie rúry do výšky 55 mm od jej vrchnej časti a pridajú sa dve ďalšie doplnkové množstvá, každé ubité silou 80 N. Podľa potreby sa potom materiál ešte pridá ubíjaním alebo sa z neho odoberie tak, aby bola rúra naplnená do výšky 15 mm od jej vrchnej časti. Uskutoční sa druhé prípravné kolo „nasucho“, počnúc ubitým množstvom predstavujúcim jednu tretinu celkovej hmotnosti zistenej v prvom kole. Pri ubíjaní silou 80 N sa pridajú dve ďalšie doplnkové množstvá a podľa potreby pridaním alebo odobratím materiálu sa upraví jeho úroveň na výšku 15 mm od vrchnej časti rúry. Množstvo tuhej látky stanovené v druhom prípravnom kole „nasucho“ sa potom použije pre každý pokus. Plnenie sa uskutoční s tromi rovnakými množstvami, pričom každé sa stlačí na objem 9 cm³ vyvinutím takej sily, aká je na to potrebná. (Postup sa dá uľahčiť použitím rozperných krúžkov.)

Kvapaliny a gély sa umiestnia do rúry do výšky 60 mm, pričom pri géloch treba dávať veľký pozor na to, aby sa zabránilo tvorbe dutín v materiáli. Zospodu sa na rúru nasunie závitový golier (okružie), priloží sa doštička s potrebnou veľkosťou otvoru uprostred a po pridaní malého množstva lubrikantu na báze sírnika molybdeničitého sa naplní utiahne matica. Je dôležité skontrolovať, či nezostali zvyškové množstvá testovanej látky zachytené medzi prírubou a doštičkou alebo v závitoch.

Zohrievanie sa zabezpečuje propánom odoberaným z priemyselnej tlakovej fľaše, ktorá je vybavená regulátorom tlaku (60 až 70 milibarov), cez merací prístroj (plynomer) a rovnomerne distribuovaným (ako to potvrdzuje vizuálne pozorovanie plameňov vychádzajúcich z horákov) rozdeľovacím potrubím k štyrom horákom. Horáky sú rozmiestnené okolo skúšobnej komory tak, ako je to znázornené na obrázku 1 v dodatku. Štyri horáky majú celkovú spotrebu asi 3,2 l propánu za minútu. Môžu sa použiť aj alternatívne vykurovacie plyny a horáky, ale rýchlosť ohrevu musí zodpovedať špecifikácii na obrázku 3. Pre všetky prístroje sa musí rýchlosť ohrevu periodicky kontrolovať použitím skúmaviek naplnených dibutylftalátom, ako je to znázornené na obrázku 3.

1.6.1.3. Realizácia testov

Každý test sa vykonáva dovtedy, pokiaľ sa každá rúra neroztriešti, alebo sa zahrieva až päť minút. Test s výsledným roztrieštením rúry na tri alebo viacero kusov, ktoré môžu byť v niektorých prípadoch spojené úzkymi páskami kovu, ako je to znázornené na obrázku 2, sa vyhodnocuje ako výbuch. Test, ktorého výsledkom je menej trieštivých úlomkov, alebo test, v rámci ktorého nedošlo vôbec k roztriešteniu rúry, sa považuje za test bez výsledného výbuchu.

Najprv sa uskutoční séria troch testov s uzáverovými doštičkami s priemerom otvorov 6,0 mm, a ak nedôjde k výbuchu, uskutoční sa druhá séria troch testov s uzáverovými doštičkami s priemerom otvorov 2,0 mm. Ak dôjde k výbuchu v oboch sériách testov, realizácia ďalších testov sa už nepožaduje.

1.6.1.4. Vyhodnotenie

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu v oboch horeuvedených sériách testov.

1.6.2. Citlivosť na mechanické podnety (náraz)**1.6.2.1. Prístroje (obrázok 4)**

Hlavné časti typického prístroja s padacím bucharom pozostávajú z oceľovoliatinového bloku s podkladom, nákovy, stojanu, vodiacich líšt, padacích závaží, spúšťacieho mechanizmu a držiaka na vzorky. Oceľová nákova 100 mm (priemer) × 70 mm (výška) je priskrutkovaná k vrchnej strane oceľového bloku 230 mm (dĺžka) × 250 mm (šírka) × 200 mm (výška) s liatym podkladom 450 mm (dĺžka) × 450 mm (šírka) × 60 mm (výška). Stojan vyrobený z bezšvovej rúry z ťahanej ocele je upevnený v držiaku priskrutkovanom na zadnú časť oceľového bloku. Štyri skrutky zakotvujú prístroj k masívnemu betónovému kotevnému bloku s rozmermi 60 cm × 60 cm × 60 cm tak, aby vodiace líšty boli v absolútne vertikálnej polohe a aby padacie závažia po uvoľnení padalo voľne. Na použitie sú vhodné 5 kg a 10 kg závažia vyrobené z plnej ocele. Nárazová hlava každého závažia je zhotovená z kalenej ocele, HRC 60 až 63, a má minimálny priemer 25 mm.

Vzorka určená na testovanie je uzavretá v nárazovom mechanizme, ktorý pozostáva z dvoch koaxiálnych plných oceľových valcov umiestnených nad sebou v dutom valcovitom oceľovom vodiacom prstenci. Plné oceľové valce musia mať priemer 10 (-0,003, -0,005) mm a výšku 10 mm, musia mať leštený povrch, zaoblené hrany (polomer oblúka 0,5 mm) a tvrdosť HRC 58 až 65. Dutý valec musí mať vonkajší priemer 16 mm, leštené vŕtanie s vnútorným priemerom 10 (+0,005, +0,010) mm a výšku 13 mm. Nárazový mechanizmus je namontovaný na vložení nákovu (priemer 26 mm a výška 26 mm) zhotovenú z ocele a centrovanú prstencom s perforáciami, aby sa umožnil únik spalín.

1.6.2.2. Podmienky skúšania

Vzorka by mala mať objem 40 mm³ alebo objem, ktorý je vhodný pre alternatívny prístroj. Tuhé látky by sa mali testovať v suchom stave a mali by byť pripravené týmito spôsobmi:

- práškové látky sa preosievajú (číslo sita 0,5 mm). Všetok materiál, ktorý prepadol cez sito, sa použije na skúšobné účely;
- lisované, liate alebo iným spôsobom kondenzované látky sa rozdrvia na malé kúsky a preosejú sa. Na účely testovania sa použije frakcia zŕn s priemerom od 0,5 mm do 1 mm a mala by reprezentovať pôvodnú látku.

Látky, ktoré sa normálne dodávajú ako pasty, by sa mali v prípadoch, keď je to možné, testovať v suchom stave alebo v každom prípade po odstránení maximálne možného množstva riedidla, resp. rozpúšťadla. Kvapalné látky sa testujú s 1 mm medzerou medzi vrchným a spodným oceľovým valcom.

1.6.2.3. Realizácia testov

Vykoná sa séria šiestich testov s 10 kg padacím závažím púšťaným z výšky 0,40 m (40 J). Ak počas šiestich testov pri sile nárazu 40 J dôjde k výbuchu, treba pokračovať sériou ďalších šiestich testov s 5 kg padacím závažím púšťaným z výšky 0,15 m (7,5 J). V inom prístroji sa testovaná vzorka porovnáva so zvolenou referenčnou látkou použitím zavedeného postupu (napr. striedavou technikou „up and down“ atď.).

1.6.2.4. Vyhodnotenie

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu (vyšľahnutie plameňa alebo úder sú ekvivalentné výbuchu) aspoň raz v niektorom z testov pri použití špecifikovaného nárazového prístroja alebo ak je testovaná vzorka citlivejšia ako 1,3-dinitrobenzén alebo RDX v alternatívnom teste citlivosti na náraz.

1.6.3. Citlivosť na mechanické podnety (trenie)**1.6.3.1. Prístroje (obrázok 5)**

Trecí prístroj pozostáva z ocelovoľatinatej podkladovej dosky, na ktorú je namontovaný trecí mechanizmus. Tento sa skladá z fixovaného porcelánového kolíka a pohyblivej porcelánovej doštičky. Porcelánová doštička je nesená rámom, ktorý behá v dvoch vodiaciach lištách. Rám je napojený na elektromotor ojnícou (spojovacou tyčou), excentrom a vhodným ozubeným prevodom tak, aby porcelánová doštička vykonala jednorazový pohyb späť a dopredu pod porcelánovým kolíkom na vzdialenosť 10 mm. Porcelánový kolík môže byť zaťažovaný silou napríklad 120 N alebo 360 N.

Ploché porcelánové doštičky sú vyrobené z bieleho technického porcelánu (hrúbka 9 µm až 32 µm) a majú rozmery 25 mm (dĺžka) × 25 mm (šírka) × 5 mm (výška). Valcovitý porcelánový kolík je takisto vyrobený z bieleho technického porcelánu a je 15 mm dlhý, má priemer 10 mm a zdrsnené sférické koncové plochy s polomerom ohybu 10 mm.

1.6.3.2. Podmienky skúšania

Testovaná vzorka by mala mať objem 10 mm³ alebo objem, ktorý sa hodí pre alternatívny prístroj.

Tuhé látky sa testujú v suchom stave a sú pripravované týmito spôsobmi:

- a) práškové látky sa preosievajú (číslo sita 0,5 mm); všetok materiál, ktorý prepadol cez sito, sa použije na skúšobné účely;
- b) lisované, liate alebo iným spôsobom kondenzované látky sa rozdrvia na malé kúsky a preosejú sa; na účely testovania sa použije frakcia zŕn s priemerom < 0,5 mm.

Látky, ktoré sa normálne dodávajú ako pasty, by sa mali v prípadoch, keď je to možné, testovať v suchom stave. Ak látka určená na testovanie nemôže byť pripravená v suchom stave, pasta (po odstránení maximálneho množstva rozpúšťadla) sa testuje ako 0,5 mm hrubý, 2 mm široký a 10 mm dlhý film pripravený pomocou formy.

1.6.3.3. Realizácia testov

Porcelánový kolík sa nasmeruje na testovanú vzorku a zaťažuje sa. Počas uskutočňovania testu musia hubové rysy porcelánovej doštičky ležať priečne na smer pohybu. Treba dbať na to, aby porcelánový kolík spočíval priamo na testovanej vzorke, aby sa pod kolíkom nachádzalo dostatočné množstvo testovaného materiálu, a tiež na to, aby sa porcelánová doštička pod kolíkom pohybovala správnym spôsobom. V prípade pastovitých látok sa na aplikáciu testovanej látky na doštičku používa 0,5 mm hrubá šablóna s 2 × 10 mm drážkou. Porcelánová doštička musí vykonať pohyb v dĺžke 10 mm dopredu a späť pod porcelánovým kolíkom za 0,44 sekundy. Každá časť povrchu doštičky a kolíka sa smie použiť iba raz; dva konce každého kolíka teda poslúžia na dva pokusy a každý z dvoch povrchov doštičky poslúži na tri pokusy.

Séria šiestich testov sa uskutoční so zaťažením 360 N. Ak sa počas týchto šiestich testov dosiahne pozitívny výsledok, musí sa uskutočniť ďalšia séria šiestich testov so zaťažením 120 N. V inom prístroji sa vzorka porovnáva so zvolenou referenčnou látkou použitím zavedeného postupu (napr. striedavou technikou „up and down“ atď.).

1.6.3.4. Vyhodnotenie

Výsledok testu sa považuje za pozitívny, ak dôjde k výbuchu (praskanie a/alebo úder alebo vyšľahnutie plameňa sú ekvivalentné výbuchu) aspoň raz v niektorom z testov so špecifikovaným trecím prístrojom alebo ak tento výsledok zodpovedá ekvivalentným kritériám v alternatívnom teste citlivosti na trenie.

2. ÚDAJE

V zásade sa príslušná látka podľa smernice považuje za nebezpečnú z hľadiska výbušnosti vtedy, ak sa dosiahol pozitívny výsledok v rámci testu citlivosti na teplo, náraz alebo trenie.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- identifikáciu, zloženie, čistotu, obsah vlhkosti atď. testovanej látky,
- fyzikálnu formu vzorky a údaje o tom, či bola rozdrvená, nalámaná, resp. preosiata, alebo nie,
- pozorovania počas testov citlivosti na teplo (napr. hmotnosť vzorky, počet úlomkov atď.),
- pozorovania počas testov citlivosti na mechanické podnety (napr. tvorba značného množstva dymu alebo úplné rozloženie bez zvukového efektu, plamene, iskry, zvuková rana, praskanie atď.),
- výsledky z každého typu testu,
- ak sa použil alternatívny prístroj, musí sa podať vedecké zdôvodnenie, ako aj dôkaz korelácie medzi výsledkami dosiahnutými so špecifikovaným prístrojom a výsledkami dosiahnutými s ekvivalentným prístrojom,
- všetky nepostrádateľné poznámky ako odkazy na testy s podobnými produktmi, ktoré by mohli byť dôležité pre správnu interpretáciu výsledkov,
- všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Správa z testu by sa mala zmieniť o všetkých výsledkoch, ktoré sa považujú za chybné, zavádzajúce, anomálne alebo nereprezentatívne. Ak sa ktorýkoľvek z výsledkov anuluje, treba uviesť vysvetlenie a nahradiť ho výsledkom alternatívneho doplnkového testu. Pokiaľ sa anomálny výsledok nedá vysvetliť, musí sa akceptovať ako normálna hodnota a musí sa podľa toho aj použiť na klasifikovanie príslušnej testovanej látky.

4. ODKAZY

- (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.

Dodatok

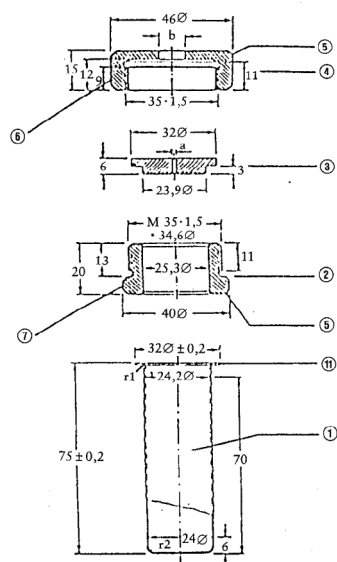
Príklad materiálovej špecifikácie pre test citlivosti na teplo (pozri technickú normu DIN 1623)

- (1) Rúra: materiálová špecifikácia č. 1.0336.505 g.
- (2) Uzáverová doštička s otvorom: materiálová špecifikácia č. 1.4873.
- (3) Závitový golier a matica: materiálová špecifikácia č. 1.3817.

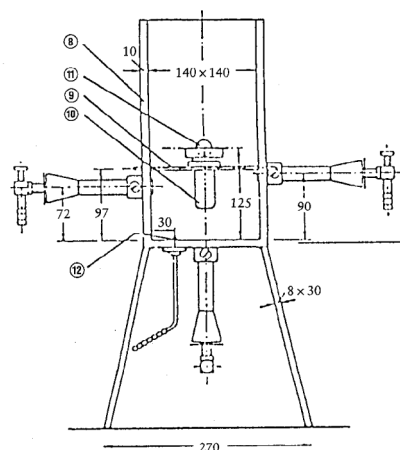
Obrázok 1

Testovací prístroj na stanovenie citlivosti na teplo

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obr. 1a Oceľová rúra a príslušenstvo



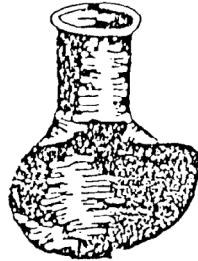
Obr. 1b Zohrievacie a ochranné zariadenie

1. rúra	7. 2 rovné plošky pre kľúč na matice veľkosti 36
1. a) vonkajšia príruha	8. ochranné puzdro odolné voči črepinám
2. závitový golier; závit s nízkym trením	9. 2 oporné tyče pre rúru
3. uzáverová doštička s otvorom s priemerom $a = 2,0$ alebo $6,0$ mm	10. zmontovaná rúra
4. matica s otvorom s priemerom $b = 10$ mm	11. poloha zadného horáka; ostatné horáky sú viditeľné
5. skosený povrch	12. zapalovacia dýza
6. 2 rovné plošky pre kľúč na matice veľkosti 41	

Obrázok 2

Test citlivosti na teplo

(príklady trieštenia)



Žiadny výbuch



Žiadny výbuch



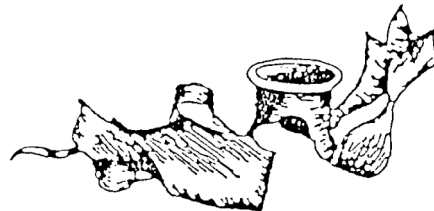
Výbuch



Výbuch

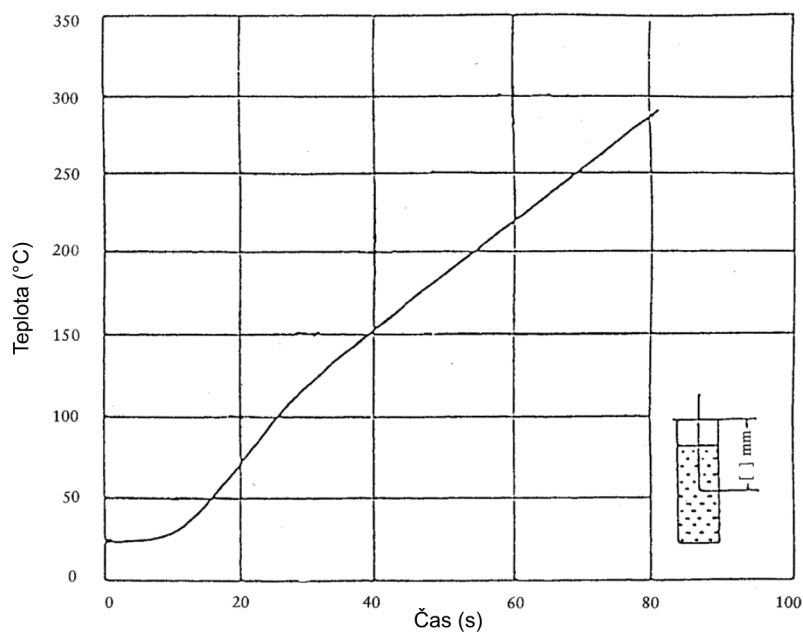


Výbuch



Výbuch

Obrázok 3

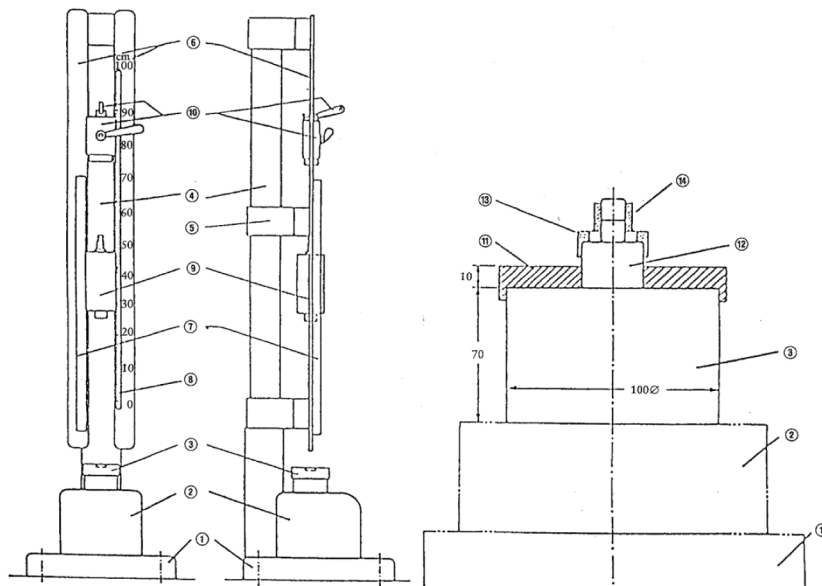
Kalibrácia rýchlosti ohrevu pre test citlivosti na teplo

Krivka teploty a času dosiahnutá zohrievaním dibutylftalátu (27 cm^3) v uzavretej rúre (uzáverová dosťička s otvorom 1,5 mm) pri nastavení prietoku propánu na 3,2 l/min. Teplota sa meria Cr-Al termočlánkom s priemerom 1 mm uloženým v ochrannom plášti z nehrdzavejúcej ocele, umiestneným centrálne 43 mm pod okrajom rúry. Rýchlosť ohrevu medzi 135 °C a 285 °C by mala byť medzi 185 a 215 K/min.

Obrázok 4

Prístroj na testovanie citlivosti látok na náraz

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obr. 4a Padací buchar, nárys a bokorys, celkový pohľad

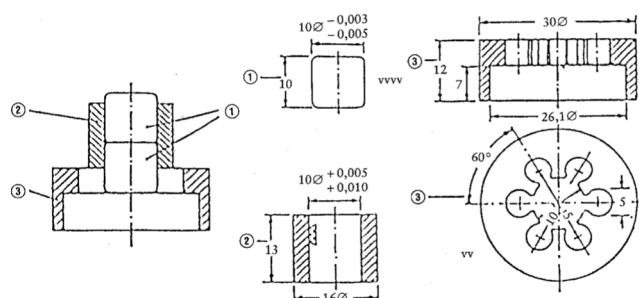
Obr. 4b Padací buchar, spodná časť (detail)

1. Základňa 450 × 450 × 60
2. Oceľový blok 230 × 250 × 200
3. Náková, Ø 100 × 70
4. Stojan
5. Stredná priečka
6. Dve vodiace lišty
7. Ozubená tyč

8. Delená stupnica
9. Padací buchar
10. Upínacie spúšťacie zariadenie
11. Umiestňovacia platňa
12. Vložená náková (vymeniteľná), Ø 26 × 26
13. Umiestňovací krúžok s otvormi
14. Nárazový mechanizmus

Obrázok 4

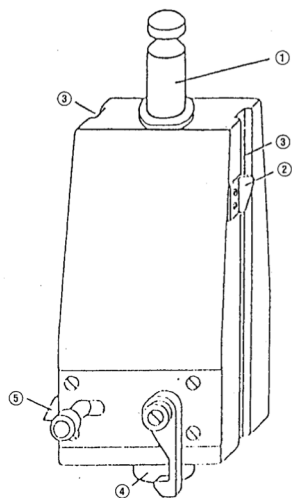
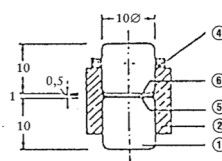
Pokračovanie



Obr. 4 c Nárazový mechanizmus pre chemickú látku v práškovej alebo pastovitej forme

Obr. 4 d Nárazový mechanizmus pre kvapalnú látku

1. Oceľové valce
2. Vodiace krúžky pre oceľové valce
3. Umiestňovací krúžok s otvormi:
 - a) Zvislý rez
 - b) Pôdorys
4. Gumový krúžok
5. Kvapalná chemická látka (40 mm^3)
6. Priestor bez prítomnosti kvapaliny

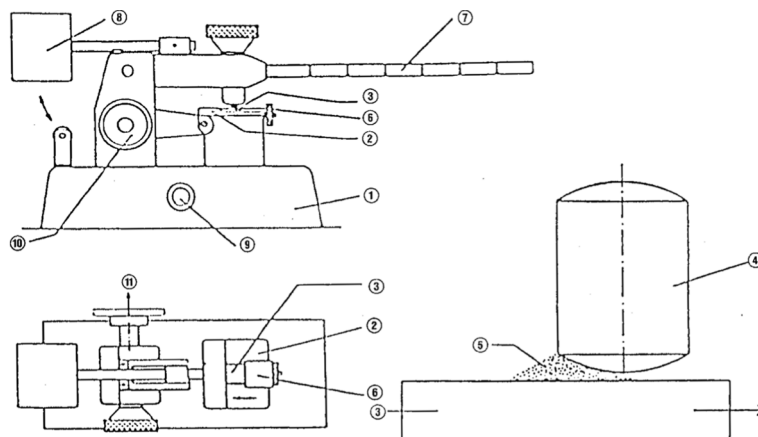


Obr. 4 e Buchar (padacie závažie hmotnosti 5 kg)

1. Závesný kolík
2. Označovač výšky
3. Polohovacia drážka
4. Valcovitá nárazová hlava
5. Príchytka (uzáver)

Obrázok 5

Prístroj na testovanie citlivosti látok na trenie



Obr. 5a Nárys a pôdorys

Obr. 5b Východisková poloha kolíka na vzorke

1. Oceľová základňa
2. Pohyblivý suport
3. Porcelánová dosťička, $25 \times 25 \times 5$ mm
4. Uchytený porcelánový kolík, priemer 10×15 mm
5. Testovaná vzorka, približné množstvo 10 mm^3

6. Držiak kolíka
7. Zaťažovacie rameno
8. Vyvažovacie rameno
9. Spínač
10. Koleso na nastavenie suportu do východiskovej polohy
11. Pripojenie na elektromotor

A.15. **TEPLOTA SAMOVZNIETENIA (KVAPALINY A PLYNY)**1. **METÓDA**1.1. **ÚVOD**

Výbušné látky a látky, ktoré sa samovoľne vznecujú v kontakte so vzduchom pri teplote okolitého prostredia, by sa nemali predkladať na testovanie touto metódou. Tento testovací postup sa dá použiť v prípade plynov, kvapalín a pár, ktoré sa môžu zapáliť za prítomnosti vzduchu horúcim povrchom.

Teplota samovznietenia sa môže do značnej miery redukovať prítomnosťou katalytických prímiesí, povrchovým materiálom alebo väčším objemom skúšobnej nádoby.

1.2. **POJMY A JEDNOTKY**

Miera schopnosti látky samovoľne sa vznietiť sa vyjadruje teplotou samozápalu. Teplota samovznietenia predstavuje najnižšiu teplotu, pri ktorej sa testovaná látka vznieti, keď je zmiešaná so vzduchom za podmienok definovaných v skúšobnej metóde.

1.3. **REFERENČNÉ LÁTKY**

Referenčné látky sú citované v technických normách (pozri 1.6.3). V prvom rade by mali slúžiť na občasnú kontrolu účinnosti metódy, jej správnej realizácie a na umožnenie porovnania s výsledkami dosiahnutými pri použití iných metód.

1.4. **PRINCÍP METÓDY**

Metóda stanovuje minimálnu teplotu vnútorného povrchu uzavretého priestoru, ktorá bude mať za následok vznietenie plynu, pary alebo kvapaliny vstreknutej do tohto uzavretého priestoru.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Opakovateľnosť sa mení v závislosti od rozmedzia teplôt samovznietenia a použitej skúšobnej metódy.

Citlivosť a špecifickosť závisia od použitej skúšobnej metódy.

1.6. **OPIS METÓDY**1.6.1. **Prístroje**

Prístroj je opísaný v metóde uvedenej v 1.6.3.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Vzorka testovanej látky sa testuje podľa metódy uvedenej v 1.6.3.

1.6.3. **Realizácia testu**

Pozri technické normy IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037.

2. **ÚDAJE**

V rámci testu sa zaznamenáva testovacia teplota, atmosférický tlak, množstvo testovanej vzorky a časové oneskorenie po moment, keď dôjde k vznieteniu.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímеси),
- množstvo použitej vzorky, atmosférický tlak,
- použitý prístroj,
- výsledky meraní (skúšobné teploty, výsledky týkajúce sa vznietenia, zodpovedajúce časy oneskorenia),
- všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

Žiadne.

A.16. RELATÍVNA TEPLOTA SAMOVZNIETENIA PRE TUHÉ LÁTKY

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Výbušné látky a látky, ktoré sa vznecujú spontánne v kontakte so vzduchom pri teplote okolitého prostredia, by sa nemali testovať touto metódou.

Účelom tohto testu je poskytnúť predbežné informácie o samozápalnosti tuhých látok pri zvýšených teplotách.

Ak sa teplo vyvinuté buď reakciou látky s kyslíkom, alebo exotermickým rozkladom nerozptýli dostatočne rýchlo do okolitého priestoru, dochádza k samozahriatiu, ktoré má za následok samovznietenie. K samovznieteniu preto dochádza vtedy, keď rýchlosť tvorby tepla presiahne rýchlosť straty tepla.

Testovací postup má význam ako predbežný skríningový test pre tuhé látky. Z hľadiska komplexného charakteru vznietenia a horenia tuhých látok by sa teplota samovznietenia stanovená podľa tejto metódy mala použiť iba na účely porovnania.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Teplota samovznietenia získaná touto metódou predstavuje minimálnu teplotu okolitého prostredia vyjadrenú v °C, pri ktorej sa za definovaných podmienok vznieti určitý objem látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP METÓDY

Určitý objem látky určenej na testovanie sa umiestni do piecky pri teplote miestnosti; zaznamenaná sa krivka teploty a času, vzťahujúca sa na podmienky v strede testovanej vzorky, pričom teplota piecky sa pri rýchlosti ohrevu 0,5 °C za minútu zvýši na 400 °C, alebo na teplotu topenia, ak je táto nižšia. Na účely tohto testu sa teplota piecky, pri ktorej teplota testovanej vzorky dosiahne 400 °C samozahriatím, nazýva teplotou samovznietenia.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. Prístroje

1.6.1.1. Piecka

Laboratórna piecka s programovateľnou teplotou (s objemom približne 2 litre), vybavená prirodzenou cirkuláciou vzduchu a dekompresným mechanizmom na tlmenie účinkov výbuchu. Aby sa zabránilo potenciálnemu nebezpečeniu výbuchu, musí sa dávať pozor, aby sa rozkladové plyny nedostali do kontaktu s prvkami elektrického vyhrievania.

1.6.1.2. Kocka z drôtovej siete

Podľa šablóny zobrazenej na obrázku 1 treba vystrihnúť kúsok drôtovej siete s otvormi 0,045 mm, vyrobenej z nehrdzavejúcej ocele. Potom treba sieť poskladať do tvaru kocky s otvorenou vrchnou stranou a zaistiť drôtom.

1.6.1.3. *Tepelné články (termočlánky)*

Vhodné tepelné články (termočlánky).

1.6.1.4. *Registračný prístroj*

Lubovoľný dvojkanálový registračný prístroj kalibrovaný od 0 °C do 600 °C alebo na zodpovedajúce napätie.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Látky sa testujú v takom stave, v akom boli získané.

1.6.3. **Realizácia testu**

Kocka sa naplní testovanou látkou a táto sa jemne utlačí, potom sa pridá viac testovanej látky, táto sa znova jemne utlačí a postup sa opakuje až dovtedy, kým kocka nie je úplne naplnená. Kocka sa potom zavesí do stredu piecky pri teplote miestnosti. Jeden termočlánok sa umiestni do stredu kocky a druhý medzi kocku a stenu piecky, aby zaznamenával teplotu piecky.

Počas zvyšovania teploty piecky rýchlosťou 0,5 °C za minútu na 400 °C alebo na teplotu topenia, ak je táto nižšia, sa plynulo zaznamenáva teplota piecky a teplota testovanej vzorky.

Keď sa testovaná látka vznieti (zapáli), termočlánok vzorky ukáže veľmi silný nárast teploty nad teplotu piecky.

2. **ÚDAJE**

Teplota piecky, pri ktorej teplota testovanej vzorky dosiahne hodnotu 400 °C samozahriatím, je dôležitá pre vyhodnotenie (obrázok 2).

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

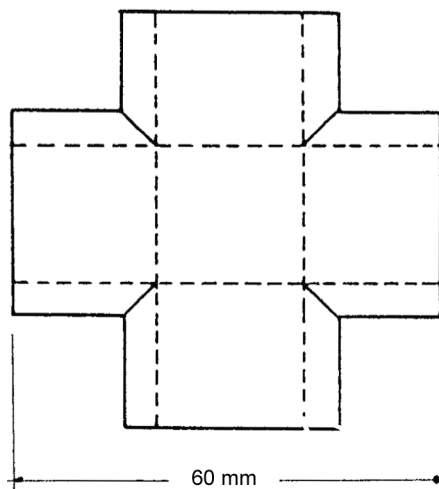
- opis testovanej látky,
- výsledky merania vrátane krivky teploty/času,
- všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

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

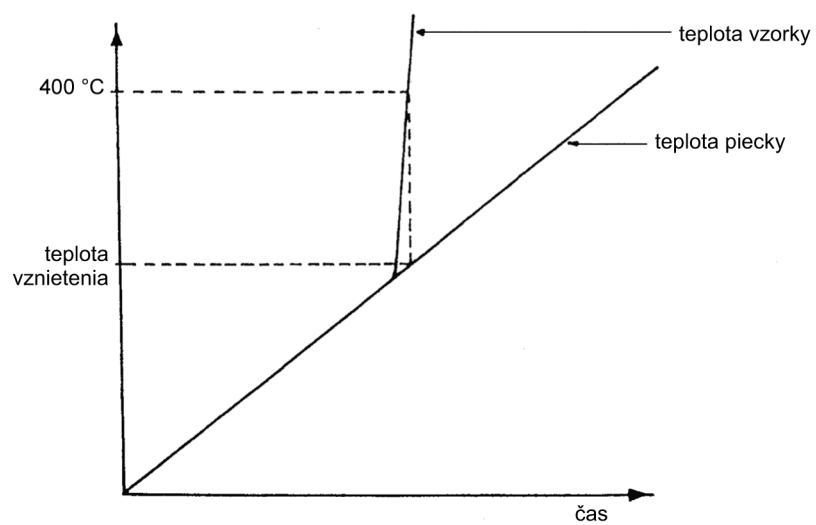
Obrázok 1

Schéma 20 mm testovanej kocky



Obrázok 2

Typická krivka teploty/času



A.17. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (TUHÉ LÁTKY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Odporúča sa získať predbežné informácie o všetkých potenciálne výbušných vlastnostiach látky ešte pred uskutočnením testu.

Tento test sa nedá použiť pre kvapaliny, plyny, výbušné ani mimoriadne horľavé látky, ani pre organické peroxidy.

Tento test sa nemusí uskutočniť, ak preskúmanie štrukturálneho vzorca potvrdí domnienku, že príslušná látka nie je schopná exotermickej reakcie s horľavým materiálom.

Aby sa zistilo, či sa test musí uskutočniť so zvláštnymi bezpečnostnými opatreniami, treba vykonať predbežný test.

1.2. POJEM A JEDNOTKY

Čas horenia: čas reakcie vyjadrený v sekundách, potrebný na to, aby reakčná zóna prešla celou hranicou vytvorenou z testovanej látky pri dodržaní postupu opísaného v 1.6.

Rýchlosť horenia: vyjadrená v milimetroch za sekundu.

Maximálna rýchlosť horenia: najvyššia hodnota rýchlostí horenia získaná so zmesami obsahujúcimi 10 až 90 hmotnostných percent oxidantu.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Pre potreby hlavného aj predbežného testu sa ako referenčná látka používa dusičnan bárnatý.

Referenčnou zmesou je tá zmes dusičnanu bárnatého s práškovou celulórou, pripravená podľa 1.6, ktorá dosiahla najvyššiu rýchlosť horenia (zvyčajne je to zmes obsahujúca 60 hmotnostných percent dusičnanu bárnatého).

1.4. PRINCÍP METÓDY

V záujme bezpečnosti sa uskutočňuje predbežný test. Ak tento test jasne ukáže, že testovaná látka má oxidačné vlastnosti, nie je potrebné uskutočniť žiadne ďalšie testy. Ak to však nie je tak, látku treba podrobiť kompletnému testu.

V rámci kompletného testu sa látka určená na testovanie zmieša s definovanou horľavinou v rozličných pomeroch. Každá zmes sa potom sformuje do hranice, ktorá sa na jednom konci zapáli. Najvyššia stanovená, resp. zistená, rýchlosť horenia sa porovná s maximálnou rýchlosťou horenia referenčnej zmesi.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Ak je to nutné, možno použiť akúkoľvek metódu drvenia, mletia alebo miešania za predpokladu, že rozdiel v maximálnej rýchlosti horenia v šiestich samostatných testoch sa nebude odchyľovať od aritmetickej strednej hodnoty o viac ako 10 %.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**1.6.1.1. *Testovaná látka*

Veľkosť častí testovanej látky treba redukovať na < 0,125 mm použitím tohto postupu: testovaná látka sa preoseje, zvyšná časť (frakcia) sa pomelie a tento postup sa opakuje dovtedy, kým celé množstvo určené na testovanie neprepadlo cez sito.

Použiť možno akúkoľvek metódu mletia a preosievania, ktorá zodpovedá kritériám kvality.

Pred prípravou zmesi sa látka určená na testovanie suší pri teplote 105 °C dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná hmotnosť. Ak je teplota rozkladu látky určenej na testovanie nižšia ako 105 °C, látka sa musí sušiť pri vhodnej nižšej teplote.

1.6.1.2. Horľavina

Ako horľavina sa používa prášková celulóza. Celulóza musí byť takého typu, aký sa používa v prípade chromatografie tenkej vrstvy alebo stĺpcovej chromatografie. Ako najvhodnejší sa osvedčil typ s vyše 85 % podielom dĺžky vlákien medzi 0,020 mm a 0,075 mm. Celulózový prášok sa preoseje cez sito veľkosti 0,125 mm. Počas celého testu treba používať tú istú várku celulózy.

Pred prípravou zmesi sa prášková celulóza suší pri teplote 105 °C dovtedy, kým sa nedosiahne konštantná teplota.

Ak sa v predbežnom teste použije drevitá múčka, treba pripraviť drevitú múčku z mäkkého dreva použitím tej časti materiálu, ktorá sa preosiaa cez otvory sita veľkosti 1,6 mm, potom treba múčku dôkladne premiešať, sušiť pri teplote 105 °C štyri hodiny v navrstvení maximálne do výšky 25 mm. Materiál treba ochladiť a uskladniť vo vzduchotesnom obale naplnenom do maximálnej možnej miery až do času použitia, podľa možnosti do 24 hodín od ukončenia procesu sušenia.

1.6.1.3. Zápalný zdroj

Ako zápalný zdroj sa odporúča použiť plynový horák s horúcim plameňom (minimálny priemer 5 mm). V prípade, ak sa použije iný zápalný zdroj (napríklad pri testovaní v inertnej atmosfére), v správe sa musí uviesť jeho opis a zdôvodnenie jeho použitia.

1.6.2. Realizácia testu

Poznámka:

Zmesi oxidantov s celulózou alebo drevitou múčkou sa musia upravovať ako potenciálne výbušné látky a musí sa s nimi narábať s patričnou opatrnosťou.

1.6.2.1. Predbežný test

Vysušená látka sa dôkladne premieša s vysušenou celulózou alebo drevitou múčkou v hmotnostnom pomere 2 dielov testovanej látky a 1 dielu celulózy alebo drevitej múčky, zmes sa potom sformuje do malej hranice kónického tvaru s rozmermi 3,5 cm (priemer základne) × 2,5 cm (výška) naplnením (nie utláčaním) formy kónického tvaru (napr. skleného laboratórneho lievika s upchatou stopkou).

Hranica sa umiestni na chladnú, nehorľavú (ohňovzdornú), nepórovitú základovú platňu s nízkou tepelnou vodivosťou. Test sa musí uskutočniť v digestore, ako je to uvedené v 1.6.2.2.

Zápalný zdroj sa kontaktne priloží ku kužeľu. Pozoruje sa a zaznamená prudkosť a trvanie výslednej reakcie.

Testovanú látku treba považovať za oxidačnú, ak je reakcia prudká.

V každom takom prípade, kde sú pochybnosti o dosiahnutom výsledku, je potrebné uskutočniť kompletný hlavný test podľa opisu uvedeného nižšie.

1.6.2.2. Hlavný test

Pripraví sa zmes oxidantu a celulózy obsahujúce 10 až 90 hmotnostných percent oxidantu v 10 % prírastkoch. Pre hraničné prípady treba použiť zmesi s rovnakým hmotnostným podielom oxidantu a celulózy, aby sa dosiahla presnejšia hodnota maximálnej rýchlosti horenia.

Hranica sa vytvorí pomocou formy. Forma je vyrobená z kovu, má dĺžku 250 mm a trojuholníkovitý prierez s vnútornou výškou 10 mm a vnútornou šírkou 20 mm. Po oboch stranách formy sú v pozdĺžnom smere namontované kovové lišty, ktoré slúžia ako bočné ohraničenie a ktoré prečnievajú 2 mm ponad vrchný okraj trojuholníkovitého prierezu (pozrite obrázok). Žliabok s trojuholníkovitým prierezom sa zvoľna naplní mierne nad okraj testovanou zmesou. Forma sa potom zdvihne do výšky 2 cm a pustí sa, aby dopadla na tvrdý podklad, čím sa zmes utrasie. Prebytočná zmes sa zhrnie šikmo nakloneným plátkom. Odstránia sa bočné

kovové lišty a zostávajúci prášok sa uhladí použitím valčeka. Na vrchnú stranu formy sa potom položí nehorľavá (ohňovzdorná), nepórovitá podkladová doska s nízkou tepelnou vodivosťou, prístroj sa obráti spodnou časťou navrch a forma sa odstráni.

Hranica z práškovej zmesi sa umiestni do digestora priečne na smer prúdenia vzduchu.

Rýchlosť prúdenia vzduchu musí byť dostatočná na to, aby sa zabránilo úniku spalín do ovzdušia laboratória, a počas testu by sa nemala meniť. Okolo prístroja by mala byť postavená protiprievanová zástena.

Kvôli hygroskopickým vlastnostiam celulózy a niektorých látok určených na testovanie by sa testy mali uskutočniť čo možno najskôr po príprave.

Dotykom plameňa sa zapáli jeden koniec hranice z práškovej zmesi.

Po tom, čo sa zóna reakcie rozšírila na počiatočnú vzdialenosť v dĺžke 30 mm, treba odmerať čas reakcie na úseku ďalších 200 mm.

Test sa uskutoční s referenčnou látkou a najmenej raz s každým stanoveným hmotnostným pomerom zmesi testovanej látky a celulózy.

Ak sa zistí, že maximálna rýchlosť horenia je podstatne vyššia než v prípade referenčnej zmesi, test možno zastaviť. V ostatných prípadoch sa musí test opakovať päťkrát v prípade každej z troch zmesí, ktoré dosiahli najvyššiu rýchlosť horenia.

Ak vzniklo podozrenie, že výsledok je klamlivo pozitívny, test sa musí zopakovať s použitím inertnej látky namiesto celulózy, ale s podobnou veľkosťou častíc, napríklad diatomitu. Alternatívne sa musí zmes testovanej látky s celulózu, ktorá dosiahla najvyššiu rýchlosť horenia, opakovane testovať v inertnej atmosfére (< 2 % v/ v obsahu kyslíka).

2. ÚDAJE

Z bezpečnostných dôvodov sa musí práve maximálna rýchlosť horenia – teda nie stredná hodnota – považovať za charakteristickú oxidačnú vlastnosť testovanej látky.

Pre vyhodnotenie je dôležitá najvyššia hodnota rýchlosti horenia danej zmesi v rámci šiestich testov.

Najvyššia hodnota rýchlosti horenia pre každú zmes oproti koncentrácii oxidantu sa nanesie na graf. Z grafu sa potom vyberie maximálna rýchlosť horenia.

Šesť nameraných hodnôt rýchlosti horenia v rámci jedného skúšobného kola, získaných zo zmesi s maximálnou rýchlosťou horenia, sa nesmie odchyľovať od hodnoty aritmetického stredu o viac ako 10 %, lebo inak bude potrebné zdokonaľiť metódy drvenia, mletia a miešania testovanej látky.

Treba porovnať dosiahnutú maximálnu rýchlosť horenia s maximálnou rýchlosťou horenia referenčnej zmesi (pozri 1.3).

Ak sa testy uskutočňujú v inertnej atmosfére, maximálna rýchlosť reakcie sa porovná s maximálnou rýchlosťou reakcie referenčnej zmesi v inertnej atmosfére.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

- identitu, zloženie, čistotu, obsah vlhkosti atď. testovanej látky,
- všetky úpravy testovanej vzorky (napr. drvenie, mletie, sušenie),

- druh zápalného zdroja použitého v teste,
- výsledky meraní,
- typ (formu) reakcie [napr. horenie plameňom na povrchu, horenie cez celú hmotu, všetky informácie týkajúce sa produktov (splodín) horenia (spalín) atď.],
- všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov vrátane opisu prudkosti reakcie (horenie plameňom, iskrenie, pomalé tlenie atď.) a približnej doby trvania v predbežnom bezpečnostnom/skríningovom teste pre testovanú, ako aj pre referenčnú látku,
- výsledky z testov s inertnou látkou, ak také existujú,
- výsledky z testov uskutočnených v inertnej atmosfére, ak také existujú.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Látku treba považovať za oxidačnú vtedy, keď:

- a) v predbežnom skríningovom teste došlo k prudkej reakcii;
- b) v hlavnom teste je maximálna rýchlosť horenia testovanej zmesi vyššia alebo sa rovná maximálnej rýchlosti horenia referenčnej zmesi celulózy a dusičnanu bárnateho.

Aby sa predišlo nesprávnym pozitívnym výsledkom, pri interpretácii výsledkov sa musia zohľadniť aj výsledky získané pri testovaní látky zmiešanej s inertným materiálom a/alebo pri testovaní v inertnej atmosfére.

4. ODKAZY

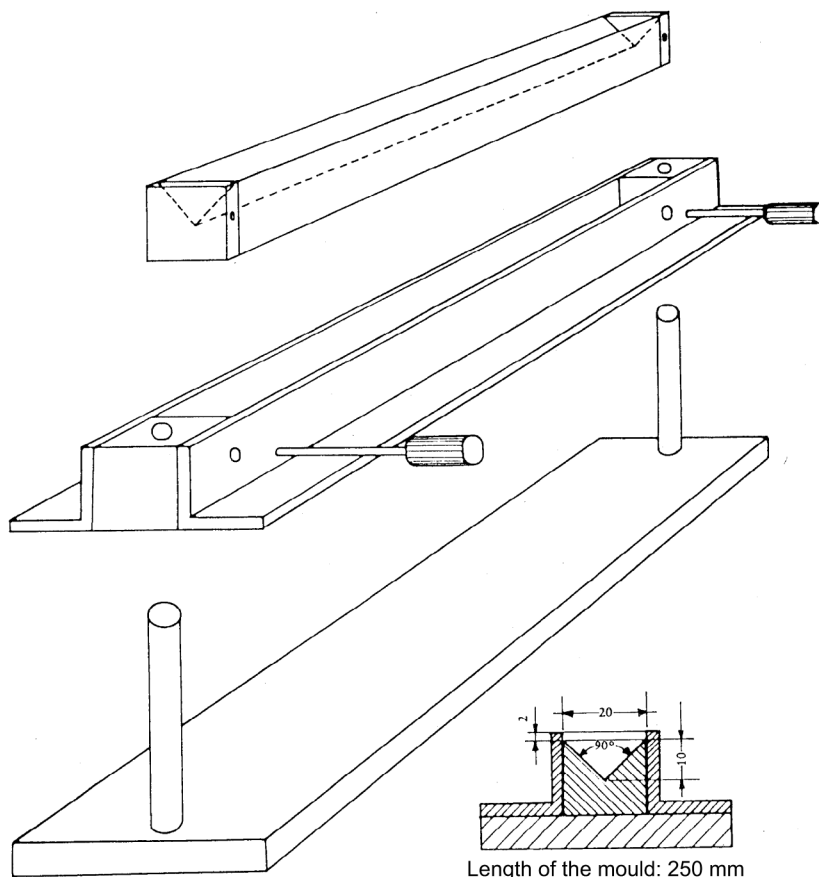
NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

Dodatok

Obrázok

Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z práškovitej skúšobnej látky

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Length of the mould: 250 mm
Material: aluminium

A.18. ČÍSELNÁ PRIEMERNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOSŤ A DISTRIBÚCIA MOLEKULOVÝCH HMOTNOSTÍ POLYMÉROV

1. METÓDA

Táto metóda, založená na gélovej permeačnej chromatografii, je prevzatá z OECD TG 118 (1996). Základné princípy a ďalšie technické informácie sú uvedené v odkaze (1).

1.1. ÚVOD

Vlastnosti polymérov sú veľmi rôznorodé, a nie je preto možné opísať jedinou metódu, ktorá by presne vymedzovala podmienky ich vzájomného oddeľovania a vyhodnocovania a ktorá by brala do úvahy všetky možnosti a špecifické situácie vyskytujúce sa pri separácii polymérov. Predovšetkým nie vždy sa dá pri komplexných polymérových systémoch použiť gélová permeačná chromatografia (GPC). Tam, kde nie je použitie GPC z praktického hľadiska možné, dajú sa molekulové hmotnosti stanoviť inými spôsobmi (pozri dodatok). V takýchto prípadoch je potrebné uviesť všetky podrobnosti a použitie konkrétnej metódy sa musí odôvodniť.

Opisovaná metóda je založená na norme DIN 55672 (1). Podrobné informácie o vykonaní pokusu a spôsobe vyhodnotenia údajov možno nájsť v uvedenej norme. Všetky zmeny, ktoré treba v metóde urobiť, musia byť odôvodnené. Možno použiť aj iné normy, no treba pri tom uviesť plný odkaz. Pri opisovanej metóde sa na kalibráciu používajú vzorky polystyrénu so známou polydispersitou a možno ju modifikovať tak, aby bola vhodná pre určité polyméry, napríklad pre polyméry rozpustné vo vode a pre vetvené polyméry s dlhými reťazcami.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Číselná priemerná molekulová hmotnosť M_n a hmotnostná priemerná molekulová hmotnosť M_w sa stanovili pomocou týchto rovníc:

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

kde:

H_i je hladina signálu detektora od základnej čiary pre retenčný objem V_i

M_i je molekulová hmotnosť polymérovej frakcie pri retenčnom objeme V_i a

n je počet dátových bodov.

Šírka distribúcie molekulových hmotností, ktorá je mierou disperzity systému, je daná pomerom M_w/M_n .

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

GPC je relatívna metóda, a preto je pri nej potrebné uskutočniť kalibráciu. Bežne sa na tento účel používajú lineárne skonštruované polystyrénové štandardy so známymi molekulovými hmotnosťami M_n a M_w a s úzkou oblasťou distribúcie molekulových hmotností. Kalibračnú krivku možno použiť na stanovenie molekulovej hmotnosti neznámej vzorky iba vtedy, ak sa pri separácii štandardov aj neznámej vzorky použijú úplne rovnaké podmienky.

Vzťahy stanovené medzi molekulovou hmotnosťou a elučným objemom sú platné iba pri špecifických podmienkach daného pokusu. Medzi tieto podmienky patria predovšetkým teplota, typ rozpúšťadla (alebo zmesi rozpúšťadiel), chromatografické podmienky a rozdeľovacia kolóna alebo systém kolón.

Takto stanovené molekulové hmotnosti vzoriek predstavujú pomerne hodnoty a označujú sa ako „molekulové hmotnosti polystyrénového ekvivalentu“. Znamená to, že v závislosti od štrukturálnych a chemických rozdielov medzi vzorkou a štandardmi sa môžu molekulové hmotnosti do väčšej alebo menšej miery od svojich absolútnych hodnôt odlišovať. Prípadné použitie iných štandardov, napríklad polyetylén glykolu, polyetylén oxidu, polymetylmetakrylátu alebo kyseliny polyakrylovej, je potrebné odôvodniť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Distribúciu molekulových hmotností vzorky aj priemerné molekulové hmotnosti (M_n , M_w) možno stanoviť pomocou metódy GPC. Metóda GPC predstavuje osobitný typ kvapalinovej chromatografie, pri ktorej dochádza k rozdeleniu vzorky na základe hydrodynamických objemov jej jednotlivých zložiek (2).

K oddeľovaniu dochádza pri prechode vzorky cez kolónu, ktorá je naplnená poréznym materiálom, ktorým je zvyčajne organický gél. Malé molekuly cez póry prechádzajú, zatiaľ čo veľké molekuly sa z objemu gélu vylučujú. Dráha, ktorú prekonávajú veľké molekuly, je preto kratšia a vylučujú sa ako prvé. Molekuly strednej veľkosti do niektorých pórov vnikajú a vylučujú sa z kolóny neskôr. Najmenšie molekuly s hydrodynamickým priemerom menším, ako je veľkosť pórov gélu, môžu vnikáť do všetkých z nich a vylučujú sa ako posledné.

V ideálnych podmienkach závisí oddeľovanie výlučne od veľkosti jednotlivých molekúl, hoci v praxi je ťažké vyhnúť sa aspoň určitému stupňu interferencie absorpčných vplyvov. Situácia sa môže zhoršiť aj v dôsledku nerovnomerného naliatia kolóny a mŕtvych objemov (2).

Detekciu možno uskutočňovať napríklad pomocou merania indexu lomu alebo UV-absorpcie eluátov. Na základe takýchto údajov je možné zostrojiť jednoduchú distribučnú krivku. Aby však bolo možné prisúdiť bodom na distribučnej krivke molekulové hmotnosti, je potrebné kolónu najprv okalibrovať. Robí sa to tak, že na kolónu sa nanesú polyméry so známou molekulovou hmotnosťou, v ideálnom prípade aj s približne podobnou štruktúrou, napríklad rozličné polystyrénové štandardy. Zvyčajne sa získava gaussovská krivka, ktorá býva niekedy na strane nízkych molekulových hmotností mierne pretiahnutá. Zvislá os udáva hmotnostné množstvo jednotlivých typov molekúl vyplavených z kolóny, vodorovná os je vyjadrená ako dekadický logaritmus molekulovej hmotnosti.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť (relatívna štandardná odchýlka, RSD) elučného objemu by mala byť lepšia ako 0,3 %. Ak sa chromatogram vyhodnocuje nezávisle od času a ak nesplnía horeuvedené kritérium, potom je potrebné zabezpečiť reprodukovateľnosť analýzy pomocou vnútorného štandardu (1). Polydisperzita závisí od molekulových hmotností štandardov. V prípade polystyrénových štandardov sú typické hodnoty takéto:

$$M_p < 2\,000 \quad M_w/M_n < 1,20$$

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \quad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \quad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p je molekulová hmotnosť štandardu v maxime píku)

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Príprava štandardných roztokov polystyrénu

Polystyrénové štandardy sa opatrným miešaním rozpustia vo zvolenom elučnom činidle. Pri príprave roztokov sa treba riadiť odporúčaniami výrobcov.

Voľba koncentrácií štandardov závisí od rozličných faktorov, napríklad od nanášacieho objemu, viskozity roztoku a citlivosti analytického detektora. Maximálny nanášací objem musí byť prispôbený dĺžke kolóny, aby nedochádzalo k jej preťaženiu. Zvyčajné nanášacie objemy pri analytických separáciách pomocou GPC sa pri kolóne s rozmermi 30 cm × 7,8 mm pohybujú v rozmedzí 40 až 100 µl. Je možné použiť aj vyššie objemy, nemali by však presiahnuť 250 µl. Pred samotnou kalibráciou kolóny je potrebné určiť optimálny pomer medzi nanášacím objemom a koncentráciou nanášaného vzorky.

1.6.2. Príprava roztoku vzorky

V zásade rovnaké požiadavky sa vzťahujú aj na prípravu roztokov vzoriek. Vzorka sa opatrným potriasaním rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle, napríklad v tetrahydrofuráne (THF). V žiadnom prípade ju nemožno rozpúšťať v ultrazvukovom kúpeli. V prípade potreby sa vzorka prečistí filtráciou cez membránový filter s veľkosťou pórov medzi 0,2 µm a 2 µm.

V záverečnej správe sa treba zmieniť o prítomnosti nerozpustených tuhých častíc, ktoré môžu byť dôsledkom prítomnosti vysokých molekulových hmotností. Percentuálne zastúpenie hmotnosti rozpustených častíček je potrebné určiť pomocou primeranej metódy. Roztoky sa musia použiť do 24 hodín.

1.6.3. Prístrojové vybavenie

- nádrž na rozpúšťadlo,
- zariadenie na odplynenie kvapalín (ak je potrebné),
- čerpadlo,
- tlmič pulzov kvapaliny (ak je potrebný),
- nanášací systém,
- chromatografické kolóny,
- detektor,
- prietokomer (ak je potrebný),
- zariadenie na zaznamenávanie a spracúvanie údajov,
- nádoba na odpad.

Treba zabezpečiť inertnosť systému GPC voči používaným rozpúšťadlám (napríklad použitím oceľových kapilár, ak je rozpúšťadlo THF).

1.6.4. Nanášací systém a systém na privádzanie rozpúšťadla

Buď pomocou automatického nanášacieho zariadenia, alebo ručne sa na kolónu nanesie v ostro vymedzenej zóne presne definované množstvo roztoku vzorky. Príliš rýchle vytiahnutie striekačky alebo stlačenie jej piestu pri ručnom nanášaní vzorky môže spôsobiť zmeny v pozorovanej distribúcii molekulových hmotností. Systém na privádzanie rozpúšťadla by nemal spôsobovať pulzové vlny, čo možno v ideálnom prípade zabezpečiť zaradením tlmiča pulzov. Prietok sa pohybuje okolo hodnoty 1 ml/min.

1.6.5. Kolóna

V závislosti od vzorky možno polymér charakterizovať buď pomocou jedinej kolóny, alebo pomocou viacerých za sebou spojených kolón. Ako náplň kolóny je komerčne dostupných viacero poréznych materiálov s definovanými vlastnosťami (napríklad veľkosť pórov, limit vylučovania). Voľba separačného gélu a dĺžky kolóny závisí od vlastností vzorky (hydrodynamické objemy, distribúcia molekulových hmotností) aj od špecifických podmienok pri separácii, napríklad od typu rozpúšťadla, teploty a rýchlosti prietoku (1) (2) (3).

1.6.6. Teoretické poschodia kolóny

Kolóna alebo kombinácia viacerých kolón používaných pri separácii musí byť charakterizovaná počtom teoretických poschodí. V prípade THF ako rozpúšťadla sa to robí tak, že na kolónu so známou dĺžkou sa nanesie roztok etylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Počet teoretických poschodí udáva táto rovnica:

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

kde:

N = počet teoretických poschodí

V_e = elučný objem v maxime píku

W = šírka píku pri základnej čiare

$W_{1/2}$ = šírka píku v polovici jeho výšky

1.6.7. Účinnosť separácie

Okrem počtu teoretických poschodí, ktorý určuje šírku pásu, hrá pri separácii úlohu aj jej účinnosť, ktorá sa určuje na základe strmosti kalibračnej krivky. Účinnosť separácie kolóny možno získať z tohto vzťahu:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{veľkosť plochy prierezu kolóny}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kde:

V_{e,M_x} = elučný objem polystyrénu s molekulovou hmotnosťou M_x
 $V_{e,(10M_x)}$ = elučný objem polystyrénu s desaťnásobne väčšou molekulovou hmotnosťou.

Rozlíšiteľnosť systému sa zvyčajne definuje takto:

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

kde:

V_{e1}, V_{e2} = elučné objemy dvoch polystyrénových štandardov v maxime píku
 W_1, W_2 = šírky píkov pri základnej čiare
 M_1, M_2 = molekulové hmotnosti v maxime píku (mali by sa líšiť o faktor 10)

R-hodnota kolóny musí byť vyššia ako 1.7 (4).

1.6.8. Rozpúšťadlá

Všetky rozpúšťadlá musia mať vysoký stupeň čistoty (pri THF je stupeň čistoty 99,5 %). Zásobník na rozpúšťadlo (v prípade potreby s atmosférou inertného plynu) musí byť dostatočne veľký, aby umožnil kalibráciu kolóny a analýzu niekoľkých vzoriek. Pred vháňaním do kolóny pomocou čerpadla treba rozpúšťadlo zbaviť plynov.

1.6.9. Kontrola teploty

Teplota kritických vnútorných zložiek systému (nanášacia slučka, detektor a hadičky) musí byť stála a musí zodpovedať zvolenému rozpúšťadlu.

1.6.10. Detektor

Účelom detektora je kvantitatívne zaznamenávanie koncentrácie vzorky, ktorá sa eluuje z kolóny. V záujme eliminácie zbytočného rozširovania píku by mala mať kyveta meracej komôrky detektora čo možno najmenší objem. S výnimkou detektorov založených na rozptyle svetla a viskozitných detektorov by nemal tento objem presahovať 10 μl . Ako detekčná metóda sa zvyčajne používa diferenciálna refraktometria. V závislosti od osobitných požiadaviek vzorky alebo elučného činidla však možno použiť aj iné typy detektorov, napríklad UV/VIS, IR, viskozitný detektor atď.

2. ÚDAJE A PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY**2.1. ÚDAJE**

Podrobné vyhodnocovacie kritériá a požiadavky vzťahujúce sa na zber a spracúvanie údajov sú uvedené v norme DIN (1).

Pri každej vzorke je potrebné uskutočniť dva nezávislé pokusy. Každý z nich treba analyzovať osobitne.

Pri každom meraní treba udať M_n , M_w , M_w/M_n a M_p . Treba výslovne uviesť, že namerané hodnoty sú pomerné hodnoty ekvivalentné použitým štandardom.

Po stanovení retenčných objemov alebo retenčných časov (podľa možnosti korigovaných použitím vnútorného štandardu) sa voči jednej z týchto hodnôt nanášajú do grafu hodnoty $\log M_p$ (M_p je maximum píku kalibračného štandardu). Na každú dekádu molekulových hmotností treba použiť aspoň dva kalibračné body, na zostrojenie celej kalibračnej krivky, ktorá by mala pokrývať odhadnutú molekulovú hmotnosť vzorky, je potrebných aspoň päť bodov. Koncový bod kalibračnej krivky v oblasti nízkych molekulových hmotností sa definuje pomocou n-hexylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Číselné priemerné a hmotnostné priemerné molekulové hmotnosti sa vo všeobecnosti stanovujú pomocou elektronického spracúvania údajov, založeného na vzorcoch uvedených v časti 1.2. V prípade manuálnej digitalizácie sa možno riadiť dokumentom ASTM D 3536-91 (3).

V prípade zadržania každého nerozpustného polyméru v kolóne je vysoko pravdepodobné, že jeho molekulová hmotnosť je vyššia ako molekulová hmotnosť rozpustnej frakcie. Výsledkom nevzatia tejto skutočnosti do úvahy môže byť nadhodnotenie zastúpenia zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér je uvedený v dodatku.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

2.2.1. Testovaná látka:

- dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prísady, nečistoty/prímesi),
- postup spracovania vzorky, zistené skutočnosti, problémy.

2.2.2. Prístroje a zariadenia:

- zásobník na elučné činidlo, inertný plyn, zariadenie na odplynenie elučného činidla,
- zloženie elučného činidla, nečistoty/prímesi,
- čerpadlo, tlmič pulzov kvapaliny, nanášací systém, rozdeľovacie kolóny (výrobca, všetky informácie o charakteristikách kolón, ako sú veľkosť pórov, druh separačného materiálu atď., počet, dĺžka a usporiadanie použitých kolón),
- počet teoretických poschodí kolóny (alebo kombinácie kolón), účinnosť rozdeľovania (rozlišovacia schopnosť systému),
- informácie o symetrii píkov,
- teploty kolóny, spôsob kontroly teploty,
- detektor (princíp merania, typ, objem meracej kvety),
- prietokomer, ak sa používa (výrobca, princíp merania),
- systém na zaznamenávanie a spracúvanie údajov (hardvér a softvér).

2.2.3. Kalibrácia systému:

- podrobný opis metódy použitej na zostrojenie kalibračnej krivky,
- informácie o kritériách kvality tejto metódy (napríklad korelačný koeficient, odchýlka súčtu štvorcov atď.),

- informácie o všetkých extrapoláciách, predpokladoch a aproximáciách, ktoré sa uskutočnili počas priebehu pokusu, a o vyhodnocovaní a spracúvaní údajov,
- všetky merania, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej krivky musia byť zdokumentované v tabuľke, ktorá obsahuje pre každý bod merania tieto informácie:
 - názov vzorky,
 - výrobcu vzorky,
 - charakteristické hodnoty štandardov, t. j. M_p , M_n , M_w a M_w/M_n , tak ako ich uvádza výrobca alebo ako boli odvodené z následných meraní, a tiež podrobnosti o metóde stanovenia,
 - nanášací objem a koncentráciu nanesej vzorky,
 - hodnotu M_p , ktorá bola použitá na kalibráciu,
 - elučný objem alebo opravený retenčný čas, nameraný pri maxime píku,
 - M_p vypočítaná v maxime píku,
 - percentuálna odchýlka vypočítanej hodnoty M_p od kalibračnej krivky.

2.2.4. Vyhodnotenie:

- vyhodnotenie na základe času: metódy použité na zabezpečenie požadovanej reprodukovateľnosti (korekčná metóda, vnútorné štandardy atď.),
- informácia o tom, či bolo vyhodnotenie vykonané na základe elučného objemu alebo retenčného času,
- informácie o limitoch vyhodnocovania, ak nebola vykonaná úplná analýza píku,
- opis vyrovnávacej/prekladacej metódy, ak sa pri grafickom vyhodnocovaní použila,
- príprava a predbežné spracovanie vzorky,
- prítomnosť nerozpustených častí, ak boli pozorované,
- objem (μl) a koncentrácia (mg/ml) nanesej vzorky,
- opis vplyvov, ktoré mohli spôsobiť odchýlku od ideálneho GPC profilu,
- podrobný opis modifikácií uskutočnených v testovacej metóde,
- podrobnosti o rozsahu chýb merania,
- všetky iné informácie a pozorované skutočnosti, ktoré by mohli byť významné z hľadiska interpretácie výsledkov.

3. ODKAZY

- (1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil I.

-
- (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.

Dodatok

Príklad ďalších metód na stanovenie číselnej priemernej molekulovej hmotnosti (M_n) polymérov

Prednostnou metódou na stanovenie M_n je gélová permeačná chromatografia (GPC), najmä ak je k dispozícii séria štandardov so štruktúrou podobnou štruktúre stanovovaného polyméru. V prípadoch, v ktorých je použitie GPC sprevádzané praktickými problémami, alebo ak je vopred známe, že polymér nespĺňa regulačné kritérium pre M_n , sú k dispozícii náhradné metódy ako napríklad:

1. Využitie koligatívnych vlastností**1.1. Ebullioskopia/kryoskopia:**

meria sa zvyšovanie bodu varu (ebullioskopia) alebo znižovanie bodu tuhnutia (kryoskopia) rozpúšťadla, do ktorého sa pridáva polymér. Metóda je založená na skutočnosti, že vplyv rozpusteného polyméru na bod varu/tuhnutia kvapaliny závisí od jeho molekulovej hmotnosti (1) (2).

Použitelnosť: $M_n < 20\,000$.

1.2. Znižovanie tlaku pár:

pri tejto metóde sa meria tlak pár zvolenej referenčnej kvapaliny pred a po pridaní známych množstiev polyméru (1) (2).

Použitelnosť: $M_n < 20\,000$ (teoreticky; v praxi je užitočnosť metódy obmedzená).

1.3. Membránová osmometria:

metóda využíva princíp osmózy, t. j. prirodzený sklon molekúl rozpúšťadla prechádzať cez polopriepustnú membránu zo zriedeného do koncentrovaného prostredia až po dosiahnutie rovnováhy. Pri pokuse má zriedený roztok nulovú koncentráciu a koncentrovaný roztok obsahuje polymér. Prechádzaním rozpúšťadla vzniká rozdiel tlaku, ktorého veľkosť závisí od koncentrácie a molekulovej hmotnosti polyméru (1) (3) (4).

Použitelnosť: M_n medzi 20 000 – 200 000.

1.4. Osmometria v plynnej fáze:

pri tejto metóde sa porovnáva rýchlosť odparovania čistého aerosólu rozpúšťadla s rýchlosťou odparovania najmenej troch aerosólov obsahujúcich rozličné koncentrácie polyméru (1) (5) (6).

Použitelnosť: $M_n < 20\,000$.

2. Analýza koncovej skupiny

Na použitie tejto metódy je potrebné poznať celkovú štruktúru polyméru a aj povahu skupín nachádzajúcich sa na konci reťazcov (tieto skupiny musia byť od hlavného reťazca polyméru odlíšiteľné napríklad pomocou NMR alebo titrácie/derivatizácie). Zo stanovenia molekulárnej koncentrácie koncových skupín, ktoré sa nachádzajú v polyméri, možno vypočítať hodnotu molekulovej hmotnosti (7) (8) (9).

Použitelnosť: M_n do 50 000 (s klesajúcou spoľahlivosťou).

3. Odkazy

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

-
- (2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
 - (3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
 - (4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, 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 Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
 - (9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139 – 2146.

A.19. **OBSAH ZLOŽIEK S NÍZKOU MOLEKULOVOU HMOTNOSŤOU V POLYMÉROCH**1. **METÓDA**

Táto metóda, založená na gélovej permeačnej chromatografii, je prevzatá z OECD TG 119 (1996). Základné princípy a ďalšie technické informácie sú uvedené v literárnych odkazoch.

1.1. **ÚVOD**

Vlastnosti polymérov sú veľmi rôznorodé, a nie je preto možné opísať jedinou metódu, ktorá by presne vymedzovala podmienky ich separácie a vyhodnocovania a ktorá by brala do úvahy všetky možnosti a špecifické situácie vyskytujúce sa pri separácii polymérov. Predovšetkým nie vždy možno pri komplexných polymérových systémoch použiť gélovú permeačnú chromatografiu (GPC). Tam, kde nie je použitie GPC z praktického hľadiska možné, dajú sa molekulové hmotnosti stanoviť inými spôsobmi (pozri dodatok). V takýchto prípadoch je potrebné uviesť všetky podrobnosti a použitie konkrétnej metódy treba odôvodniť.

Opisovaná metóda je založená na norme DIN 55672 (1). Podrobné informácie o vykonaní pokusu a spôsobe vyhodnotenia údajov možno nájsť v uvedenej norme. Všetky zmeny, ktoré treba v metóde urobiť, musia byť odôvodnené. Možno použiť aj iné normy, no treba pri tom uviesť plný literárny odkaz. Pri opisovanej metóde sa na kalibráciu používajú vzorky polystyrénu so známou polydisperzitou a možno ju modifikovať tak, aby bola vhodná pre určité polyméry, napríklad pre polyméry rozpustné vo vode a vetvené polyméry s dlhými reťazcami.

1.2. **DEFINÍCIE A JEDNOTKY**

Nízka molekulová hmotnosť je arbitrárne definovaná ako molekulová hmotnosť nižšia ako 1 000 daltonov.

Číselná priemerná molekulová hmotnosť M_n a hmotnostná priemerná molekulová hmotnosť M_w sa stanovili pomocou týchto rovníc:

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

kde:

H_i = hladina signálu detektora od základnej čiary retenčného objemu V_i ,

M_i = molekulová hmotnosť polymérovej frakcie pri retenčnom objeme V_i a n je počet dátových bodov

Šírka distribúcie molekulových hmotností, ktorá predstavuje mieru disperzity systému, je daná pomerom M_w/M_n .

1.3. **REFERENČNÉ LÁTKY**

GPC je relatívna metóda, a preto je potrebné uskutočniť kalibráciu. Bežne sa na tento účel používajú lineárne konštruované polystyrénové štandardy so známymi molekulovými hmotnosťami M_n a M_w a s úzkou oblasťou distribúcie. Kalibračnú krivku možno použiť na stanovenie molekulovej hmotnosti neznámej vzorky iba vtedy, ak sa pri separácii štandardov aj neznámej vzorky použijú úplne rovnaké podmienky.

Vzťahy stanovené medzi molekulovou hmotnosťou a elučným objemom sú platné iba pri špecifických podmienkach daného pokusu. Medzi tieto podmienky patrí predovšetkým teplota, typ rozpúšťadla (alebo zmesi rozpúšťadiel), chromatografické podmienky a rozdeľovacia kolóna alebo systém kolón.

Takto stanovené molekulové hmotnosti vzoriek predstavujú pomerné hodnoty a označujú sa ako „molekulové hmotnosti polystyrénového ekvivalentu“. Znamená to, že v závislosti od štrukturálnych a chemických rozdielov medzi vzorkou a štandardmi sa môžu molekulové hmotnosti do väčšej alebo menšej miery od svojich absolútnych hodnôt odlišovať. Prípadné použitie iných štandardov, napríklad polyetylén glykolu, polyetylén oxidu, polymetylmetakrylátu alebo kyseliny polyakrylovej, je potrebné odôvodniť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Distribúciu molekulových hmotností vzorky aj priemerné molekulové hmotnosti (M_n , M_w) možno stanoviť pomocou metódy GPC. Metóda GPC predstavuje osobitný typ kvapalinovej chromatografie, pri ktorej dochádza k rozdeleniu vzorky na základe hydrodynamických objemov jej jednotlivých zložiek (2).

K oddeľovaniu dochádza pri prechode vzorky cez kolónu, ktorá je naplnená poréznym materiálom, ktorým je zvyčajne organický gél. Malé molekuly cez póry prechádzajú, zatiaľ čo veľké molekuly sa z objemu gélu vylučujú. Dráha, ktorú prekonajú veľké molekuly, je preto kratšia a tieto sa vylučujú ako prvé. Molekuly strednej veľkosti do niektorých pórov vnikajú a vylučujú sa z kolóny neskôr. Najmenšie molekuly s hydrodynamickým priemerom menším, ako je veľkosť pórov gélu, môžu vnikáť do všetkých z nich a vylučujú sa ako posledné.

V ideálnych podmienkach závisí oddeľovanie výlučne od veľkosti jednotlivých molekúl, no v praxi býva ťažké vyhnúť sa aspoň určitej interferencii absorpčných vplyvov. Situácia sa môže zhoršiť aj v dôsledku nerovnomerného naliatia kolóny a mŕtvych objemov (2).

Detekciu možno uskutočňovať napríklad pomocou merania indexu lomu alebo UV-absorpcie eluátov. Na základe takýchto údajov je možné zostrojiť jednoduchú distribučnú krivku. Molekulové hmotnosti možno bodom na distribučnej krivke prisúdiť iba po predchádzajúcom okalibrovaní kolóny. Robí sa to tak, že na kolónu sa nanesú polyméry so známou molekulovou hmotnosťou, v ideálnom prípade aj s približne podobnou štruktúrou, napríklad rozličné polystyrénové štandardy. Zvyčajne sa získava gaussovská krivka, ktorá býva niekedy na strane nízkych molekulových hmotností mierne pretiahnutá. Zvislá os udáva hmotnostné množstvo jednotlivých typov molekúl vyplavených z kolóny, vodorovná os je vyjadrená ako dekadický logaritmus molekulovej hmotnosti.

Obsah zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou sa odvádza z tejto krivky. Výpočet môže byť presný iba vtedy, ak zložky s nízkou molekulovou hmotnosťou ekvivalentne na hmotnostnom základe zodpovedajú polyméru ako celku.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť (relatívna štandardná odchýlka, RSD) elučného objemu by mala byť lepšia ako 0,3 %. Ak sa chromatogram vyhodnocuje nezávisle od času a ak nesplňa vyššie uvedené kritérium, potom je potrebné zabezpečiť reprodukovateľnosť analýzy pomocou vnútorného štandardu (1). Polydisperezita závisí od molekulových hmotností štandardov. V prípade polystyrénových štandardov sú typické tieto hodnoty:

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

(M_p je molekulová hmotnosť štandardu v maxime píku)

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Príprava štandardných roztokov polystyrénu

Polystyrénové štandardy sa rozpustia opatrným miešaním vo zvolenom elučnom činidle. Pri príprave roztokov sa treba riadiť odporúčaniami výrobcov.

Voľba koncentrácií štandardov závisí od rozličných faktorov, napríklad od nanášacieho objemu, viskozity roztoku a citlivosti analytického detektora. Maximálny nanášací objem sa musí prispôsobiť dĺžke kolóny, aby nedochádzalo k jej preťaženiu. Zvyčajné nanášacie objemy pri analytických separáciách pomocou GPC sa pri kolóne s rozmerom 30 cm × 7,8 mm pohybujú v rozmedzí 40 µl až 100 µl. Je možné použiť aj vyššie objemy, nemali by však presiahnuť 250 µl. Pred samotnou kalibráciou kolóny je potrebné určiť optimálny pomer medzi nanášacím objemom a koncentráciou nanášaného vzorky.

1.6.2. Príprava roztoku vzorky

V zásade rovnaké požiadavky sa vzťahujú aj na prípravu roztokov vzoriek. Vzorka sa opatrným potriasaním rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle, napríklad v tetrahydrofuráne (THF). V žiadnom prípade ju nemožno rozpúšťať v ultrazvukovom kúpeli. V prípade potreby sa vzorka prečistí filtráciou cez membránový filter s veľkosťou pórov medzi 0,2 µm a 2 µm.

V záverečnej správe je potrebné zmieniť sa o prítomnosti nerozpustených tuhých častíc, ktoré môžu byť dôsledkom prítomnosti vysokých molekulových hmotností. Percentuálne zastúpenie hmotnosti rozpustených častočiek je potrebné určiť pomocou primeranej metódy. Roztoky sa musia použiť do 24 hodín.

1.6.3. **Korekcia na obsah nečistôt a prímiesí**

Zvyčajne je potrebné vykonať korekciu na obsah molekúl s molekulovou hmotnosťou $M < 1\,000$, ktorými prispievajú zložky nepolymérovej povahy (napríklad nečistoty, resp. prímiesi). Korekciu netreba vykonať v prípade, ak je ich nameraný obsah nižší ako 1 %. Na tento účel možno analyzovať priamo roztok polyméru alebo GPC eluát.

V prípadoch, v ktorých je eluát po prechode cez kolónu na vykonanie ďalšej analýzy príliš zriedený, treba ho koncentrovať. Môže byť potrebné eluát odpariť dosucha a opätovne rozpustiť. Koncentrovanie eluátu treba vykonať za takých podmienok, ktoré zaručia, že v ňom neprebehnú žiadne zmeny. Spracovanie eluátu po GPC závisí od analytickej metódy, ktorá sa použije na kvantitatívne stanovenie.

1.6.4. **Prístrojové vybavenie**

Prístrojové vybavenie GPC zahŕňa tieto zložky:

- nádrž na rozpúšťadlo,
- zariadenie na odplyňovanie kvapalín (ak je potrebné),
- čerpadlo,
- tlmič pulzov kvapaliny (ak je potrebný),
- nanášací systém,
- chromatografické kolóny,
- detektor,
- prietokomer (ak je potrebný),
- zariadenie na zaznamenávanie a spracúvanie údajov,
- nádoba na odpad.

Treba zabezpečiť inertnosť systému GPC voči používaným rozpúšťadlám (napríklad použitím ocelových kapilár, ak je rozpúšťadlo THF).

1.6.5. **Nanášací systém a systém na privádzanie rozpúšťadla**

Buď pomocou automatického nanášacieho zariadenia, alebo ručne sa na kolónu naniesie v ostro vymedzenej zóne definované množstvo roztoku vzorky. Príliš rýchle vytiahnutie striekačky alebo stlačenie jej piestu pri ručnom nanášaní vzorky môže spôsobiť zmeny v pozorovanej distribúcii molekulových hmotností. Systém na privádzanie rozpúšťadla by nemal spôsobovať pulzové vlny, čo možno v ideálnom prípade zabezpečiť zaradením tlmiča pulzov. Rýchlosť prietoku sa pohybuje okolo hodnoty 1 ml/min.

1.6.6. **Kolóna**

V závislosti od vzorky možno polymér charakterizovať buď pomocou jednej kolóny, alebo pomocou viacerých za sebou spojených kolón. Ako náplň kolóny je komerčne dostupných viacero poréznych materiálov s definovanými vlastnosťami (napríklad veľkosť pórov, limit vylučovania). Voľba separačného gélu a dĺžky kolóny závisí od vlastností vzorky (hydrodynamické objemy, distribúcia molekulových hmotností) aj od špecifických podmienok pri separácii, napríklad od typu rozpúšťadla, teploty a rýchlosti prietoku (1) (2) (3).

1.6.7. Teoretické poschodia kolóny

Kolóna alebo kombinácia viacerých kolón používaných pri separácii musí byť charakterizovaná počtom teoretických poschodí. V prípade THF ako rozpúšťadla sa to robí tak, že na kolónu so známou dĺžkou sa naniesie roztok etylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Počet teoretických poschodí udáva táto rovnica:

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

kde:

N = počet teoretických poschodí
 V_e = elučný objem v maxime píku
 W = šírka píku pri základnej čiare
 $W_{1/2}$ = šírka píku v polovici jeho výšky

1.6.8. Účinnosť separácie

Okrem počtu teoretických poschodí, ktorý určuje šírku pásu, hrá pri separácii úlohu aj jej účinnosť, ktorá sa určuje na základe strmosti kalibračnej krivky. Účinnosť separácie kolóny možno získať z tohto vzťahu:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{veľkosť plochy prierezu kolóny}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kde:

V_{e,M_x} = elučný objem polystyrénu s molekulovou hmotnosťou M_x
 $V_{e,(10M_x)}$ = elučný objem polystyrénu s desaťnásobne väčšou molekulovou hmotnosťou

Rozlíšiteľnosť systému sa zvyčajne definuje takto:

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

kde:

V_{e1}, V_{e2} = elučné objemy dvoch polystyrénových štandardov v maxime píku

W_1, W_2 = šírky píkov pri základnej čiare

M_1, M_2 = molekulové hmotnosti v maxime píku (mali by sa líšiť o faktor 10).

R-hodnota kolóny musí byť vyššia ako 1,7 (4).

1.6.9. Rozpúšťadlá

Všetky rozpúšťadlá musia mať vysoký stupeň čistoty (pri THF je stupeň čistoty 99,5 %). Zásobník na rozpúšťadlo (v prípade potreby s atmosférou inertného plynu) musí byť dostatočne veľký na to, aby umožnil kalibráciu kolóny a analýzu niekoľkých vzoriek. Pred vŕhaním do kolóny treba elučné činidlo zbaviť plynov pomocou čerpadla.

1.6.10. Kontrola teploty

Teplota kritických vnútorných zložiek systému (nanášacia slučka, detektor a hadičky) musí byť stála a musí zodpovedať zvolenému rozpúšťadlu.

1.6.11. Detektor

Účelom detektora je kvantitatívne zaznamenávanie koncentrácie vzorky eluovanej z kolóny. V záujme eliminácie zbytočného rozširovania píku by mala mať kveta meracej komôrky detektora čo možno najmenší objem. S výnimkou detektorov založených na rozptyle svetla a viskozitných detektorov by nemal presahovať

10 µl. Ako detekčná metóda sa zvyčajne používa diferenciálna refraktometria. Možno použiť aj iné typy detektorov (napríklad UV/VIS, IR, viskozitný detektor atď.), ak si to vyžaduje osobitný charakter vzorky alebo elučného činidla.

2. ÚDAJE A PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY

2.1. ÚDAJE

Podrobné vyhodnocovacie kritériá a požiadavky vzťahujúce sa na zber a spracúvanie údajov sú uvedené v norme DIN (1).

Pri každej vzorke je potrebné uskutočniť dva nezávislé pokusy. Každý z nich treba analyzovať osobitne.

Pri každom meraní treba udať M_n , M_w , M_w/M_n a M_p . Treba výslovne uviesť, že namerané hodnoty sú pomerne hodnoty, ekvivalentné použitým štandardom.

Po stanovení retenčných objemov alebo retenčných časov (podľa možnosti korigovaných použitím vnútorného štandardu) sa voči jednej z týchto hodnôt nanášajú do grafu hodnoty $\log M_p$ (M_p je maximum píku kalibračného štandardu). Na každú dekádu molekulových hmotností treba použiť aspoň dva kalibračné body, na zostrojenie celej kalibračnej krivky, ktorá by mala pokrývať odhadnutú molekulovú hmotnosť vzorky, je potrebných aspoň päť bodov. Koncový bod kalibračnej krivky v oblasti nízkych molekulových hmotností sa definuje pomocou n-hexylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Pri stanovení sa časť krivky zodpovedajúcej molekulovým hmotnostiam nižším ako 1 000 podľa potreby koriguje na nečistoty a prísady. Nanášacie krivky sa zvyčajne hodnotia pomocou elektronického spracovania údajov. V prípade manuálnej digitalizácie sa možno riadiť dokumentom ASTM D 3536-91 (3).

V prípade zadržania každého nerozpustného polyméru v kolóne je vysoko pravdepodobné, že jeho molekulová hmotnosť je vyššia ako molekulová hmotnosť rozpustnej frakcie. Výsledkom nevzatia tejto skutočnosti do úvahy môže byť nadhodnotenie zastúpenia zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér je uvedený v dodatku.

Distribučná krivka sa musí znázorniť vo forme tabuľky alebo graficky (diferenciálna frekvencia alebo kumulatívna frekvencia v percentách proti $\log M$). V grafickom znázornení by mal mať jeden poriadok molekulovej hmotnosti dĺžku 4 cm a výška maxima píku by mala byť asi 8 cm. Pri integrálnych distribučných krivkách by mala byť vzdialenosť medzi 0 % a 100 % na osi y približne 10 cm.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

2.2.1. Testovaná látka:

- dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prísady, nečistoty/prímesi),
- opis spracovania vzorky, zistené skutočnosti, problémy.

2.2.2. Prístroje a zariadenia:

- zásobník na elučné činidlo, inertný plyn, odplynenie elučného činidla, zloženie elučného činidla, nečistoty/prímesi,
- čerpadlo, tlmič pulzov kvapaliny, nanášací systém,
- rozdeľovacie kolóny (výrobca, všetky informácie o charakteristikách kolón, ako napríklad veľkosť pórov, druh separačného materiálu atď., počet, dĺžka a usporiadanie použitých kolón),
- počet teoretických poschodí kolóny (alebo kombinácie kolón), účinnosť rozdeľovania (rozlišovacia schopnosť systému),
- informácie o symetrii píkov,

- teplota kolóny, spôsob kontroly teploty,
- detektor (princíp merania, typ, objem kvety),
- prietokomer, ak sa používa (výrobca, princíp merania),
- systém na zaznamenávanie a spracúvanie údajov (hardvér a softvér).

2.2.3. Kalibrácia systému:

- podrobný opis metódy použitej na zostrojenie kalibračnej krivky,
- informácie o kritériách kvality tejto metódy (napríklad korelačný koeficient, odchýlka súčtu štvorcov atď.),
- informácie o všetkých extrapoláciách, predpokladoch a aproximáciách, ktoré sa uskutočnili počas priebehu pokusu a o vyhodnocovaní a spracúvaní údajov,
- všetky merania, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej krivky, musia byť
 - zdokumentované v tabuľke, ktorá obsahuje tieto informácie pre každý bod merania:
 - názov vzorky,
 - výrobcu vzorky, charakteristické hodnoty štandardov, t. j. M_p , M_n , M_w a M_w/M_n , tak ako ich uvádza výrobca alebo ako boli odvodené z následných meraní, ako aj podrobnosti o metóde stanovenia,
 - nanášací objem a koncentráciu nanesej vzorky,
 - hodnotu M_p , ktorá bola použitá na kalibráciu,
 - elučný objem alebo opravený retenčný čas nameraný pri maxime píku,
 - M_p vypočítanú v maxime píku,
 - percentuálnu odchýlku vypočítanej hodnoty M_p od kalibračnej krivky.

2.2.4. Informácie o obsahu polyméru s nízkou molekulovou hmotnosťou:

- opis metódy, ktorá sa použila na vykonanie analýzy, a spôsobu vykonania pokusu,
- informácie o percentuálnom obsahu molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou (w/w) vzhľadom na celkové množstvo vzorky,
- informácie o percentuálnom obsahu (w/w) nečistôt, prísad a iných molekúl nepolymérovej povahy vzhľadom na celkové množstvo vzorky.

2.2.5. Vyhodnotenie:

- vyhodnotenie na základe času: metódy použité na zabezpečenie požadovanej reprodukovateľnosti (korekčná metóda, vnútorné štandardy atď.),
- informácia o tom, či bolo vyhodnotenie vykonané na základe elučného objemu alebo retenčného času,
- informácie o limitoch vyhodnocovania, ak nebola vykonaná úplná analýza píku,

- opis vyrovnávacej/prekladacej metódy, ak sa použila,
- príprava a predbežné spracovanie vzorky,
- prítomnosť nerozpustených častí, ak boli pozorované,
- objem (μl) a koncentrácia (mg/ml) nanesej vzorky,
- opísanie vplyvov, ktoré mohli spôsobiť odchýlku od ideálneho GPC profilu,
- podrobné opísanie modifikácií uskutočnených v testovacej metóde,
- podrobnosti o rozsahu chýb merania,
- všetky iné informácie a pozorované skutočnosti, ktoré by mohli byť významné z hľadiska interpretácie výsledkov.

3. ODKAZY

- (1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- (2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- (3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size- Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

Dodatok

Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér

Prítomnosť nerozpustného polyméru vo vzorke spôsobuje úbytok hmotnosti počas analýzy GPC. Nerozpustný polymér sa nevratne zachytáva v kolóne alebo na filtri, zatiaľ čo rozpustná časť vzorky prechádza cez kolónu. Ak je možné určiť alebo merať prírastok indexu lomu (dn/dc) polyméru, potom je možné určiť aj veľkosť straty hmotnosti vzorky v kolóne. V takomto prípade sa uskutočňuje korekcia pomocou externej kalibrácie, pri ktorej sa na kalibrovanie odpovede refraktometra používajú štandardné materiály so známou koncentráciou a známym pomerom dn/dc . V príklade, ktorý je uvedený v ďalšom texte, sa ako štandard použil poly(metyl)metakrylát (PMMA).

Pri externej kalibrácii pre analýzu akrylových polymérov sa ako štandard používa roztok PMMA so známou koncentráciou v tetrahydrofuráne, ktorý sa podrobuje analýze pomocou GPC. Zo získaných údajov sa pomocou tohto vzťahu zistí konštanta refraktometra:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kde:

- K = konštanta refraktometra (v mikrovoltsekundách/ml),
- R = nameraná hodnota pre PMMA (v mikrovoltsekundách),
- C = koncentrácia štandardu PMMA (mg/ml),
- V = objem vzorky nanesej do refraktometra (ml) a
- dn/dc = prírastok indexu lomu pre roztok PMMA v tetrahydrofuráne (v ml/mg).

Pri štandardoch PMMA sa zvyčajne získavajú tieto údaje:

- R = 2 937 891
- C = 1,07 mg/ml
- V = 0,1 ml
- dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Výsledná hodnota $K = 3,05 \times 10^{11}$ sa potom použije na vypočítanie teoretickej odpovede detektora, ak ním prejde 100 % naneseného polyméru.

A.20. ROZPÚŠŤACIE/EXTRAKTÍVNE VLASTNOSTI POLYMÉROV VO VODE

1. METÓDA

Metóda je prevzatá z revidovanej verzie OECD TG 120 (1997). Ďalšie technické informácie sa nachádzajú v odkaze (1).

1.1. ÚVOD

Skôr ako sa pri určitých polyméroch, napríklad emulzných, bude dať použiť metóda, ktorá je opísaná v ďalšom texte, môže byť potrebné vykonať prípravné postupy. Metódu nemožno použiť pri kvapalných polyméroch a pri polyméroch, ktoré pri pokusných podmienkach reagujú s vodou.

V prípadoch, v ktorých nie je metóda praktická alebo uskutočniteľná, možno extrakčné vlastnosti polymérov stanovovať inými metódami, ktoré je potrebné podrobne opísať a ich použitie odôvodniť.

1.2. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Extraktívne vlastnosti polymérov vo vodnom prostredí sa stanovujú pomocou bankovej metódy (pozri A.6 Rozpustnosť vo vode, Banková metóda) s modifikáciami, ktoré sú opísané v ďalšom texte.

1.4. KVALITATÍVNE KRITÉRIÁ

Žiadne.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. Vybavenie

Pre metódu je potrebné toto vybavenie:

- drviace zariadenie, napríklad drvič, na získanie častí so známou veľkosťou,
- trepacie zariadenie s možnosťou kontrolovania teploty,
- systém membránových filtrov,
- primerané analytické zariadenie,
- štandardizované sítá.

1.5.2. Príprava vzorky

Reprezentatívna vzorka sa najprv rozdrví a pomocou primeraných sít upraví tak, aby sa získali častice s veľkosťou medzi 0,125 mm a 0,25 mm. Počas drvenia môže byť v záujme zachovania stability vzorky potrebné zabezpečiť chladenie. Materiály gumovitej konzistencie možno drviť pri teplote kvapalného dusíka (1).

Ak dosiahnutie uvedeného rozmeru častí nie je možné, potom je potrebné pokúsiť sa o dosiahnutie ich najmenšieho možného rozmeru a výsledok treba zaznamenať. V testovacom protokole je potrebné uviesť spôsob uskladnenia vzorky pred vykonaním testu.

1.5.3. Postup

Do každej z troch nádob so sklenou zátkou sa naváži 10 g testovanej látky a pridá sa k nim 1 000 ml vody. Ak spracúvanie 10 g testovanej látky nie je z praktického hľadiska možné, potom treba použiť jej najvyššie možné množstvo blízke tejto hodnote a objem vody mu treba príslušným spôsobom prispôsobiť.

Potom sa nádoby tesne uzavru a nechajú sa premiešavať pri teplote 20 °C. Treba pri tom použiť trepacie alebo miešacie zariadenie pracujúce pri stálnej teplote. Po 24 hodinách sa obsah každej nádoby scentrifuguje alebo prefiltruje a pomocou vhodnej analytickej metódy sa v čírej vodnej fáze stanoví koncentrácia polyméru. Ak pre vodnú fázu neexistujú vhodné analytické metódy, potom možno celkovú rozpustnosť/extraktivitu stanoviť na základe suchej hmotnosti zvyšku na filtri alebo suchej hmotnosti scentrifugovanej usadeniny.

Zvyčajne býva potrebné uskutočniť kvantitatívne rozlíšenie medzi nečistotami a prímiesami na jednej strane a medzi polymérnymi zložkami s nízkou molekulovou hmotnosťou na druhej strane. V prípade gravimetrických stanovení je tiež dôležité vykonať slepé meranie bez testovacej látky, aby sa vzali do úvahy prímiesi/nečistoty, ktoré sa do pokusu zanášajú počas jeho postupu.

Rozpúšťacie/extraktívne správanie polymérov vo vode pri 37 °C pH 2 a pH 9 možno stanoviť rovnakým spôsobom ako pri vykonávaní pokusu pri 20 °C. Požadované hodnoty pH možno dosiahnuť pridaním buď vhodných tlmivých roztokov, alebo vhodných kyselín, alebo zásad, ako sú kyselina chlorovodíková, kyselina octová, hydroxid sodný alebo draselný analytickej čistoty, alebo NH₃.

V závislosti od použitej analytickej metódy treba uskutočniť jeden alebo dva testy. Ak sú na priame analyzovanie obsahu polymérovej zložky vodnej fázy k dispozícii dostatočne špecifické metódy, potom by mal postačovať jediný z horeuvedených testov. Ak však takéto metódy k dispozícii nie sú a stanovenie rozpúšťacích/extraktívnych vlastností polyméru je obmedzené na nepriamu analýzu pomocou stanovenia iba celkového množstva organicky viazaného uhlíka (TOC) vo vodnom extrakte, potom je potrebné uskutočniť prídavný test. Takýto prídavný test je potrebné vykonať v triplikátoch s použitím desaťnásobne menšieho množstva polyméru a rovnakého množstva vody ako pri prvom teste.

1.5.4. Analýza

1.5.4.1. Testy vykonávané s jedným množstvom vzorky

Môžu existovať metódy na priamu analýzu polymerických zložiek vodnej fázy. Možno uvažovať taktiež o nepriamej analýze rozpustených/extrahovaných zložiek, pri ktorej sa stanovuje celkové množstvo rozpustných častí, ktoré sa upravuje na obsah zložiek nepolymérovej povahy.

Analýzu celkového obsahu polymérových látok vo vodnej fáze možno uskutočniť:

buď pomocou dostatočne citlivej metódy, napríklad:

- pomocou stanovenia TOC, pri ktorom sa vzorka najprv rozloží kyselinou persírovou alebo kyselinou dvojchrómovou za vzniku CO₂, po čom nasleduje stanovenie pomocou IR alebo chemickej analýzy,
- pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) alebo na ekvivalentnej metóde založenej na emisii indukčne naviazanej plazmy (Inductively Coupled Plasma, ICP) pri polyméroch s obsahom kremíka alebo kovov,
- pomocou UV absorpcie alebo spektrofotometrie pri arylových polyméroch,
- LC-MS pri nízkomolekulárnych vzorkách,

alebo pomocou vákuového odparenia vodného extraktu dosucha a následnou spektroskopickou (IR, UV atď.) alebo AAS/ICP analýzou zvyšku.

Ak analýza vodnej fázy ako takej nie je z praktického hľadiska uskutočniteľná, potom treba podrobiť vodný extrakt extrakcii organickým rozpúšťadlom nemiešateľným s vodou, čo môže byť napríklad chlórovaný uhlíkovodík. Rozpúšťadlo sa potom nechá odpariť a zvyšok sa analyzuje na obsah daného polyméru vyššie uvedeným spôsobom. Všetky zložky takéhoto zvyšku, ktoré sa vyhodnotia ako nečistoty alebo prímiesi, je potrebné od výsledku odrátať, aby sa stanovil stupeň rozpustnosti/extrakcie iba samotného polyméru.

Ak je množstvo takýchto materiálov vo vzorke relatívne veľké, potom môže byť potrebné podrobiť zvyšok napríklad analýze pomocou HPLC alebo GC. Umožní to odlíšiť nečistoty od prítomných monomérov alebo ich derivátov, čím sa umožní stanovenie ich skutočného obsahu.

V niektorých prípadoch môže postačovať jednoduché odparenie organického rozpúšťadla dosucha a odváženie zvyšku.

1.5.4.2. Testy vykonávané s dvoma množstvami vzorky

Všetky vodné extrakty sa analyzujú na prítomnosť TOC.

Nerozpustená/neextrahovaná časť vzorky sa podrobí gravimetrickému stanoveniu. Ak zostanú po centrifugácii alebo filtrácii obsahu každej banky prichytené na stenách nádoby zvyšky polyméru, potom treba nádobu oplachovať filtrátom dovtedy, kým sa na jej stenách nebude nachádzať žiaden viditeľný zvyšok. Filtrát sa potom podrobí opätovnej centrifugácii alebo filtrácii. Zvyšky, ktoré zostanú na filtri alebo v centrifugačnej kyvete, sa nechajú vysušiť pri 40 °C a odvážia sa. V sušení sa pokračuje až po dosiahnutie konštantnej hmotnosti.

2. ÚDAJE

2.1. TESTY VYKONÁVANÉ S JEDNÝM MNOŽSTVOM VZORKY

Je potrebné uviesť jednotlivé výsledky získané pri každej z troch baniek a priemerné hodnoty vyjadrené v jednotkách hmotnosti na objem roztoku (zvyčajne mg/l) alebo v jednotkách hmotnosti na hmotnosť vzorky polyméru (zvyčajne mg/g). Treba uviesť i straty hmotnosti vzorky (vypočítané ako hmotnosť rozpustenej látky vydelená hmotnosťou pôvodnej vzorky). Treba vypočítať relatívne štandardné odchýlky (RSD). Údaje pre celkové množstvo látky (polymér + hlavné prímеси atď.) a iba pre samotný polymér (t. j. po odčítaní príspevku vyššie uvedených prímеси) treba uviesť osobitne.

2.2. TESTY VYKONÁVANÉ S DVOMA MNOŽSTVAMI VZORKY

Treba uviesť jednotlivé hodnoty TOC vodných extraktov oboch pokusov vykonaných v triplikátoch, vyjadrené v jednotkách hmotnosti na objem rozpúšťadla (zvyčajne mgC/l), ako aj v jednotkách hmotnosti na hmotnosť pôvodnej vzorky (zvyčajne mgC/g).

Z neexistencie rozdielu medzi výsledkami získanými pri vysokom a nízkom pomere vzorka/voda môže vyplývať, že všetky extrahovateľné látky boli skutočne aj extrahované. V takomto prípade nebude priama analýza zvyčajne potrebná.

Treba uviesť jednotlivé hmotnosti zvyškov vyjadrené ako percentuálny podiel z pôvodnej hmotnosti vzorky. Pri každom z pokusov treba vypočítať priemerné hodnoty. Rozdiely medzi hodnotou 100 a zisteným percentuálnym zastúpením predstavujú percentuálne zastúpenie rozpustenej a extrahovateľnej hmoty v pôvodnej vzorke.

3. PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

3.1.1. Testovaná látka:

— dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prímеси, nečistoty, obsah nízkomolekulárnych zložiek).

3.1.2. Pokusné podmienky:

— opis použitých postupov a pokusných podmienok,

— opis analytických a detekčných metód.

3.1.3. Výsledky:

- výsledky týkajúce sa rozpustnosti/extrahovateľnosti v mg/l; jednotlivé a priemerné hodnoty extrakčných testov pri jednotlivých roztokoch, rozdelené podľa obsahu polyméru a nečistôt, prímiesí atď.,
- výsledky týkajúce sa rozpustnosti/extrahovateľnosti v mg/g polyméru,
- TOC hodnoty vodných extraktov, hmotnosť rozpusteného podielu a vypočítané percento, ak bolo stanovené,
- pH každej vzorky,
- informácie o hodnotách získaných pri slepých vzorkách,
- ak je potrebné, aj informácie o chemickej nestálosti testovanej látky počas samotného testovania aj analytických postupov,
- všetky informácie, ktoré môžu mať význam pre interpretovanie výsledkov.

4. ODKAZY

- (1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.

A.21. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (KVAPALINY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Táto metóda je určená na meranie potenciálu kvapalnej látky zvýšiť rýchlosť alebo intenzitu horenia horľavej látky alebo tvoríť s horľavou látkou zmes, ktorá sa samovoľne vznieti, keď sa obe látky dôkladne zmiešajú. Zakladá sa na teste OSN pre oxidujúce kvapaliny (1) a je s ním rovnocenná. Metóda A.21 je určená predovšetkým na splnenie požiadaviek nariadenia (ES) č. 1907/2006, vyžaduje sa však porovnanie iba s jednou referenčnou látkou. Ak sa očakáva, že výsledky testu sa použijú na iné účely, môže byť potrebné testovanie a porovnanie s ďalšími referenčnými látkami ⁽¹⁾.

Tento test nie je potrebné vykonať, ak sa na základe posúdenia štruktúrneho vzorca nepochybne potvrdí, že látka nie je schopná s horľavým materiálom exotermicky reagovať.

Pred uskutočnením testu je užitočné mať predbežné informácie o akýchkoľvek potenciálnych výbušných vlastnostiach látky.

Tento test nie je vhodný pre tuhé látky, plyny, výbušné alebo veľmi horľavé látky, alebo organické peroxidy.

Ak sú pre testovanú látku už dostupné výsledky testu OSN pre oxidujúce kvapaliny, tento test sa nemusí vykonať (1).

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Priemerný čas zvýšenia tlaku je priemerná hodnota nameraných časov, počas ktorých testovaná zmes spôsobí zvýšenie tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa nad atmosférický tlak.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Ako referenčná látka sa používa vodný roztok kyseliny dusičnej (65 hmotnostných %, čistota p. a. – analyticky čistý) ⁽²⁾.

Nepovinne, ak experimentátor predpokladá, že výsledky tejto skúšky sa môžu prípadne použiť na iné účely ⁽¹⁾, môže sa tiež vykonať skúška ďalších referenčných látok ⁽³⁾.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Kvapalina, ktorá sa má testovať, sa zmieša s vláknitou celulózou v hmotnostnom pomere 1:1 a zmes sa nadávkuje do tlakovej nádoby. Ak počas zmiešavania alebo dávkovania nastane samovoľné vznietenie, ďalšie testovanie nie je potrebné.

Ak samovznietenie nenastane, vykoná sa celý test. Zmes sa v tlakovej nádobe zahrieva a stanoví sa priemerný čas zvýšenia tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Tento čas sa porovná s priemerným časom zvýšenia tlaku pre zmes referenčnej látky (referenčných látok) a celulózy (1:1).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

V sérii piatich pokusov na jedenej látke by sa ani jeden výsledok nemal odlišovať od aritmetického priemeru o viac ako 30 %. Výsledky, ktoré sa odlišujú od priemeru o viac ako 30 %, sa vylúčia, zdokonalí sa postup zmiešavania a dávkovania a testovanie sa zopakuje.

⁽¹⁾ Napríklad v rámci transportných predpisov OSN.

⁽²⁾ Kyselina sa musí titrovať pred testovaním, aby sa potvrdila jej koncentrácia.

⁽³⁾ Napr.: 50 hmotnostných % (w/w) perchlórovej kyseliny a 40 hmotnostných % chlorečnanu sodného sa používa v odkaze (1).

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**1.6.1.1. *Horľavá látka*

Ako horľavý materiál sa používa vysušená, vláknitá celulóza s dĺžkou vlákien medzi 50 µm a 250 µm a priemernou hodnotou priemeru 25 µm ⁽¹⁾. Celulóza sa suší pri 105 °C počas 4 hodín do konštantnej hmotnosti vo vrstve s hrúbkou najviac 25 mm a počas chladnutia a pred použitím sa uchováva v exsíkátore so sušidlom. Obsah vody vo vysušenej celulóze by mal byť nižší ako 0,5 % suchej hmotnosti ⁽²⁾. Na to, aby sa dosiahla takáto hodnota, sa v prípade potreby čas sušenia predĺži ⁽³⁾. Počas skúšky je potrebné používať rovnakú šaržu celulózy.

1.6.1.2. *Aparatúra*

1.6.1.2.1. Tlaková nádoba

Používa sa tlaková nádoba. Nádoba pozostáva z ocelevej tlakovej nádoby valcovitého tvaru s dĺžkou 89 mm a vonkajším priemerom 60 mm (pozri obrázok 1). Dve plochy na protiahlých stranách sú opracované (zmenšujúci prierez nádoby na 50 mm), aby bolo možné namontovanie zážihového a odvodušňovacieho nástavca. Nádoba má vnútorný priemer 20 mm a na oboch koncoch je zoslabená do hĺbky 19 mm a opatrená závitom 1" (1 palec) podľa BSP (British Standard Pipe) alebo jeho metrickým ekvivalentom. Snímač tlaku v tvare bočného ramena je priskrutkovaný k zaoblenému povrchu tlakovej nádoby vo vzdialenosti 35 mm od jedného konca a v 90° uhle k opracovaným stranám. Príslušný otvor je vyvŕtaný do hĺbky 12 mm a na konci bočného ramena vybavený závitom na 1/2 podľa BSP (alebo jeho metrickým ekvivalentom). V prípade potreby sa na zabezpečenie plynutesného utesnenia upevní inertné tesnenie. Bočné rameno vyčnieva 55 mm z tlakovej nádoby a má 6 mm vývrt. Koniec bočného ramena je zoslabený a opatrený závitom na pripojenie membránového snímača tlaku. Môže sa použiť akékoľvek zariadenie na meranie tlaku, ktoré je odolné voči pôsobeniu horúcich plynov alebo produktov rozkladu a na rýchlosť zvýšenia tlaku v rozsahu 690 – 2 070 kPa dokáže reagovať za najviac 5 ms.

Koniec tlakovej nádoby, ktorý je ďalej od bočného ramena, je uzatvorený zážihovým nástavcom, ktorý je vybavený dvoma elektródami, jednou izolovanou od telesa nástavca a druhou uzemnenou k nástavcu. Druhý koniec tlakovej nádoby je uzatvorený poistným diskom (kritický tlak približne 2 200 kPa), upevneným v uzatváracom nástavci s 20 mm vývrtom. V prípade potreby sa na zabezpečenie plynutesného utesnenia zážihového nástavca použije inertné tesnenie. Počas používania je zariadenie udržiavané v správnej polohe stojanom (obrázok 2). Zvyčajne sa skladá z podložky z mäkkej ocele s rozmermi 235 mm × 184 mm × 6 mm a zo 185 mm dlhého štvorcového dutého profilu (ďalej len „Š.D.P.“) s rozmermi 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Profil je na protiahlých stranách jedného konca Š.D.P. zrezaný tak, že vznikne konštrukcia s dvoma plochými ramenami, ktoré prečnievajú o 86 mm nad celým rámom profilu. Konce plochých ramien sú zrezané pod uhlom 60° k horizontálnej rovine a privarené k podložke. Na jednej strane vrchného konca základne profilu je vyrezaný 22 mm široký a 46 mm hlboký otvor tak, aby sa pri vložení tlakovej nádoby do rámu profilu stojana dostal prvý zážihový nástavec a aby bočné rameno zapadlo do otvoru. Kus ocele, široký 30 mm a hrubý 6 mm, ktorý má funkciu rozperry, je privarený k dolnej časti vnútornej plochy rámu profilu. Na upevnenie tlakovej nádoby slúžia dve 7 mm prítláčne skrutky, ktoré sú priskrutkované do protiahle strany. Zospodu podopierajú tlakovú nádobu dva 12 mm široké pásy 6 mm hrubej ocele, privarené k bočným stranám dosadajúcim na rám profilu.

1.6.1.2.2. Systém zážihu

Systém zážihu pozostáva z 25 cm dlhého Ni/Cr drôtu, ktorý má priemer 0,6 mm a odpor 3,85 ohm/m. Drôt má špirálovitý tvar s vnútorným priemerom 5 mm a je pripojený k elektródam zážihového nástavca. Špirála musí byť usporiadaná jedným zo spôsobov zobrazených na obrázku 3. Vzdialenosť medzi dnom nádoby a spodnou časťou zážihovej špirály je 20 mm. Ak nie sú elektródy nastaviteľné, konce zážihového drôtu medzi špirálou a dnom nádoby musia byť izolované keramickým obalom. Drôt sa rozžeravuje konštantným prúdom najmenej 10 A.

1.6.2. **Vykonanie testu ⁽⁴⁾**

Kompletne zmontovaná aparatúra so snímačom tlaku a zážihovým systémom, ale bez vloženého poistného disku, sa pripevní na stojan tak, že zážihový nástavec bude v dolnej časti. V sklenenej kadičke sa sklenenou tyčinkou premieša 2,5 g testovanej kvapaliny s 2,5 g sušenej celulózy ⁽⁵⁾. Z bezpečnostných dôvodov sa miešanie vykonáva s ochranným štítom, ktorý je medzi experimentátorom a zmesou. Ak sa počas miešania alebo plnenia zmes vznieti, ďalšie testovanie nie je potrebné. Zmes sa pridáva do tlakovej nádoby v malých

⁽¹⁾ t. j. celulóзовý prášok z Whatmanovej stĺpcovej chromatografie CF 11, katalógové č. 4021 050.

⁽²⁾ Potvrdené (napr.) Karl-Fisherovou titráciou.

⁽³⁾ Alternatívne sa môže tento obsah vody tiež dosiahnuť (napr.) zahriatím na 105 °C vo vákuu na 24 h.

⁽⁴⁾ So zmesami oxidáčnych činidiel s celulózou sa musí zaobchádzať ako s potenciálne explozívnymi a treba s nimi manipulovať s náležitou pozornosťou.

⁽⁵⁾ V praxi sa to dá dosiahnuť prípravou zmesi testovanej kvapaliny s celulózou v pomere 1:1 vo väčšom množstve, ako je potrebné pre test, a do tlakovej nádoby sa nadávkuje 5 g ± 0,1 g. Pre každý test osobitne sa pripraví čerstvá zmes.

dávkach poklepávaním do tlakovej nádoby, pričom sa musí dávať pozor na to, aby zmes dostatočne pokryla zážihovú špirálu a bola s ňou v dobrom kontakte. Je dôležité, aby sa špirála počas dávkovania nezdeformovala, pretože by to mohlo viesť k chybným výsledkom ⁽¹⁾. Do uzatváracieho nástavca sa vloží poistný disk a nástavec sa pevne zaskrutkuje. Naplnená nádoba sa presunie do stojanu tak, aby bol poistný disk v hornej polohe, umiestni sa vo vhodnom vystuženom digestore alebo v spaľovacej komore. Do zážihového nástavca sa pripojením na externú zásuvku pustí prúd 10 A. Čas medzi začiatkom miešania a zapnutím prúdu by nemal presiahnuť 10 minút.

Signál z tlakového snímača sa zaznamenáva na vhodný systém, ktorý umožňuje meranie a vytváranie permanentného záznamu získaného časového profilu zmeny tlaku (napr. záznamník spojený so zapisovačom). Zmes sa zahrieva dovtedy, kým nepraskne poistný disk alebo neuplynie aspoň 60 s. Ak poistný disk nepraskne, zmes sa pred opatrným rozobratím aparatury nechá vychladnúť, pričom je potrebné dodržiavať bezpečnostné opatrenia pre prípad možného výskytu zvýšeného tlaku. Vykonáva sa päť pokusov s testovanou látkou a referenčnou látkou (referenčnými látkami). Zaznamenáva sa čas potrebný na zvýšenie tlaku zo 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku.

V niektorých prípadoch môžu chemické reakcie látok, ktoré nesúvisia s ich oxidačnými vlastnosťami, spôsobiť (príliš vysoké alebo príliš nízke) zvýšenie tlaku. V takýchto prípadoch môže byť potrebné kvôli objasneniu povahy reakcie zopakovať test s inertnou látkou namiesto celulózy, napr. diatomit (kremelina).

2. ÚDAJE

Čas zvýšenia tlaku pre testovanú látku a referenčnú látku (referenčné látky). Čas zvýšenia tlaku pri testoch s inertnou látkou, ak sa realizovali.

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku pre testovanú látku a referenčnú látku (referenčné látky).

Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku pri testoch s inertnou látkou, ak sa realizovali.

Niektoré príklady výsledkov sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady výsledkov ^(a)

Látka ^(b)	Priemerný čas zvýšenia tlaku pre zmes s celulózou v pomere 1:1 (ms)
Dichróm aniónny, nasýtený vodný roztok	20 800
Dusičnan vápenatý, nasýtený vodný roztok	6 700
Dusičnan železitý, nasýtený vodný roztok	4 133
Chloristan lítny, nasýtený vodný roztok	1 686
Chloristan horečnatý, nasýtený vodný roztok	777
Dusičnan nikelnatý, nasýtený vodný roztok	6 250
Kyselina dusičná, 65 %	4 767 ^(c)
Kyselina chloristá, 50 %	121 ^(c)
Kyselina chloristá, 55 %	59
Dusičnan draselný, 30 % vodný roztok	26 690
Dusičnan strieborný, nasýtený vodný roztok	^(d)
Chlorečnan sodný, 40 % vodný roztok	2 555 ^(c)

⁽¹⁾ Je potrebné zabrániť najmä kontaktu medzi susednými závitmi špirály.

Látka ^(b)	Priemerný čas zvýšenia tlaku pre zmes s celulózou v pomere 1:1 (ms)
Dusičnan sodný, 45 % vodný roztok	4 133
<i>Inertná látka</i>	
Voda: celulóza	^(d)
^(a) Priemerná hodnota z medzilaboratórnych porovnávacích skúšok. ^(b) Maximálny tlak 2 070 kPa nedosiahnutý. ^(c) Nasýtené roztoky sa pripravujú pri teplote 20 °C. ^(d) Pozri odkaz (1) na interpretáciu výsledkov podľa transportných predpisov OSN pri použití rôznych referenčných látok.	

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste obsahuje tieto informácie:

- identifikáciu, zloženie, čistotu atď. testovanej látky,
- koncentráciu testovanej látky,
- postup sušenia použitej celulózy,
- obsah vody v použitej celulóze,
- výsledky meraní,
- výsledky testov s inertnou látkou, ak existujú,
- vypočítané priemerné časy zvýšenia tlaku,
- všetky odchýlky od tejto metódy a ich dôvody,
- všetky doplňujúce poznámky a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV ⁽¹⁾

Výsledky testov sa vyhodnotia na základe:

- a) toho, či sa zmes testovanej látky a celulózy samovoľne vznieti, a
- b) porovnania priemerného času potrebného na zvýšenie tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa s časom potrebným na zvýšenie tlaku v prípade referenčnej látky (referenčných látok).

Kvapalná látka sa pokladá za oxidačné činidlo, keď:

- a) sa zmes látky a celulózy v hmotnostnom pomere 1:1 samovoľne vznieti alebo

⁽¹⁾ Pozri odkaz (1) na interpretáciu výsledkov podľa transportných predpisov OSN pri použití rôznych referenčných látok.

- b) zmes látky a celulózy v hmotnostnom pomere 1:1 má priemerný čas zvýšenia tlaku menší alebo rovnaký ako priemerný čas zvýšenia tlaku zmesi vodného roztoku kyseliny dusičnej a celulózy (65 hmotnostných %).

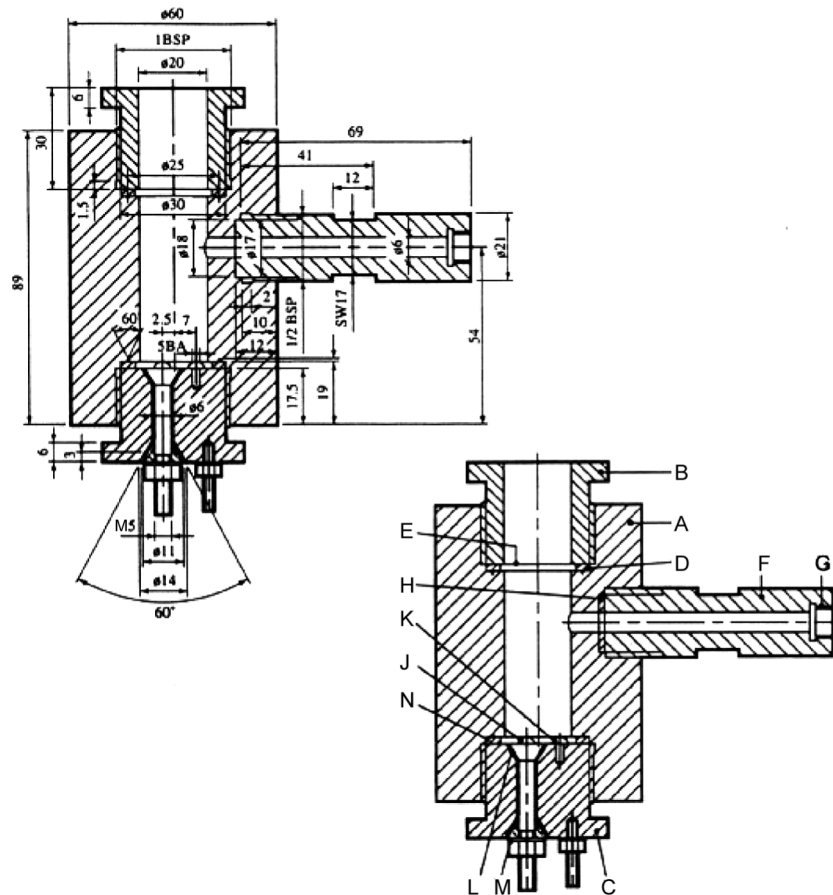
Na to, aby bol vylúčený falošný pozitívny výsledok, sa v prípade potreby pri interpretácii výsledkov zoberú do úvahy aj výsledky získané pri testovaní látky s inertným materiálom.

4. ODKAZY

- (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, 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Obrázok 1

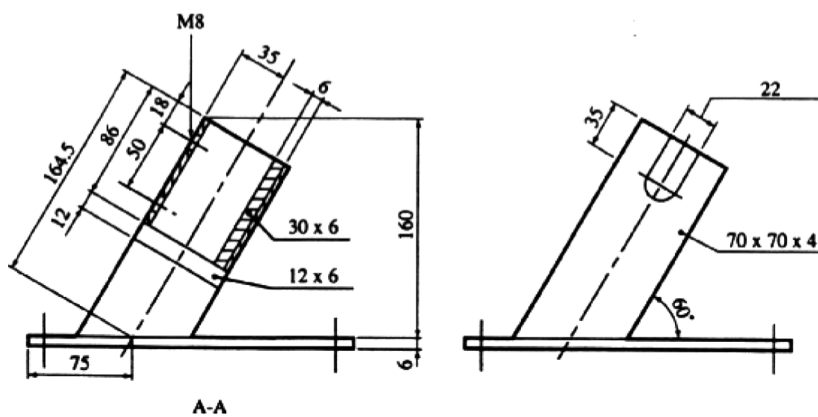
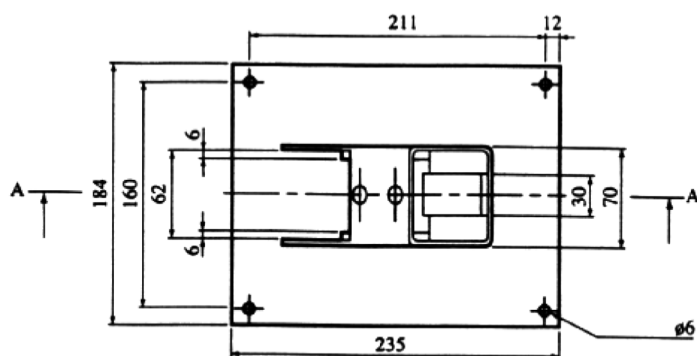
Tlaková nádoba



(A) Telo tlakovej nádoby	(B) Uzatvárací nástavec s poistným diskom	(C) Zážihový nástavec
(D) Podložka z mäkkého olova	(E) Poistný disk	(F) Bočné rameno
(G) Hlava snímača tlaku	(H) Tesnenie	(J) Izolovaná elektróda
(K) Uzemňovacia elektróda	(L) Izolácia	(M) Oceľový kónus
(N) Deformačná drážka tesnenia		

Obrázok 2

Stojan



Obrázok 3

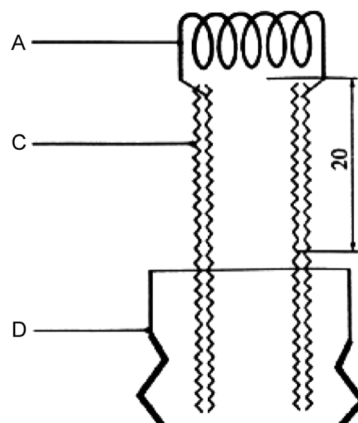
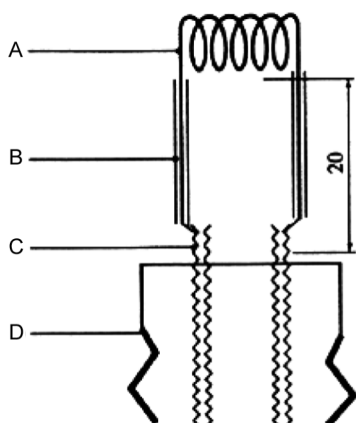
Systém zážihu

(A) Zážihová špirála

(B) Izolácia

(C) Elektródy

(D) Zážihový nástavec



Poznámka: Môže sa použiť ktorákoľvek z týchto zostáv.

ČASŤ B: METÓDY NA STANOVENIE TOXIKOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ A INÉHO ÚČINKU NA ZDRAVIE

OBSAH

VŠEOBECNÝ ÚVOD	143
B.1a. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA STABILNEJ DÁVKY	145
B.1b. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA TRIEDY AKÚTNEJ TOXICITY	158
B.2. AKÚTNA TOXICITA (INHALAČNÁ)	174
B.3. AKÚTNA TOXICITA (DERMÁLNA)	178
B.4. AKÚTNA TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE KOŽE	182
B.5. AKÚTNA TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE OKA	191
B.6. PODRÁŽDENIE POKOŽKY	202
B.7. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE PO ORÁLNEJ APLIKÁCII	210
B.8. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (INHALAČNÁ)	216
B.9. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (DERMÁLNA)	221
B.10. MUTAGÉNNOSŤ – IN VITRO TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAFCOV	225
B.11. MUTAGÉNNOSŤ – IN VIVO TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY V KOSTNEJ DRENI CICAFCOV .	233
B.12. MUTAGÉNNOSŤ – IN VIVO TEST MIKROJADRA ERYTROCYTU U CICAFCOV	240
B.13/14. MUTAGÉNNOSŤ: BAKTERIÁLNY TEST REVERZNÝCH MUTÁCIÍ	248
B.15. TESTOVANIE MUTAGÉNNOSTI A SKRÍNING KARCINOGENNOSTI – SKÚŠKA NA GÉNOVÚ MUTÁCIU U <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	256
B.16. MITOTICKÁ REKOMBINÁCIA – <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	259
B.17. MUTAGÉNNOSŤ – IN VITRO TEST MUTÁCIÍ GÉNOV BUNIEK CICAFCOV	262
B.18. POŠKODENIE A OPRAVA DNA – NEPROGRAMOVANÁ SYNTÉZA DNA – BUNKY CICAFCOV IN VITRO	271
B.19. TEST VÝMENY SESTERSKÝCH CHROMATÍD IN VITRO	275
B.20. TEST NA ZACHYTENIE RECESÍVNYCH LETÁLNYCH MUTÁCIÍ VIAZANÝCH NA POHLAVIE PRI <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	279
B.21. TESTY BUNKOVEJ TRANSFORMÁCIE CICAFCÍCH BUNIEK IN VITRO	282
B.22. DOMINANTNÝ LETÁLNY TEST U HLODAFCOV	285
B.23. TEST SPERMATOGONÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAFCOV	288
B.24. SPOT TEST U MYŠÍ	295

B.25.	DEDIČNÁ TRANSLOKÁCIA U MYŠÍ	298
B.26.	TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U HLODAVCOV/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH/	302
B.27.	TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U NEHLODAVCOV	308
B.28.	ŠTÚDIA SUBCHRONICKEJ DERMÁLNEJ TOXICITY PO 90-DŇOVEJ OPAKOVANEJ KOŽNEJ APLIKÁCII U HLODAVCOV	314
B.29.	TEST TOXICITY SUBCHRONICKEJ INHALÁCIE 90-DŇOVÝ TEST OPAKOVANÉHO INHALAČNÉHO VYSTAVENIA NA HLODAVCOCH	318
B.30.	TEST CHRONICKEJ TOXICITY	323
B.31.	ŠTÚDIA PRENATÁLNEJ VÝVOJOVEJ TOXICITY	329
B.32.	TEST KARCINOGENITY	338
B.33.	KOMBINOVANÝ TEST CHRONICKEJ TOXICITY/KARCINOGENITY	344
B.34.	JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY	351
B.35.	DVOJGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY	355
B.36.	TOXIKOKINETIKA	365
B.37.	ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOFOROVÝCH LÁTOK PO AKÚTNEJ EXPOZÍCII ICH ÚČINKOM	369
B.38.	ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOFOROVÝCH LÁTOK PRI 28-DŇOVEJ ŠTÚDII OPAKOVANEJ DÁVKY	374
B.39.	TEST NEPLÁNOVANEJ SYNTÉZY DNA (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS – UDS) S PEČEŇOVÝMI BUNKAMI CICAFCOV <i>IN VIVO</i>	378
B.40.	POLEPTANIE KOŽE <i>IN VITRO</i> : TEST POMOCOJ TRANSKUTÁNNÉHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)	384
B.40a.	POLEPTANIE KOŽE <i>IN VITRO</i> : TEST POMOCOJ MODELU ĽUDSKEJ KOŽE	394
B.41.	TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU <i>IN VITRO</i>	400
B.42.	SENZIBILIZÁCIA POKOŽKY: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN	414
B.43.	ŠTÚDIA NEUROTOXICITY U HLODAVCOV	420
B.44.	ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA <i>IN VIVO</i>	432
B.45.	ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA <i>IN VITRO</i>	438

VŠEOBECNÝ ÚVOD**A. KLASIFIKÁCIA TESTOVANEJ LÁTKY**

Pred začatím toxikologickej štúdie musí byť známe zloženie testovanej látky, hlavné nečistoty a podstatné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane jej stability.

Fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky poskytujú dôležité informácie pri výbere spôsobu použitia, plánovaní každého detailu štúdie a pri manipulácii s testovanou látkou a pri jej skladovaní.

Začatie štúdie musí predchádzať vývoj analytickej metódy pre kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie testovanej látky (vrátane hlavných nečistôt, ak je možné) v testovanom a biologickom materiáli.

V správe z testu musia byť uvedené všetky informácie týkajúce sa identifikácie, fyzikálno-chemických vlastností, čistoty a správania testovanej látky.

B. STAROSTLIVOSŤ O ZVIERATÁ

Pri toxikologickom testovaní je dôležitá prísna kontrola životných podmienok a vhodnej starostlivosti o zvieratá.

i) Podmienky bývania

Životné podmienky v experimentálnych zverincoch alebo ohradách musia byť vhodné pre testovaný druh. Pre potkany, myši a morčatá je vhodná teplota miestnosti $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ s relatívnou vlhkosťou od 30 % do 70 %. Pre králiky je to teplota $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ s relatívnou vlhkosťou od 30 % do 70 %.

Niektoré experimentálne postupy sú najmä citlivé na teplotu a v týchto prípadoch bývajú podrobnosti uvedené v opise metódy testovania. Pri všetkých sledovaniach toxických účinkov sa sleduje tiež teplota a vlhkosť, zaznamenáva sa a uvádza sa v záverečnej správe štúdie.

Osvetlenie má byť umelé v intervaloch 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Detaily o vlastnostiach osvetlenia sa zaznamenávajú a uvádzajú v záverečnej správe štúdie.

Zvieratá sa držia jednotlivo alebo sú umiestnené v klietkach v malých skupinách toho istého pohlavia, iba ak je to v metóde uvedené; v jednej klietke nesmie byť umiestnených viac ako päť zvierat.

V správe k pokusom so zvieratami sa uvádza spôsob ich umiestnenia v klietkach, počet zvierat v každej klietke aj počas expozície chemikáliou aj počas nasledujúceho obdobia pozorovania.

ii) Podmienky kŕmenia

Strava musí vyhovovať výživovým požiadavkám testovaného druhu. Ak sa testované látky podávajú zvieratám v strave, môžu sa nutričné hodnoty znížiť interakciou medzi látkou a zložkami potravy. Pri interpretácii výsledkov testu sa musí vziať do úvahy možnosť takýchto reakcií. Bežná laboratórna strava sa podáva s neobmedzeným prídelením pitnej vody. Výber potravy môže byť ovplyvnený potrebou zaistenia vhodného prídavku testovanej látky pri použití danej metódy.

Kontaminanty potravy, o ktorých je známe, že vplyvajú na toxicitu, nesmú byť prítomné v koncentráciách, ktoré by rušili testovanie.

C. ALTERNATÍVNE TESTOVANIE

Európska únia sa zaviazala podporiť vývoj a hodnotenie alternatívnych postupov, ktoré poskytnú takú istú úroveň informácií ako súčasné štúdie na zvieratách, ale ktoré používajú menej zvierat, spôsobujú menej utrpenia alebo sa vyhýbajú ich použitiu úplne.

Tieto metódy, tak ako sa zavádzajú, treba brať do úvahy všade tam, kde možno uskutočniť charakterizáciu rizika a následnú klasifikáciu a opísanie vlastného rizika.

D. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Po vyhodnotení a interpretovaní testov sa berú do úvahy obmedzenia v rozsahu, v ktorom boli výsledky štúdií na zvieratách a štúdií *in vitro* extrapolované priamo na človeka, a z toho dôvodu sa dôkaz nepriaznivého účinku na človeka, pokiaľ je prístupný, používa na potvrdenie výsledkov testovania.

E. ODPORÚČANÁ LITERATÚRA

Väčšina uvedených metód sa vyvíja v rámci programu OECD pre zásady testovania a uskutočňuje sa v zhode so zásadami správnej laboratórnej praxe s cieľom zaistenia „vzájomnej akceptácie údajov“ v takom rozsahu, ako je len možné.

Ďalšie informácie sa dajú získať v odkazoch uvedených v zásadách OECD a v príslušnej inde uvedenej literatúre.

B.1a. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA STABILNEJ DÁVKY

1. METÓDA

Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 420 (2001).

1.1. ÚVOD

Tradičné metódy na hodnotenie akútnej toxicity využívajú smrť zvierat ako konečný bod. V roku 1984 Britská toxikologická spoločnosť navrhla novú koncepciu testovania akútnej toxicity založenú na podávaní série stabilných dávok (1). Koncepcia nevyužíva smrť zvierat ako konečný bod a vychádza namiesto toho z pozorovaní jasných príznakov toxicity pri jednej zo série stabilných dávok. Po validačných štúdiách *in vivo* v Spojenom kráľovstve (2) a aj v medzinárodných štúdiách *in vivo* sa tento postup prijal ako testovacia metóda v roku 1992. Následne sa štatistické vlastnosti metódy stabilnej dávky hodnotili s použitím matematických modelov v rade štúdií (4) (5) (6). Štúdie *in vivo* a modelové štúdie spolu názorne ukázali, že metóda je reprodukovateľná, používa sa pri nej menej zvierat a spôsobuje menej utrpenia ako tradičné metódy a umožňuje zatriediť látky podobne ako iné testovacie metódy akútnej toxicity.

Usmernenie pre výber najvhodnejšej testovacej metódy na daný účel možno nájsť v Usmerňujúcom dokumente o testovaní akútnej orálnej toxicity (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing) (7). Tento usmerňujúci dokument obsahuje aj doplňujúce informácie o vykonávaní a interpretácii testovacej metódy B.1a.

Princípom tejto metódy je, že v základnej štúdii sa používajú iba mierne toxické dávky a že je potrebné vyhýbať sa podávaniu dávok, pri ktorých sa očakáva, že sú smrteľné. Nie je tiež potrebné podávať dávky, o ktorých je známe, že spôsobujú silnú bolesť a utrpenie následkom leptavých alebo silne dráždivých účinkov. Moribundné zvieratá alebo zvieratá so zrejmyými bolesťami alebo vykazujúcimi známky silného a pretrvávajúceho utrpenia sa humánnym spôsobom usmrť a pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnotia ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti je predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (8).

Metóda poskytuje informácie o nebezpečných vlastnostiach a umožňuje, aby sa látka mohla zatriediť a klasifikovať podľa Globálne harmonizovaného systému (GHS) pre klasifikáciu chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (9).

Testovacie laboratórium posúdi všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s látkou, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a predpokladané použitie(-ia) látky. Tieto informácie sú potrebné na zabezpečenie všetkých zainteresovaných, že test je relevantný na ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere vhodnej počiatočnej dávky.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: vzťahuje sa na tie nepriaznivé účinky, ktoré sa vyskytnú po orálnom podaní jednorazovej dávky látky alebo viacnásobných dávok podávaných v priebehu 24 hodín.

Oneskorená smrť: znamená, že zviera neuhynie ani sa nejaví, že je moribundné, v priebehu 48 hodín, ale uhynie neskôr v priebehu 14-dňového obdobia pozorovania.

Dávka: množstvo podanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvierťa (napr. mg/kg).

Zrejmá toxicita: všeobecný termín opisujúci jasné príznaky toxicity po podaní testovanej látky [príklady pozri v (3)], ktoré sú také, že pri podaní najbližšej najvyššej stabilnej dávky sa dá očakávať buď silná bolesť a pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, moribundný stav [kritériá sú uvedené v Humane Endpoints Guidance Document (8)], alebo pravdepodobná mortalita u väčšiny zvierat.

GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém pre chemické látky a zmesi. Spoločný projekt OECD (zdravie ľudí a životné prostredie), Výboru expertov OSN pre prepravu nebezpečného tovaru (fyzikálno-chemické vlastnosti) a ILO (oznamovanie nebezpečenstva) a koordinovaný v rámci Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Blížiaca sa smrť: keď sa očakáva moribundný stav pred ďalším plánovaným obdobím pozorovania. Príznaky, ktoré sú príznačné pre tento stav u hlodavcov, by mohli zahŕňať kŕče, polohu na boku, polohu v ľahu a triašku. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

LD₅₀ (stredná smrteľná dávka): je štatistický odvodená jednorazová dávka látky, pri ktorej sa dá očakávať, že spôsobí úhyn 50 % zvierat po orálnom podaní. Hodnota LD₅₀ je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieratá (mg/kg).

Limitná dávka: sa vzťahuje na dávku nad hornou hranicou testovania (2 000 alebo 5 000 mg/kg).

Moribundný stav: stav umierania alebo neschopnosti prežiť, dokonca aj pri liečbe. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

Predvídateľná smrť: prítomnosť klinických príznakov charakteristických pre smrť v známom čase v budúcnosti pred plánovaným ukončením experimentu, napríklad neschopnosť prijímať vodu alebo jedlo. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Skupine zvierat rovnakého pohlavia sa postupne podávajú stabilné dávky 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výnimočne sa môže uvažovať o podaní ďalšej stabilnej dávky 5 000 mg/kg, pozri oddiel 1.6.2). Na základe predbežnej štúdie sa zvolí počiatočná dávka, pri ktorej sa očakáva, že spôsobí určité príznaky toxicity bez toho, aby spôsobila vážne toxické účinky alebo mortalitu. Klinické príznaky a podmienky, ktoré sa spájajú s bolesťou, utrpením a blížiacou sa smrťou, sú podrobne uvedené v samostatnom usmerňovacom dokumente OECD (8). Ďalším skupinám zvierat sa môžu podávať vyššie alebo nižšie stabilné dávky v závislosti od prítomnosti alebo neprítomnosti príznakov toxicity alebo mortality. Tento postup pokračuje po dávku spôsobujúcu zrejmu toxicitu alebo po zistenie najviac jedného uhynutia, alebo keď nie sú viditeľné žiadne účinky pri najvyššej dávke, alebo keď sa vyskytnú uhynutia pri najnižšej dávke.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. Výber druhu zvierat

Spomedzi živočíchov z druhu hlodavcov sa pokiaľ možno používa potkan, aj keď sa môže použiť aj iný druh hlodavca. Zvyčajne sa používajú samice (7). Je to preto, že prehľady bežných LD₅₀ testov uverejnené v odbornej literatúre uvádzajú, že zvyčajne je malý rozdiel v citlivosti medzi pohlaviami, ale v tých prípadoch, keď sa pozorujú rozdiely, sú samice zvyčajne mierne citlivejšie (10). Ak však z poznatkov o toxikologických alebo toxikokinetických vlastnostiach štruktúrálne príbuzných chemikálií vyplýva, že samce môžu byť citlivejšie, potom sa použije toto pohlavie. Ak sa test uskutočňuje na samcoch, je potrebné uviesť primerané zdôvodnenie.

Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice majú byť panenské a negravídne. Každé zviera má byť na začiatku dávkovania vo veku od 8 do 12 týždňov a jeho hmotnosť má byť v intervale ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat, ktorým sa predtým podala dávka.

1.4.2. Podmienky umiestnenia a kŕmenia

Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť má byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 % – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Zvieratá môžu byť v kliebkach po skupinách podľa dávok, ale počet zvierat na kliebku musí umožniť zreteľné pozorovanie každého zvieratá.

1.4.3. Príprava zvierat

Zvieratá sú náhodne vybrané, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v kliebkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania látky, aby sa im umožnila aklimatizácia na laboratórne podmienky.

1.4.4. Príprava dávok

Testované látky sa zvyčajne podávajú v stálom objeme počas celého rozsahu dávok, ktoré sa majú testovať zmenou koncentrácie dávkovanej prípravky. Ak sa však má testovať kvapalný konečný produkt alebo zmes, použitie neriedenej testovanej látky, t. j. pri konštantnej koncentrácii, môže byť vhodnejšie pre následné stanovenie rizika tejto látky a požadujú ho niektoré regulačné orgány. V každom prípade sa nesmie prevýšiť maximálny objem podávanej dávky. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od

veľkosti pokusného zvieraťa. U hlodavcov by objem zvyčajne nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti: v prípade vodných roztokov sa však môže uvažovať o 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Pokiaľ ide o zloženie dávkovaného prípravku, odporúča sa, pokiaľ je to možné, použitie vodného roztoku/suspenzie/emulzie, za ktorým v poradí nasleduje roztok/suspenzia/emulzia v oleji (napr. kukuričný olej) a potom prípadne roztok v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, by mali byť známe toxikologické charakteristiky. Dávky musia byť pripravené tesne pred podávaním, pokiaľ nie je známa a prijateľná stabilita prípravku počas jeho používania.

1.5. POSTUP

1.5.1. Podávanie dávok

Testovaná látka sa podáva ako jednorazová dávka cez sondu s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Za nezvyčajných okolností, keď nie je možná jednorazová dávka, môže sa dávka podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

Zvieratá sa pred podaním dávky vyhľadujú (napr. potkanom sa cez noc zadrží potrava, ale nie voda; myšiam sa na 3 – 4 hodiny zadrží potrava, ale nie voda). Po období hladovania sa zvieratá odvážia a podá sa im testovaná látka. Po podaní látky sa potrava môže zadržať na ďalšie 3 – 4 hodiny potkanom alebo myšiam na 1 – 2 hodiny. Ak sa dávka podáva po častiach počas určitého obdobia, môže byť potrebné poskytnúť zvieratám potravu a vodu v závislosti od dĺžky obdobia.

1.5.2. Predbežná štúdia

Účelom predbežnej štúdie je umožniť výber vhodnej počiatočnej dávky pre základnú štúdiu. Testovaná látka sa podáva jednotlivým zvieratám postupne podľa postupového diagramu v prílohe 1. Predbežná štúdia je hotová, keď možno vykonať rozhodnutie o počiatočnej dávke pre základnú štúdiu (alebo ak sa vyskytne uhynutie pri najnižšej stabilnej dávke).

Počiatočná dávka sa v prípade predbežnej štúdie vyberie zo stabilných dávok 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg ako dávka, pri ktorej sa očakáva, že spôsobí zrejmu toxicitu, ktorá je založená pokiaľ možno na dôkaze z *in vivo* a *in vitro* údajov pre tú istú chemikáliu a pre štrukturálne príbuzné chemikálie. Ak takéto informácie chýbajú, bude počiatočná dávka 300 mg/kg.

Medzi podaním jednotlivých dávok každému zvieraťu je časový interval aspoň 24 hodín. Všetky zvieratá sa pozorujú aspoň 14 dní.

Výnimočne, a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb, sa môže zohľadniť použitie ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg (pozri prílohu 3). Z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa pokusy na zvieratách v rozsahoch GHS kategórie 5 (2 000 – 5 000 mg/kg) neodporúčajú a uvážia sa iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu sú bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat alebo ochranu životného prostredia.

V prípadoch, keď zviera testované pri najnižšej stabilnej dávke (5 mg/kg) v predbežnej štúdii uhynie, je zvyčajným postupom, že štúdia sa ukončí a látka sa zaradi do GHS kategórie 1 (ako je uvedené v prílohe 1). Ak sa však vyžaduje ďalšie potvrdenie klasifikácie, môže sa vykonať tento voliteľný doplnkový postup. Druhému zvieraťu sa podá dávka 5 mg/kg. Ak toto druhé zviera uhynie, potom sa potvrdí GHS kategória 1 a štúdia sa ihneď ukončí. Ak druhé zviera prežije, potom sa maximálne trom ďalším zvieratám podá dávka 5 mg/kg. Pre výskyt veľkého rizika mortality sa týmto zvieratám z dôvodu starostlivosti o zvieratá podá dávka postupne. Časový interval medzi podaním dávky každému zvieraťu má byť dostatočný na to, aby sa stanovila pravdepodobnosť prežitia predchádzajúceho zvieraťa. Ak sa vyskytne druhé uhynutie, postupnosť podávania dávok sa ihneď ukončí a žiadnym ďalším zvieratám sa dávky nepodajú. Keďže výskyt druhého uhynutia (bez ohľadu na počet pokusných zvierat v čase ukončenia) patrí do výsledku A (2 alebo viac uhynutí), postupuje sa podľa klasifikačného pravidla prílohy 2 pri stabilnej dávke 5 mg/kg (kategória 1, ak sa vyskytne 2 alebo viac uhynutí, alebo kategória 2, ak sa nevyskytne viac ako 1 uhynutie). Okrem toho príloha 4 poskytuje usmernenie pre klasifikáciu v systéme EÚ, až kým sa nezavedie nový GHS.

1.5.3. Základná štúdia**1.5.3.1. Počet zvierat a dávky**

Opatrenia, ktoré sa majú prijať po testovaní s počiatočnou dávkou, sa uvádzajú v postupových diagramoch v prílohe 2. Vyžaduje sa jedno z troch opatrení; buď sa testovanie ukončí a priradí príslušná trieda klasifikácie nebezpečenstva, testuje sa pri vyššej stabilnej dávke, alebo sa testuje pri nižšej stabilnej dávke. Na ochranu zvierat sa však v základnej štúdii nezopakuje dávka, ktorá spôsobila uhynutie v predbežnej štúdii (pozri prílohu 2). Zo skúseností vyplýva, že najpravdepodobnejším výsledkom pri počiatočnej dávke bude to, že látku možno klasifikovať, a nie je potrebné ďalšie testovanie.

Zvyčajne sa používa celkovo päť zvierat rovnakého pohlavia pre každú skúšanú dávku. K týmto piatim zvieratám patrí jedno zviera z predbežnej štúdie, ktorému sa podala zvolená dávka, a ďalšie štyri zvieratá (okrem výnimočného prípadu, keď sa dávka použitia v základnej štúdii nezahrnula do predbežnej štúdie).

Časový interval medzi dávkovaním s každou veľkosťou dávky je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Ďalšia dávka sa podá zvieratám až po ubezpečení, že zvieratá, ktorým sa predtým podala dávka, prežili. Podľa potreby sa odporúča interval 3 alebo 4 dni medzi jednotlivými dávkami, aby sa umožnilo pozorovanie oneskorenej toxicity. Časový interval sa môže nastaviť podľa potreby, napr. v prípade nepresvedčivej reakcie.

Ak sa uvažuje o použití vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg, postupuje sa podľa postupu uvedeného v prílohe 3 (pozri tiež oddiel 1.6.2).

1.5.3.2. Limitný test

Limitný test sa pokiaľ možno používa v situáciách, keď experimentátor má informácie, z ktorých vyplýva, že testovaný materiál je pravdepodobne netoxický, t. j. že je toxický iba v prípade, keď prevyšuje predpismi stanovené limitné dávky. Informácie o toxicite testovaného materiálu možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobných testovaných zmesiach alebo produktoch pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V tých situáciách, keď je málo informácií alebo nie sú informácie o jeho toxicite, alebo v ktorých sa očakáva, že testovaný materiál bude toxický, je potrebné vykonať základný test.

Pri zvyčajnom postupe sa počiatočná dávka predbežnej štúdie 2 000 mg/kg (alebo výnimočne 5 000 mg/kg) následne podá ďalším štyrom zvieratám, čo slúži ako limitný test v prípade tohto usmernenia.

1.6. POZOROVANIA

Zvieratá sa vyšetrujú individuálne po podaní dávky aspoň raz počas prvých 30 minút, pravidelne počas prvých 24 hodín, osobitne pozorne počas prvých 4 hodín, a potom každý deň počas celkovo 14 dní okrem prípadu, keď je potrebné zvieratá vylúčiť zo štúdie a z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom usmrtiť alebo keď sa zistí, že uhynuli. Dĺžka pozorovania by sa však nemala pevne určiť. Určí sa na základe toxických reakcií, času nástupu a dĺžky času zotavenia a malo by sa teda umožniť jej predĺženie, ak sa to pokladá za potrebné. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité, predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia toxických príznakov (11). Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam.

Ďalšie vyšetrenia budú potrebné, ak zvieratá naďalej vykazujú príznaky toxicity. Pri vyšetreniach sa venuje pozornosť zmenám na pokožke a srsti, očiach a slizniciach a tiež respiračnému, obehovému, autonómnemu a centrálnemu nervovému systému a somatomotorickej aktivite a spôsobu správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Zohľadnia sa zásady a kritériá zosumarizované v Humane Endpoints Guidance Document (8). Zvieratá nachádzajúce sa v moribundnom stave alebo tie, ktoré vykazujú silné bolesti alebo pretrvávajúce príznaky veľkého utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrtia. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

1.6.1. Telesná hmotnosť

Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanoví krátko pred podaním testovanej látky a potom aspoň každý týždeň. Zmeny hmotnosti sa vypočítajú a zaznamenávajú. Na konci testu sa zvieratá, ktoré prežili, odvážia a potom humánnym spôsobom usmrtia.

1.6.2. Patológia

Všetky testované zvieratá (vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sú vylúčené zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá) sa podrobia autopsii. Všetky makroskopické patologické zmeny u každého zvieratá sa zaznamenajú. Môže sa uvažovať aj o mikroskopickom vyšetrení orgánov dokazujúcim makroskopické patologické nálezy u zvierat, ktoré prežili 24 alebo viac hodín po podaní počiatočnej dávky, ktoré môže poskytnúť užitočné informácie.

2. ÚDAJE

O jednotlivých zvieratách sa poskytujú informácie. Okrem toho sa všetky údaje zosumarizujú vo forme tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo boli usmrtené z humanitných dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, popis časového priebehu toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

3. PODÁVANIE SPRÁV**3.1. SPRÁVA O TESTE**

Správa o teste musí podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

- fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),
- identifikačné údaje vrátane čísla CAS.

Nosič (v prípade potreby):

- zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,
- počet, vek a pohlavie zvierat (v prípade potreby vrátane zdôvodnenia, prečo sa použili samce namiesto samíc),
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Testovacie podmienky:

- údaje o zložení testovanej látky vrátane údajov o fyzikálnej forme podávaného materiálu,
- údaje o podávaní testovanej látky vrátane objemov dávok a čase podávania,
- údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu krmiva/zdroja, zdroja vody),
- zdôvodnenie výberu počiatočnej dávky.

Výsledky:

- tabuľkové spracovanie údajov o reakcii a veľkosti dávky pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, povahy, závažnosti a trvania účinkov),

- tabuľkové spracovanie telesnej hmotnosti a zmien telesnej hmotnosti,
- hmotnosti jednotlivých zvierat v deň podania dávky, potom v týždňových intervaloch a v čase uhynutia alebo usmrtenia,
- dátum a čas uhynutia v prípade vopred naplánovaného usmrtenia,
- časový priebeh nástupu príznakov toxicity a či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,
- pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Diskusia a interpretácia výsledkov.

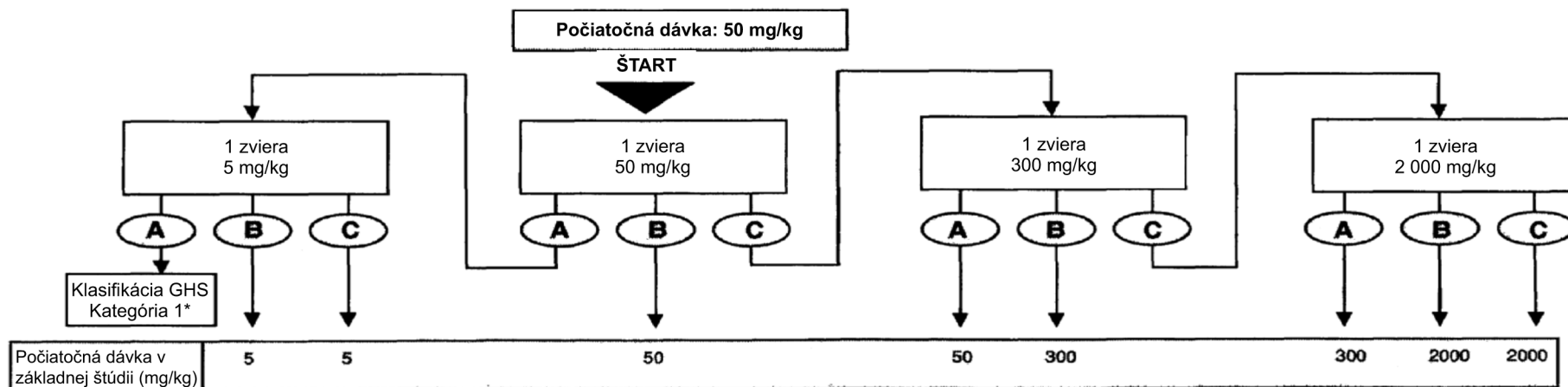
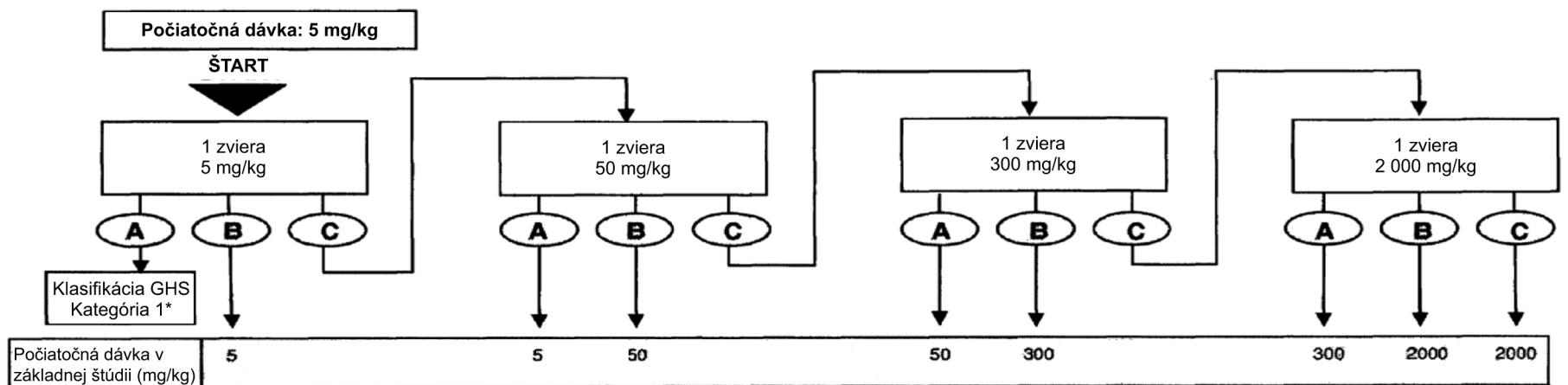
Záver.

4. ODKAZY

- (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.
- (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, s. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-1>]. 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.

PRÍLOHA 1:

POSTUPOVÝ DIAGRAM PRE PREDBEŽNÚ ŠTÚDIU



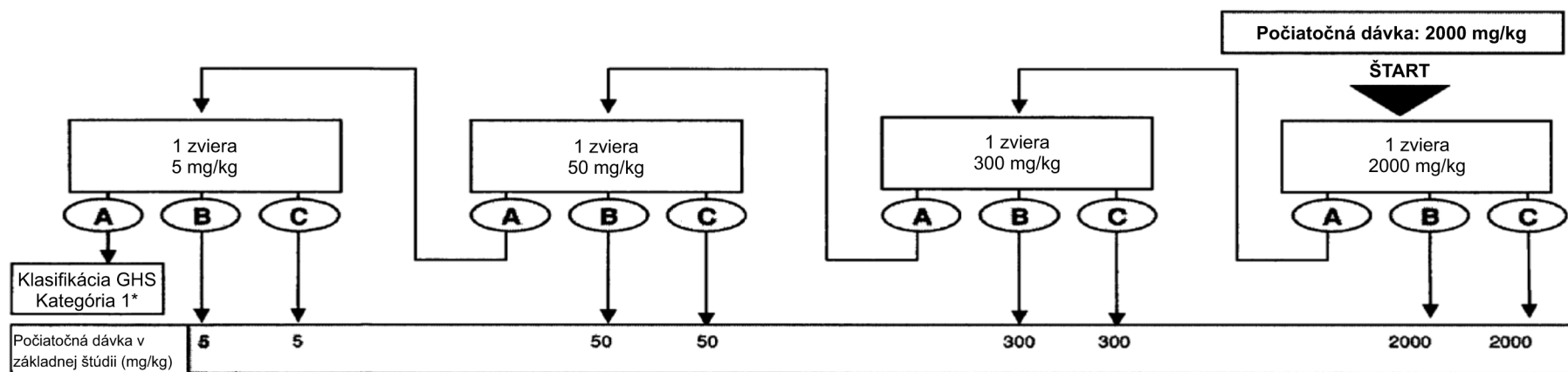
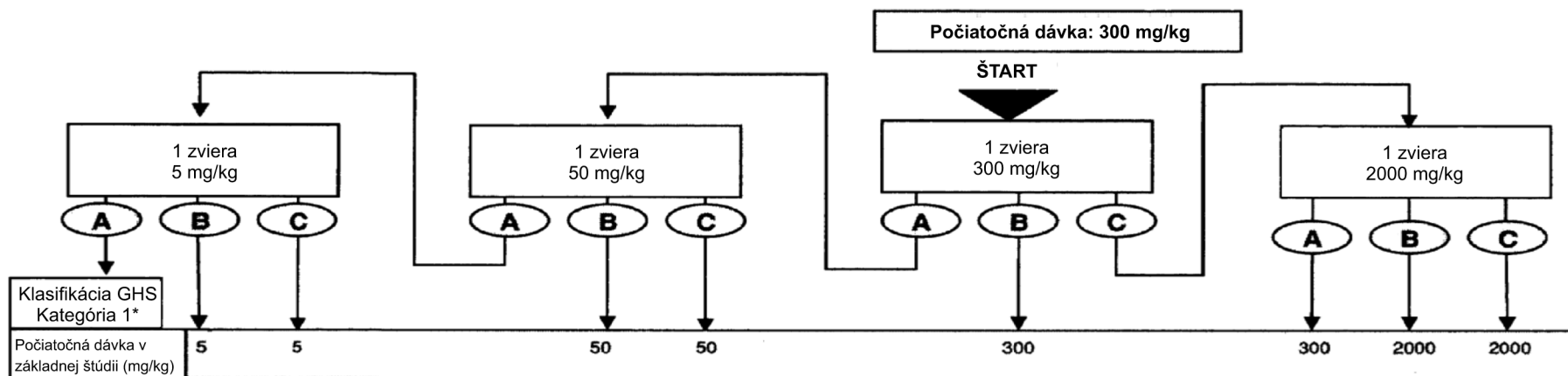
Výsledok

A smrť

B zrejma toxicita

C žiadna zrejma toxicita ani smrť

* Pre výsledok **A** je pri 5 mg/kg voliteľný doplňujúci postup na potvrdenie GSH klasifikácie; pozri oddiel 1.5.2.



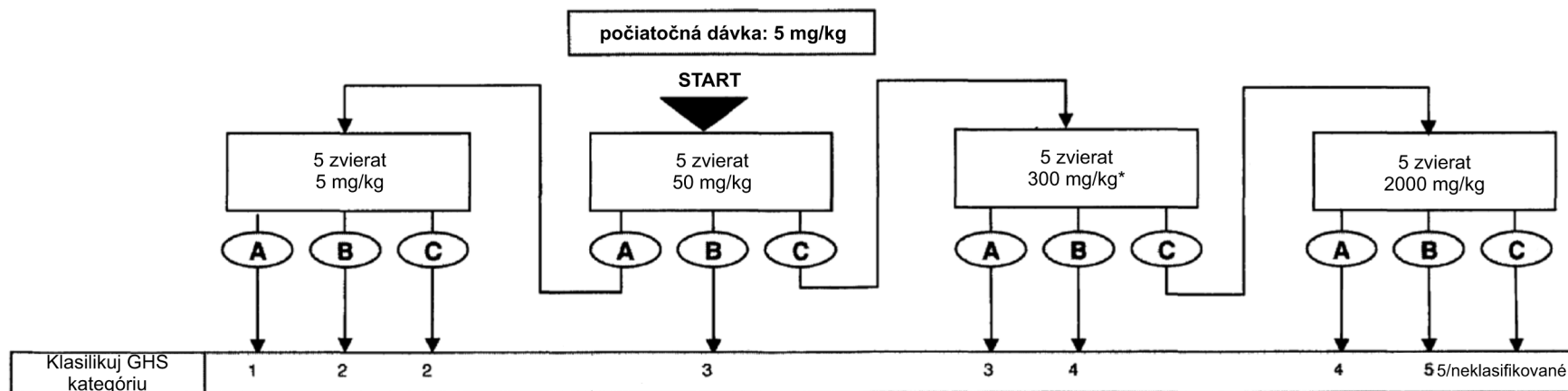
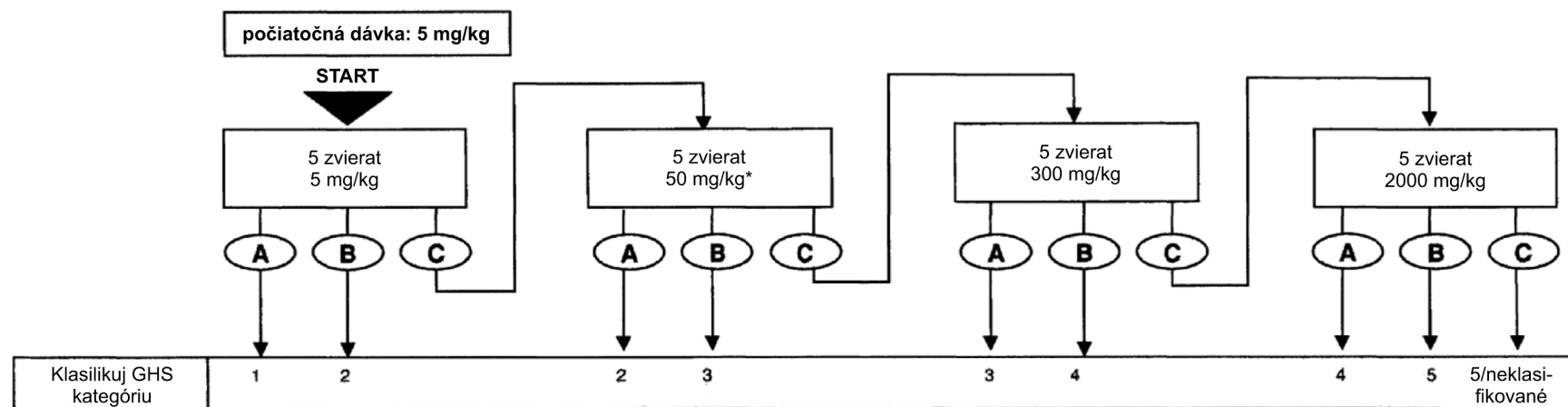
Výsledok

- A** smrť
- B** zrejma toxicita
- C** žiadna zrejma toxicita ani smrť

* Pre výsledok **A** je pri 5 mg/kg voliteľný dopĺňujúci postup na potvrdenie GSH klasifikácie; pozri oddiel 1.5.2.

PRÍLOHA 2

POSTUPOVÝ DIAGRAM PRE ZÁKLADNÚ ŠTÚDIU



Výsledok

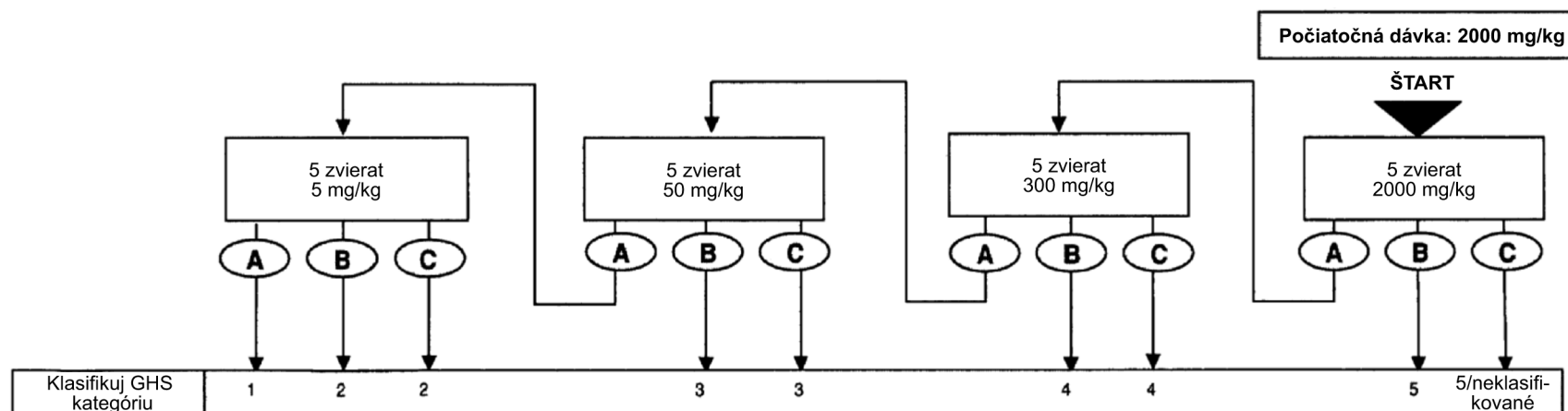
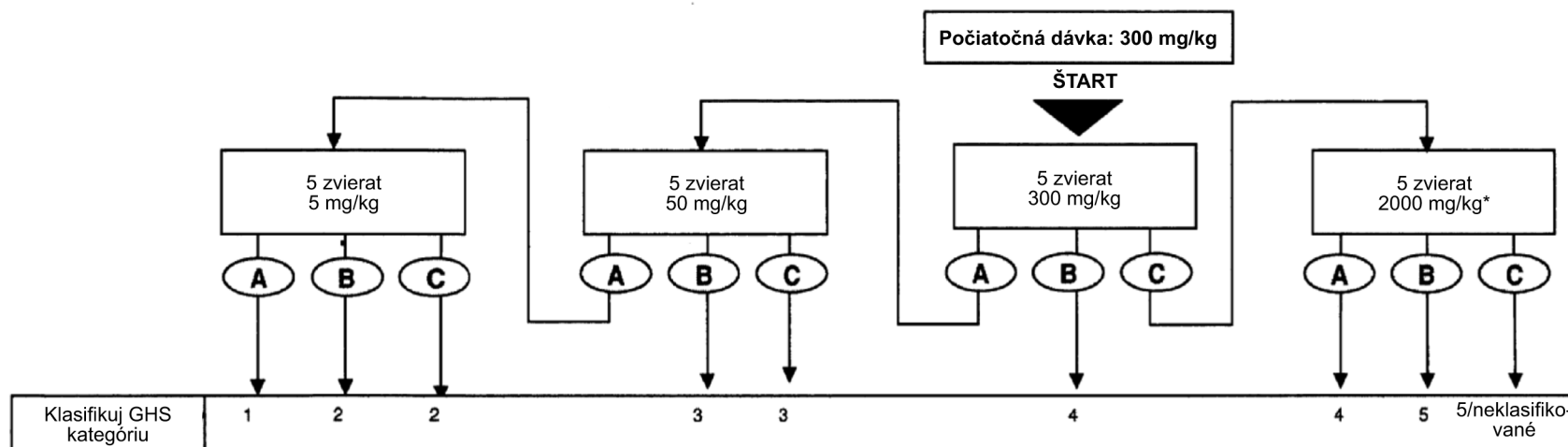
- A** ≥ 2 uhynutia
- B** ≥ 1 so zrejmovou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
- C** žiadna zrejma toxicita ani smrť

Veľkosť skupiny

5 zvierat v každej hlavnej skupine štúdie bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou ako v predbežnej štúdii

* Starostlivosť o zvieratá je prvpradá

Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Chod priamo na výsledok **A**

Výsledok

- A** ≥ 2 uhynutia
- B** ≥ 1 so zrejmovou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
- C** žiadna zrejma toxicita ani smrť

Veľkosť skupiny

5 zvierat v každej hlavnej skupine štúdie bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou ako v predbežnej štúdii

* Starostlivosť o zvieratá je prvoradá

Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Chod' priamo na výsledok **A**.

Príloha 3

KRITÉRIÁ KLASIFIKÁCIE TESTOVANÝCH LÁTOK S OČAKÁVANÝMI HODNOTAMI LD₅₀ VYŠŠÍMI AKO 2 000 MG/KG, KTORÉ NIE JE POTREBNÉ TESTOVAŤ

Kritériá pre kategóriu nebezpečenstva 5 sú určené na umožnenie identifikácie testovaných látok s relatívne nízkym nebezpečenstvom akútnej toxicity, ale ktoré za určitých podmienok môžu predstavovať nebezpečenstvo pre zraniteľnejšie skupiny obyvateľstva. Predpokladá sa, že tieto látky majú orálnu alebo dermálnu LD₅₀ v rozsahu 2 000 – 5 000 mg/kg alebo rovnocennú s dávkami pre iné spôsoby podávania. Testované látky sa klasifikujú do kategórie nebezpečenstva, ktorá je definovaná ako: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (kategória 5 v GHS) v týchto prípadoch:

- a) ak sú zaradené do tejto kategórie na základe niektorej testovacej schémy z prílohy 2 na základe výskytov mortality;
- b) ak je už dostupný spoľahlivý dôkaz, z ktorého vyplýva, že LD₅₀ je v rozsahu hodnôt kategórie 5, alebo z iných štúdií na zvieratách alebo toxických účinkov u ľudí vyplývajú obavy z akútnych dôsledkov pre zdravie ľudí;
- c) pomocou extrapolácie, odhadu a merania údajov, ak nie je potvrdené zaradenie do vyššej triedy nebezpečenstva, a
 - sú k dispozícii spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú závažné toxické účinky u ľudí, alebo
 - sa zistila mortalita pri testovaní s orálnym podávaním dávok až do hodnôt kategórie 4, alebo
 - ak expertné posúdenie potvrdí závažné klinické príznaky toxicity pri testovaní až do hodnôt kategórie 4 okrem hnačky, zjezenia alebo neupravenej srsti, alebo
 - ak expertné posúdenie potvrdí spoľahlivé informácie, z ktorých vyplýva na základe iných štúdií na zvieratách možnosť závažných akútnych účinkov.

TESTOVANIE S DÁVKAMI NAD 2 000 MG/KG

Výnimočne a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb sa môže zohľadniť použitie ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg. Vzhľadom na potrebu ochrany zvierat sa testovanie s 5 000 mg/kg neodporúča a môže sa uvážiť iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu by mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat (9).

Predbežná štúdia

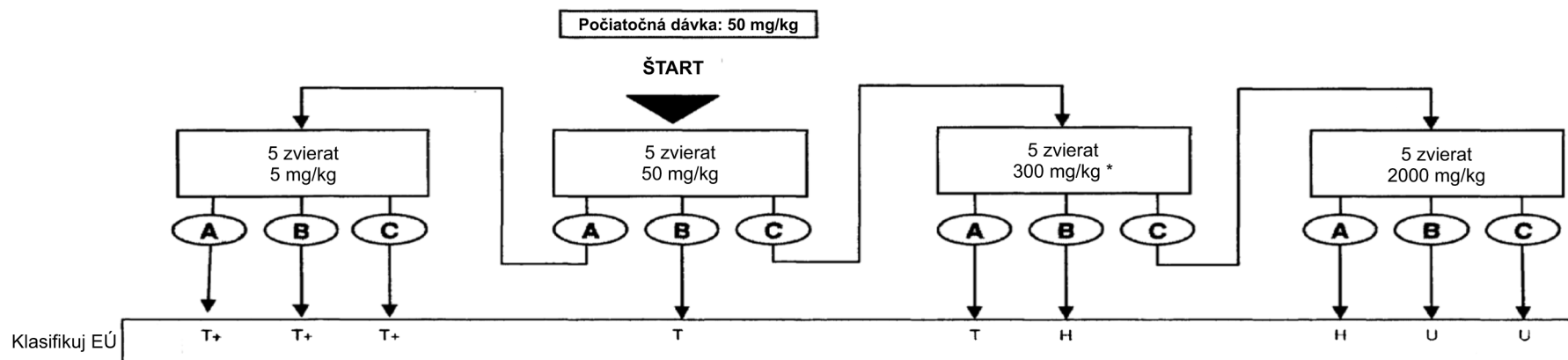
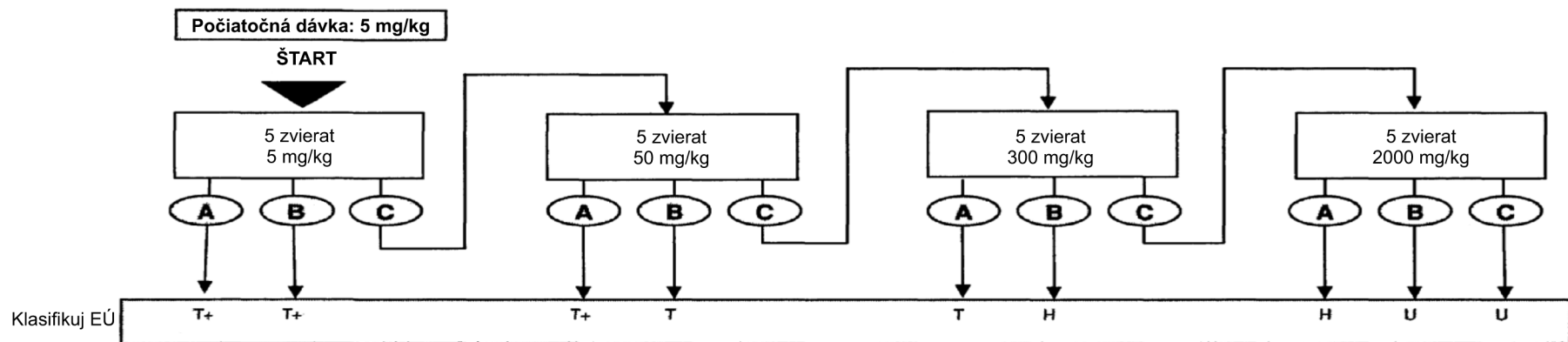
Pravidlá rozhodnutia upravujúce postupovú metódu uvedenú v prílohe 1 sa rozširujú o dávku 5 000 mg/kg. Preto keď sa ako počiatočná dávka v predbežnej štúdii použije dávka 5 000 mg/kg, na základe výsledku A (smrť) bude potrebné, aby sa testovalo druhé zviera s dávkou 2 000 mg/kg; výsledky B a C (zrejma toxicita alebo žiadna toxicita) umožnia, aby sa dávka 5 000 mg/kg zvolila ako počiatočná dávka v základnej štúdii. Podobne ak sa použije iná počiatočná dávka ako 5 000 mg/kg, potom testovanie pokračuje s 5 000 mg/kg na základe výsledkov B alebo C pri veľkosti dávky 2 000 mg/kg; následne výsledok A pri dávke 5 000 mg/kg predurčí počiatočnú dávku v základnej štúdii s veľkosťou dávky 2 000 mg/kg a výsledky B a C predurčia počiatočnú dávku pre základnú štúdiu s veľkosťou 5 000 mg/kg.

Základná štúdia

Pravidlá rozhodnutia upravujúce postupovú metódu uvedenú v prílohe 2 sa rozširujú o dávku 5 000 mg/kg. Preto keď sa ako počiatočná dávka v základnej štúdii použije dávka 5 000 mg/kg, na základe výsledku A (≥ 2 uhynuté zvieratá) bude potrebné, aby sa testovala druhá skupina zvierat s dávkou 2 000 mg/kg; výsledok B (zrejma toxicita a/alebo ≤ 1 uhynuté zviera) alebo C (žiadna toxicita) bude mať za následok, že látka sa nebude klasifikovať podľa GHS. Podobne ak sa použije iná počiatočná dávka ako 5 000 mg/kg, potom testovanie pokračuje do 5 000 mg/kg na základe výsledku C pri veľkosti dávky 2 000 mg/kg; následne výsledok A pri dávke 5 000 mg/kg bude mať za následok, že látka sa zaradi do kategórie 5 GHS a výsledky B alebo C povedú k tomu, že sa látka nebude klasifikovať.

TESTOVACIA METÓDA B.1a

Usmernenie pre klasifikáciu podľa schémy EÚ na prekonanie prechodného obdobia do úplného zavedenia Globálne harmonizovaného klasifikačného systému (GHS)



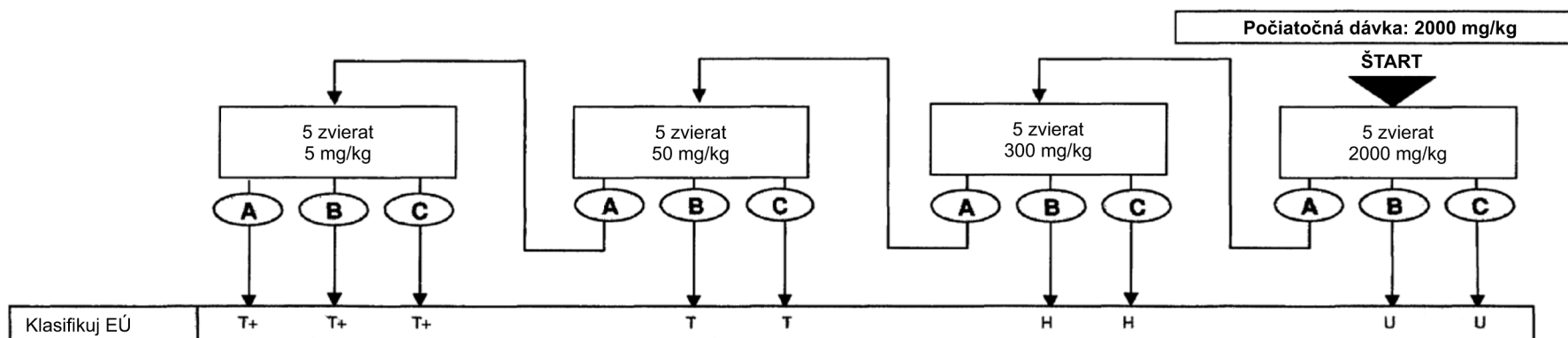
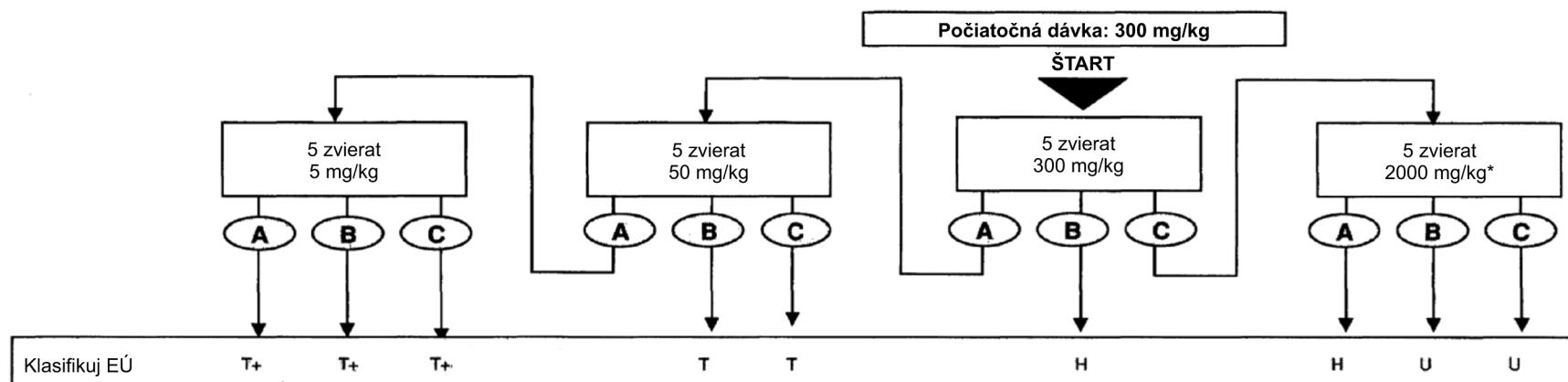
Výsledok

- A** ≥ 2 uhynutia
- B** ≥ 1 so zrejmovou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
- C** Žiadna zrejma toxicita ani smrť

T+ = veľmi toxický
T = toxický
H = škodivý
U = neklasifikované

Starostlivosť o zvieratá je prvoradá
Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Choď priamo na výsledok.

Veľkosť skupiny 5 zvierat v každej hlavnej skupine štúdie bude obsahovať jedno zviera testované rovnakou dávkou ako v predbežnej štúdii

Výsledok

- A** ≥ 2 uhynutia
- B** ≥ 1 so zrejmovou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
- C** Žiadna zrejma toxicita ani smrť

T+ = veľmi toxický
 T = toxický
 H = škodivý
 U = neklasifikované

Veľkosť skupiny

5 zvierat v každej hlavnej skupine bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou v predbežnej štúdii

* Starostlivosť o zvieratá je prvoradá

Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Choď priamo na výsledok **A**.

B.1b. **AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA TRIEDY AKÚTNEJ TOXICITY**1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 423 (2001).

1.1. **ÚVOD**

Metóda triedy akútnej toxicity (1), uvedená v tomto teste, je postupnou metódou, pri ktorej sa na každý krok použijú 3 zvieratá rovnakého pohlavia. V závislosti od mortality a/alebo ich moribundného stavu môžu byť potrebné priemerne 2 až 4 kroky na posúdenie akútnej toxicity testovanej látky. Táto metóda je reprodukovateľná, používa sa pri nej veľmi málo zvierat a umožňuje zatriediť látky podobne ako iné testovacie metódy akútnej toxicity. Metóda triedy akútnej toxicity je založená na biometrických hodnoteniach (2) (3) (4) (5) so stabilnými dávkami dostatočne odlišenými, aby umožnili zatriedenie látky na klasifikačné účely a posúdenie nebezpečenstva. Metóda, ktorá bola prijatá v roku 1996, bola rozsiahlo validovaná pokusmi *in vivo* v porovnaní s údajmi LD₅₀ získanými z literatúry, tak na národnej (6), ako aj na medzinárodnej úrovni (7).

Usmernenie pre výber najvhodnejšej testovacej metódy na daný účel možno nájsť v Usmerňujúcom dokumente o testovaní akútnej orálnej toxicity [Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8)]. Tento usmerňujúci dokument obsahuje aj doplňujúce informácie o vykonávaní a interpretácii testovacej metódy B.1b.

Nie je potrebné podávať testované látky pri dávkach, o ktorých je známe, že spôsobujú silnú bolesť a utrpenie následkom leptavých alebo silne dráždivých účinkov. Moribundné zvieratá alebo zvieratá s bolesťami, alebo zvieratá, ktoré vykazujú príznaky silného a trvalého utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrcujú a pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnocujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie vysmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (9).

Metóda využíva vopred stanovené dávky a výsledky umožňujú, aby sa látka mohla zatriediť a klasifikovať podľa Globálne harmonizovaného systému pre klasifikáciu chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (10).

Metóda nie je v zásade určená na umožnenie výpočtu presnej hodnoty LD₅₀, ale umožňuje stanoviť definované rozsahy expozície, kde sa očakáva letalita, keďže uhynutie časti zvierat je stále najdôležitejším konečným bodom tohto testu. Metóda umožňuje stanoviť hodnoty LD₅₀ iba v prípade, keď v dôsledku podania aspoň dvoch dávok je mortalita vyššia ako 0 % a nižšia ako 100 %. Výber vopred stanovených dávok bez ohľadu na testovanú látku s klasifikáciou výlučne viazanou na počet zvierat vyšetrovaných v rôznych stavoch zlepšuje možnosti konzistencie podávania správ a reprodukovateľnosti medzi laboratóriami.

Testovacie laboratórium posúdi všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú zahŕňať identitu a chemickú štruktúru látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledok všetkých ostatných *in vivo* alebo *in vitro* testov toxicity s látkou, toxikologické údaje o štruktúralne príbuzných látkach a predpokladané použitie(-ia) látky. Tieto informácie sú potrebné na zabezpečenie všetkých zainteresovaných, že test je dôležitý na ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere najvhodnejšej počiatočnej dávky.

1.2. **DEFINÍCIE**

Akútna orálna toxicita: vzťahuje sa na tie nepriaznivé účinky, ktoré sa vyskytnú po orálnom podaní jednorazovej dávky látky alebo viacsobných dávok podávaných v priebehu 24 hodín.

Oneskorená smrť: znamená, že zviera neuhynie ani sa nejaví ako moribundné v priebehu 48 hodín, ale uhynie neskôr v priebehu vymedzeného 14-dňového obdobia pozorovania.

Dávka: množstvo podanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieratá (napr. mg/kg).

GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém pre chemické látky a zmesi. Spoločný projekt OECD (zdravie ľudí a životné prostredie), Výboru expertov OSN pre prepravu nebezpečného tovaru (fyzikálno-chemické vlastnosti) a ILO (oznamovanie nebezpečenstva) a koordinovaný v rámci Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Blížiaca sa smrť: keď sa očakáva moribundný stav pred ďalším plánovaným obdobím pozorovania. Príznaky, ktoré sú príznačné pre tento stav u hlodavcov by mohli zahŕňať kŕče, polohu na boku, polohu v ľahu a triašku. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

LD₅₀ (stredná smrteľná orálna dávka): štatistický odvodená jednorazová dávka látky, pri ktorej sa dá očakávať, že spôsobí úhyn 50 % zvierat pri orálnom podaní. Hodnota LD₅₀ je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (mg/kg).

Limitná dávka: sa vzťahuje na dávku nad hornou hranicou testovania (2 000 alebo 5 000 mg/kg).

Moribundný stav: stav umierania alebo neschopnosti prežiť, dokonca aj pri liečbe. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

Predvídateľná smrť: prítomnosť klinických príznakov charakteristických pre smrť v známom čase v budúcnosti pred plánovaným ukončením experimentu; napríklad neschopnosť prijímať vodu alebo jedlo. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

1.3. PRINCÍP TESTU

Princíp testu spočíva v tom, že na základe metódy postupných krokov s použitím minimálneho počtu zvierat na krok sa získajú dostatočné informácie o akútnej toxicite testovanej látky, ktoré umožnia jej klasifikáciu. Látka sa podáva orálne skupine pokusných zvierat v jednej zo stanovených dávok. Látka sa testuje s použitím metódy postupných krokov, v každom kroku sa použijú tri zvieratá rovnakého pohlavia (zvyčajne samice). Absencia alebo výskyt mortality súvisiacej s látkou u zvierat, ktorým sa podala dávka v jednom kroku, určí ďalší krok, t. j.:

- nie je potrebné ďalšie testovanie,
- podanie rovnakej dávky trom ďalším zvieratám,
- podanie najbližšej vyššej alebo najbližšej nižšej dávky trom ďalším zvieratám.

Informácie o postupe testu sú uvedené v prílohe 1. Metóda umožní posúdenie vzhľadom na klasifikáciu testovanej látky do jednej z viacerých tried toxicity definovaných pevnými hraničnými hodnotami LD₅₀.

1.4. OPIS METÓDY

1.4.1. Výber druhu zvierat

Spomedzi druhov hlodavcov sa prednostne používa potkan, hoci sa môže použiť aj iný druh hlodavca. Zvyčajne sa používajú samice (9). Je to preto, že prehľady konvenčných LD₅₀ testov, uverejnené v odbornej literatúre, uvádzajú, že hoci je malý rozdiel v citlivosti medzi pohlaviami, v tých prípadoch, keď sa pozorovali rozdiely, sú samice zvyčajne mierne citlivejšie (11). Ak však z poznatkov o toxikologických alebo toxikokinetických vlastnostiach štrukturálne príbuzných chemikálií vyplýva, že samce môžu byť citlivejšie, potom sa použije toto pohlavie. Ak sa test uskutočňuje na samcoch, je potrebné uviesť primerané zdôvodnenie.

Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice majú byť panenské a negravídne. Každé zviera na začiatku dávkovania má byť vo veku od 8 do 12 týždňov a jeho hmotnosť má byť v rozpätí $\pm 20\%$ priemernej hmotnosti všetkých zvierat, ktorým sa predtým podala dávka.

1.4.2. Podmienky umiestnenia a kŕmenia

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Zvieratá môžu byť v kliečkach po skupinách podľa dávok, ale počet zvierat na kliečku musí umožniť zreteľné pozorovanie každého zvieraťa.

1.4.3. Príprava zvierat

Zvieratá sú náhodne vybrané, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v kliebkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky.

1.4.4. Príprava dávok

Testované látky sa zvyčajne podávajú v stálom objeme počas celého intervalu dávkovania, ktoré sa má testovať na základe zmeny koncentrácie dávkovaného prípravku. Ak sa však má testovať kvapalný konečný produkt alebo zmes, použitie neriedenej testovanej látky, t. j. s konštantnou koncentráciou, môže byť pre následné stanovenie rizika tejto látky vhodnejšie a požadujú ho niektoré regulačné orgány. V každom prípade sa nesmie prekročiť maximálny objem podávanej dávky. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvierata. U hlodavcov by objem zvyčajne nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti; v prípade vodných roztokov sa však môže uvažovať o 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Pokiaľ ide o zloženie dávkovaného prípravku, odporúča sa vždy, keď je to možné, použitie vodného roztoku/suspenzie/emulzie, za ktorým v poradí nasleduje roztok/suspenzia/emulzia v oleji (napr. kukuričný olej), a potom prípadne roztok v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, by mali byť známe toxikologické charakteristiky. Dávky musia byť pripravené tesne pred podávaním, pokiaľ nie je známa a prijateľná stabilita prípravku počas obdobia, keď sa bude používať.

1.5. POSTUP**1.5.1. Podávanie dávok**

Testovaná látka sa podáva ako jednorazová dávka cez sondu s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubáčnej kanyly. Za nezvyčajných okolností, keď nie je možná jednorazová dávka, sa môže dávka podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

Zvieratá sa pred podávaním dávok vyhladujú (napr. potkanom sa cez noc zadrží potrava, ale nie voda; myšiam sa na 3 – 4 hodiny zadrží potrava, ale nie voda). Po období hladovania sa zvieratá odvážia a podá sa im testovaná látka. Po podaní látky sa zadrží potrava na ďalšie 3 – 4 hodiny potkanom alebo myšiam na 1 – 2 hodiny. Ak sa dávka podáva po častiach počas určitého obdobia, môže byť potrebné poskytnúť zvieratám potravu a vodu v závislosti od dĺžky obdobia.

1.5.2. Počet zvierat a veľkosť dávok

Na každý krok sa použijú tri zvieratá. Veľkosť dávky, ktorá sa použije ako počiatočná dávka, sa vyberie z jednej zo štyroch stabilných hodnôt 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Počiatočná dávka má byť taká, pri ktorej s najväčšou pravdepodobnosťou nastane smrť u niektorých zvierat, ktorým sa dávka podala. Postupové diagramy v prílohe 1 opisujú postup, ktorý je potrebné dodržiavať pre každú z počiatočných dávok. Pritom príloha 4 poskytuje usmernenie ku klasifikácii v schéme EÚ, až kým sa nezavedie nový GHS.

Keď z dostupných informácií vyplýva, že úmrtie je nepravdepodobné pri najvyššej počiatočnej dávke (2 000 mg/kg telesnej hmotnosti), potom je potrebné vykonať limitný test. Ak nie sú žiadne informácie o látke, ktorá sa má testovať, z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa odporúča použiť počiatočnú dávku 300 mg/kg telesnej hmotnosti.

Časový interval medzi skupinami dávok je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Zvieratám sa podá ďalšia dávka až po ubezpečení, že zvieratá, ktorým sa predtým dávka podala, prežili.

Výnimočne, a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb, sa môže uvažovať o použití ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg telesnej hmotnosti (pozri prílohu 2). Z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa testy na zvieratách v rozsahu GHS kategórie 5 (2 000 – 5 000 mg/kg) neodporúčajú a uvažuje sa o nich iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu by mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat alebo ochranu životného prostredia.

1.5.3. Limitný test

Limitný test sa používa predovšetkým v situáciách, keď experimentátor má informácie, z ktorých vyplýva, že testovaný materiál je pravdepodobne netoxický, t. j. že je toxický iba v prípade, keď prevyšuje predpismi stanovené limitné dávky. Informácie o toxicite testovaného materiálu možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobne testovaných zmesiach alebo produktoch pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V týchto situáciách, keď existuje málo informácií alebo neexistujú žiadne informácie o jeho toxicite, alebo v ktorých sa očakáva, že testovaný materiál bude toxický, je potrebné vykonať základný test.

Limitný test s jednou dávkou 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti sa môže vykonať so šiestimi zvieratami (tri zvieratá na každý krok). Výnimočne sa môže vykonať limitný test s jednou dávkou 5 000 mg/kg s tromi zvieratami (pozri prílohu 2). Ak sa vyskytne uhynutie súvisiace s testovanou látkou, môže byť potrebné vykonať ďalšie testovanie s najbližšou nižšou dávkou.

1.6. POZOROVANIA

Zvieratá sa pozorujú individuálne po podaní dávky aspoň raz počas prvých 30 minút, pravidelne počas prvých 24 hodín, osobitne pozorne počas prvých 4 hodín a potom každý deň počas celkovo 14 dní okrem prípadu, keď je potrebné zvieratá vylúčiť zo štúdie a z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom usmrtiť alebo keď sa zistí, že uhynuli. Dĺžka pozorovania by sa však nemala pevne stanoviť. Stanoví sa na základe toxických reakcií, času nástupu a dĺžky času zotavenia, a teda sa môže predĺžiť, ak sa to pokladá za potrebné. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia toxických príznakov (12). Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam.

Ďalšie pozorovania budú potrebné, ak zvieratá naďalej vykazujú príznaky toxicity. Pri vyšetreniach sa venuje pozornosť zmenám na pokožke a srsti, očiach a slizniciach a tiež respiračnému, obehovému, autonómnemu a centrálnemu nervovému systému a somatomotorickej aktivite a spôsobu správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Zohľadňujú sa aj zásady a kritériá zosumarizované v Humane Endpoints Guidance Document (9). Zvieratá, ktoré sú v moribundnom stave alebo vykazujú silné bolesti alebo pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrtia. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdú uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

1.6.1. Telesná hmotnosť

Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanovuje krátko pred podaním testovanej látky a potom aspoň každý týždeň. Zmeny hmotnosti sa vypočítajú a zaznamenávajú. Na konci testu sa zvieratá, ktoré prežili, odvážia a humánnym spôsobom usmrtia.

1.6.2. Patológia

Všetky testované zvieratá (vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sú vylúčené zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá) sa podrobujú autopsii. Všetky makroskopické patologické zmeny u každého zvieraťa sa zaznamenávajú. Môže sa tiež uvažovať o vykonaní mikroskopického vyšetrenia orgánov, dokazujúceho makropatologické nálezy vo zvieratách, ktoré prežili 24 alebo viac hodín, ktoré môže poskytnúť užitočné informácie.

2. ÚDAJE

O jednotlivých zvieratách sa uvádzajú informácie. Okrem toho sa všetky údaje zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

3. PODÁVANIE SPRÁV

3.1. Správa o teste

Správa o teste musí podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

- fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),
- identifikačné údaje vrátane čísla CAS.

Nosič (v prípade potreby):

- zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,
- počet, vek a pohlavie zvierat (vrátane zdôvodnenia na použitie samcov namiesto samíc, ak je potrebné),
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Testovacie podmienky:

- údaje o zložení testovanej látky vrátane údajov o fyzikálnej forme podávaného materiálu,
- údaje o podávaní testovanej látky vrátane objemov dávok a čase podávania,
- údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu krmiva/zdroja, zdroja vody),
- zdôvodnenie výberu počiatočnej dávky.

Výsledky:

- tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a veľkosti dávky pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti a trvania účinkov),
- tabuľkové spracovanie telesnej hmotnosti a zmien telesnej hmotnosti,
- hmotnosti jednotlivých zvierat v deň podávania dávok, potom v týždňových intervaloch a v čase uhynutia alebo usmrtenia,
- dátum a čas uhynutia v prípade vopred naplánovaného usmrtenia,
- časový priebeh nástupu príznakov toxicity a či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,
- pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Diskusia a interpretácia výsledkov.

Záver.

4. ODKAZY

- (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 Schleder 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 Schleder 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/LC₅₀ 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 LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455 – 470.
 - (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,FF.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.

Príloha 1

POSTUP, KTORÝ JE POTREBNÉ DODRŽIAVAŤ PRE KAŽDÚ POČIATOČNÚ DÁVKU

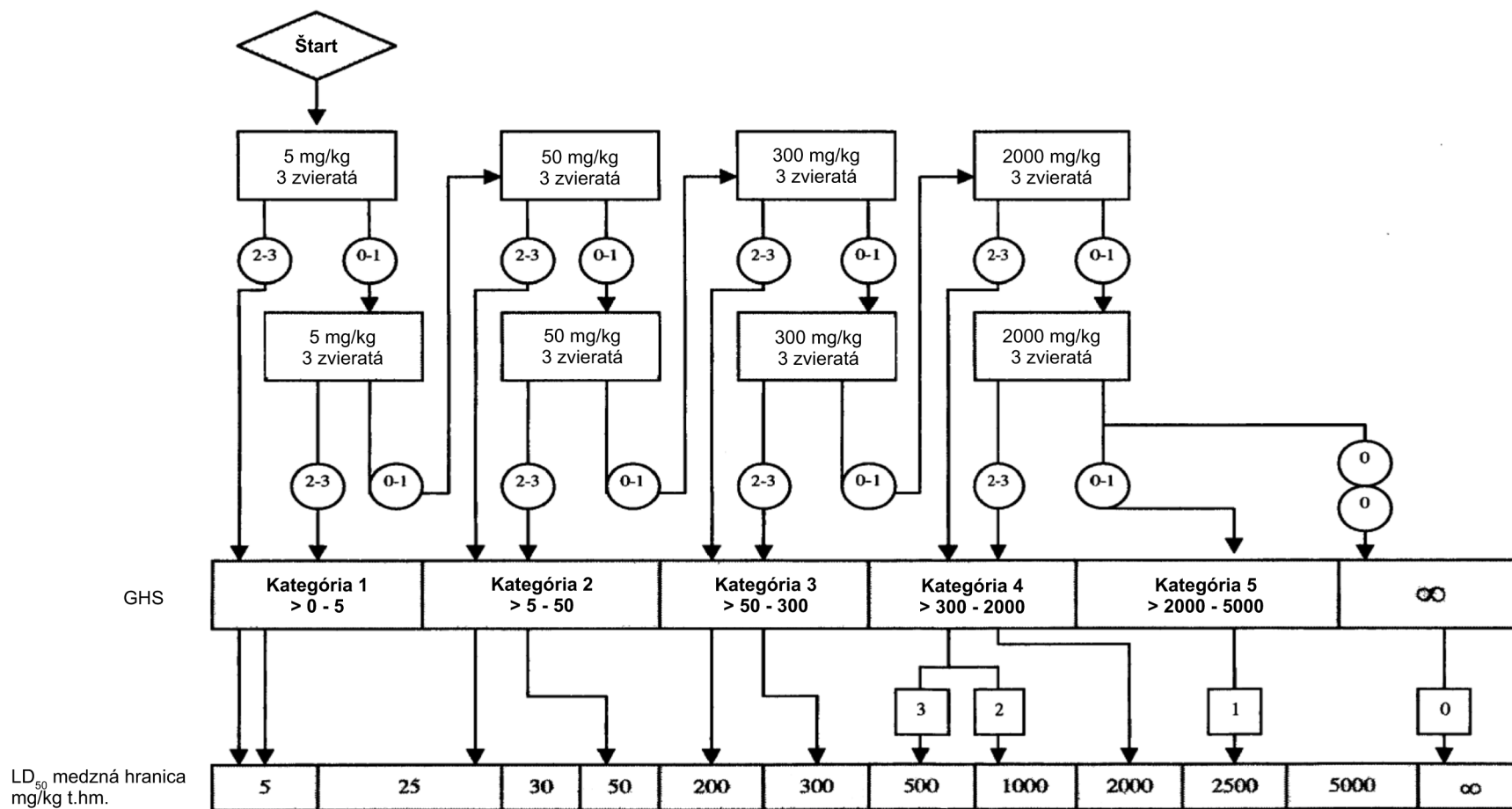
VŠEOBECNÉ POZNÁMKY

Pre každú počiatočnú dávku príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

- príloha 1 A: počiatočná dávka je 5 mg/kg telesnej hmotnosti,
- príloha 1 B: počiatočná dávka je 50 mg/kg telesnej hmotnosti,
- príloha 1 C: počiatočná dávka je: 300 mg/kg telesnej hmotnosti,
- príloha 1 D: počiatočná dávka je: 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

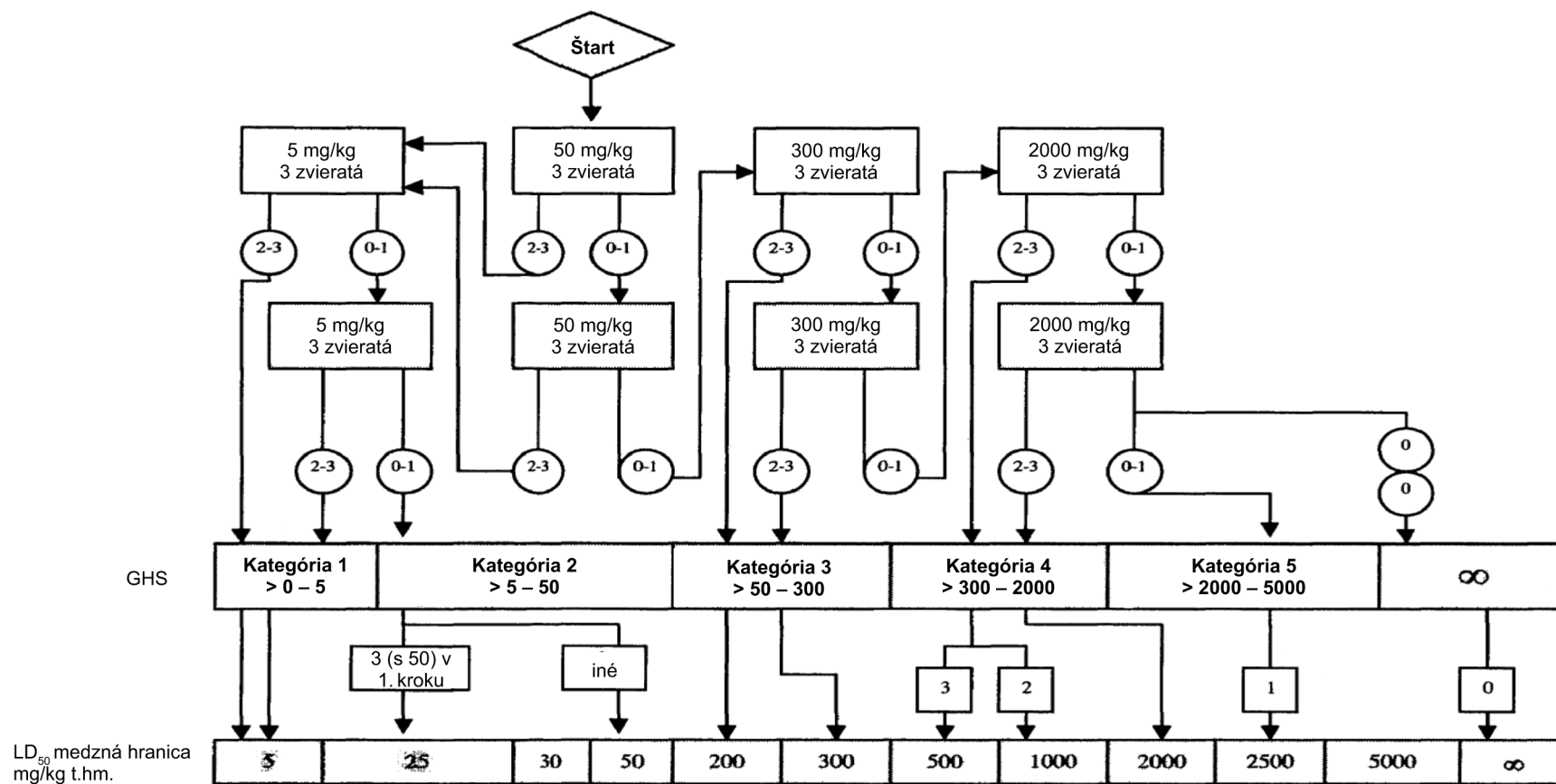
POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 5 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



- nakrok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obikle samice)
 - 0,1,2,3: počet moribudných alebo mŕtvich zvierat v každom kroku
 - GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.h.m.)

- ∞: neklasifikované
 - Testovanie s 5000 mg/kg t.h.m.: pozri prílohu 2

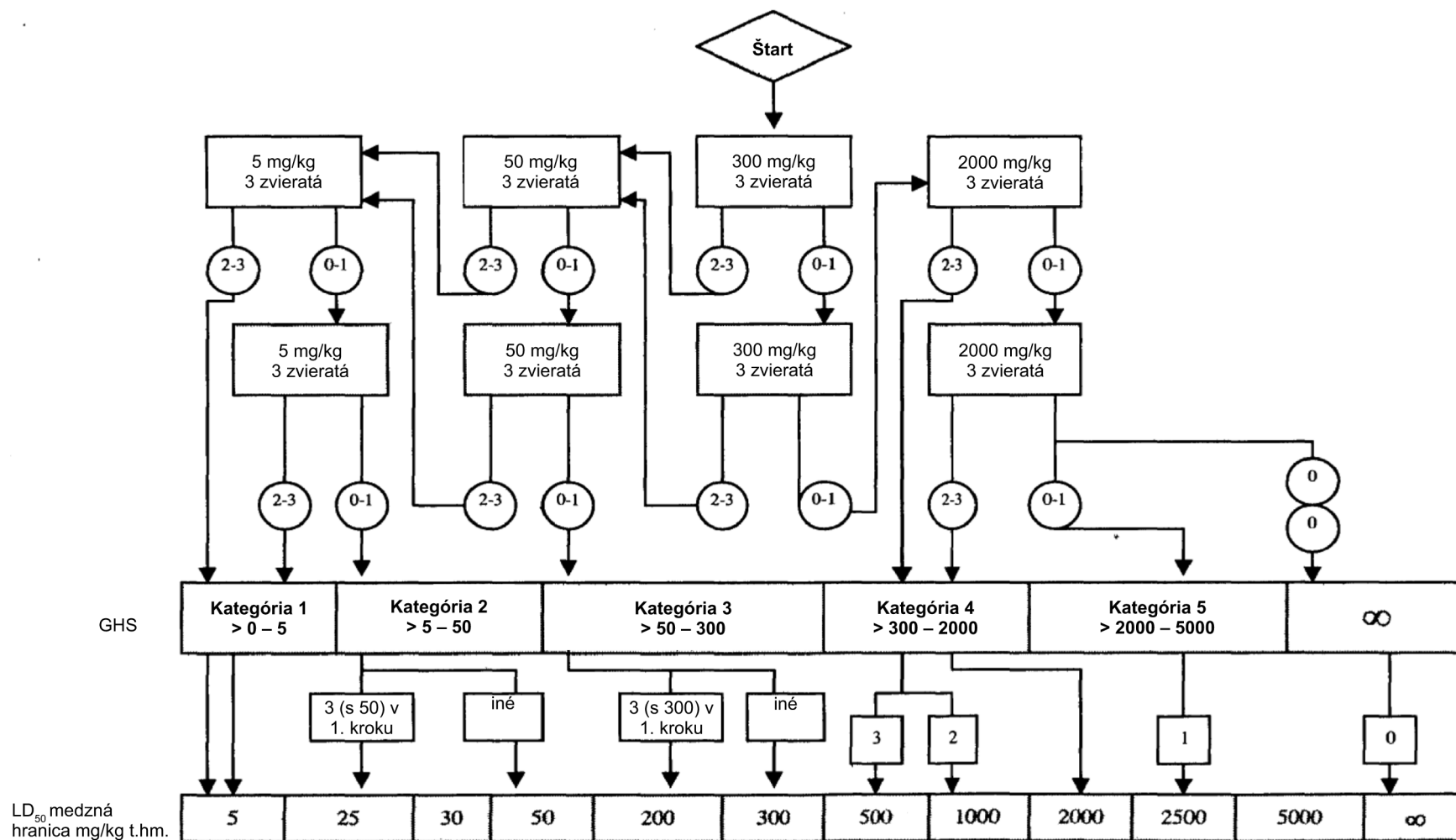
POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 50 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



- na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
- 0, 1, 2, 3: počet moribundných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
- GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

- ∞: neklasifikované
- testovanie s 5000 mg/kg t.hm.: pozri prílohu 2

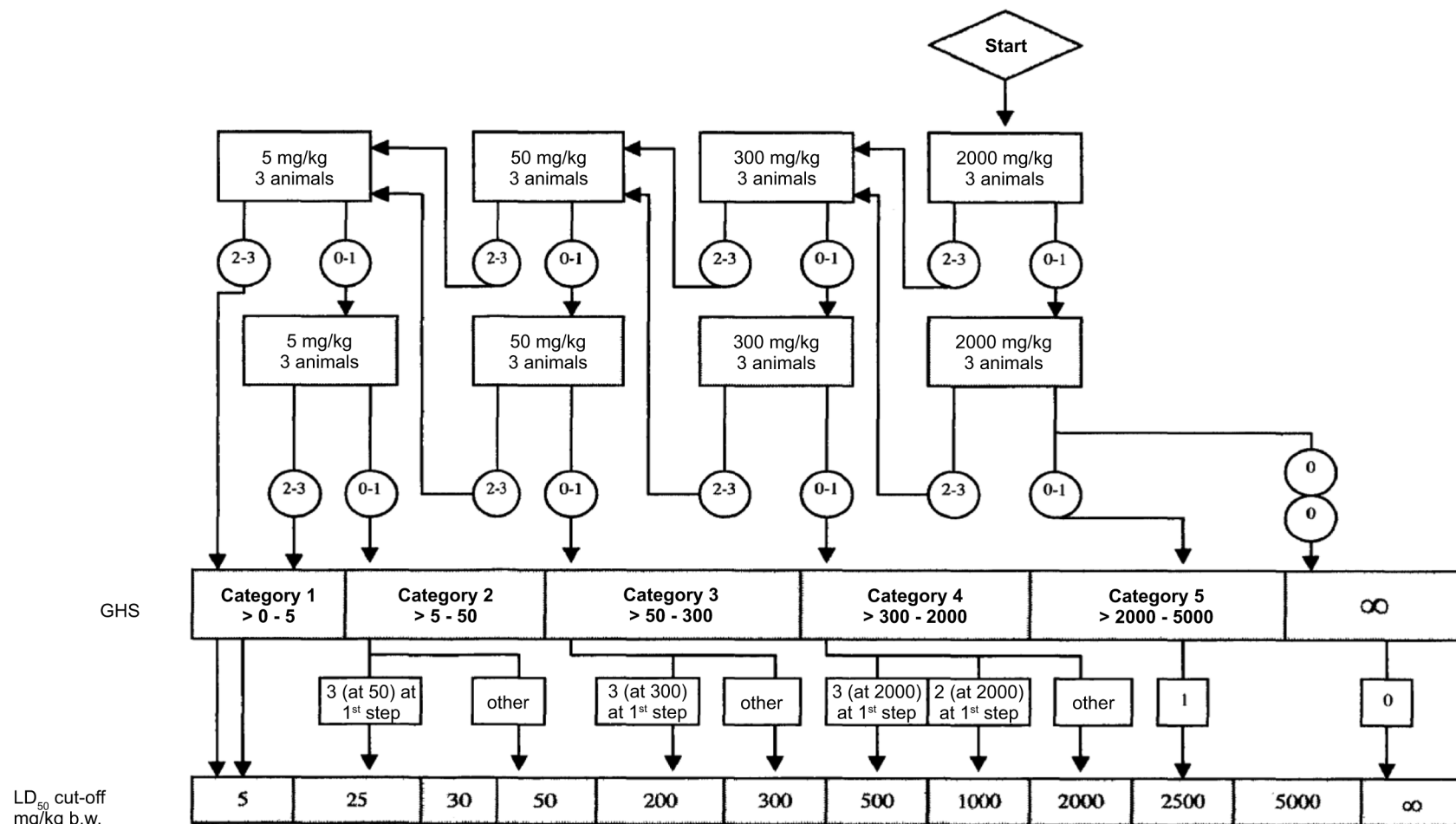
POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 300 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



- na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
- 0,1,2,3: počet moribundných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
- GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

- ∞: neklasifikované
- testovanie s 5000 mg/kg t.hm.: pozri prílohu 2

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 2 000 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



Príloha 2

KRITÉRIÁ PRE KLASIFIKÁCIU TESTOVANÝCH LÁTOK S OČAKÁVANÝMI HODNOTAMI LD₅₀ VYŠŠÍMI AKO 2 000 MG/KG, KTORÉ NIE JE POTREBNÉ TESTOVAŤ

Kritériá pre kategóriu nebezpečenstva 5 sú určené na to, aby sa umožnila identifikácia testovaných látok s relatívne nízkym nebezpečenstvom akútnej toxicity, ale ktoré za určitých podmienok môžu predstavovať nebezpečenstvo pre zraniteľnejšie skupiny obyvateľstva. Predpokladá sa, že tieto látky majú orálnu alebo dermálnu LD₅₀ v rozsahu 2 000 – 5 000 mg/kg alebo rovnocennú s dávkami pre iné cesty podávania. Testované látky sa klasifikujú do kategórie nebezpečenstva, ktorá je definovaná ako: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (kategória 5 v GHS) v týchto prípadoch:

- a) ak sú zaradené do tejto kategórie na základe niektorej z testovacích schém v prílohe 1a – 1d založených na prípadoch úmrtia;
- b) ak je už dostupný spoľahlivý dôkaz, z ktorého vyplýva, že LD₅₀ je v rozsahu hodnôt kategórie 5; alebo z iných štúdií na zvieratách alebo toxických účinkoch u ľudí vyplývajú akútne dôsledky pre zdravie ľudí.
- c) pomocou extrapolácie, odhadu a merania údajov, ak nie je potvrdené zaradenie do vyššej triedy nebezpečenstva, a
 - sú k dispozícii dostupné spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú závažné toxické účinky u ľudí, alebo
 - vyskytla sa mortalita pri testovaní s orálnym podávaním dávok až do hodnôt kategórie 4, alebo
 - ak odborné posúdenie potvrdí závažné klinické príznaky toxicity pri testovaní až do hodnôt kategórie 4, okrem hnačky, zjezenia alebo neupraveného vzhľadu, alebo
 - ak odborné posúdenie potvrdí spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú na základe iných štúdií na zvieratách možné závažné akútne účinky.

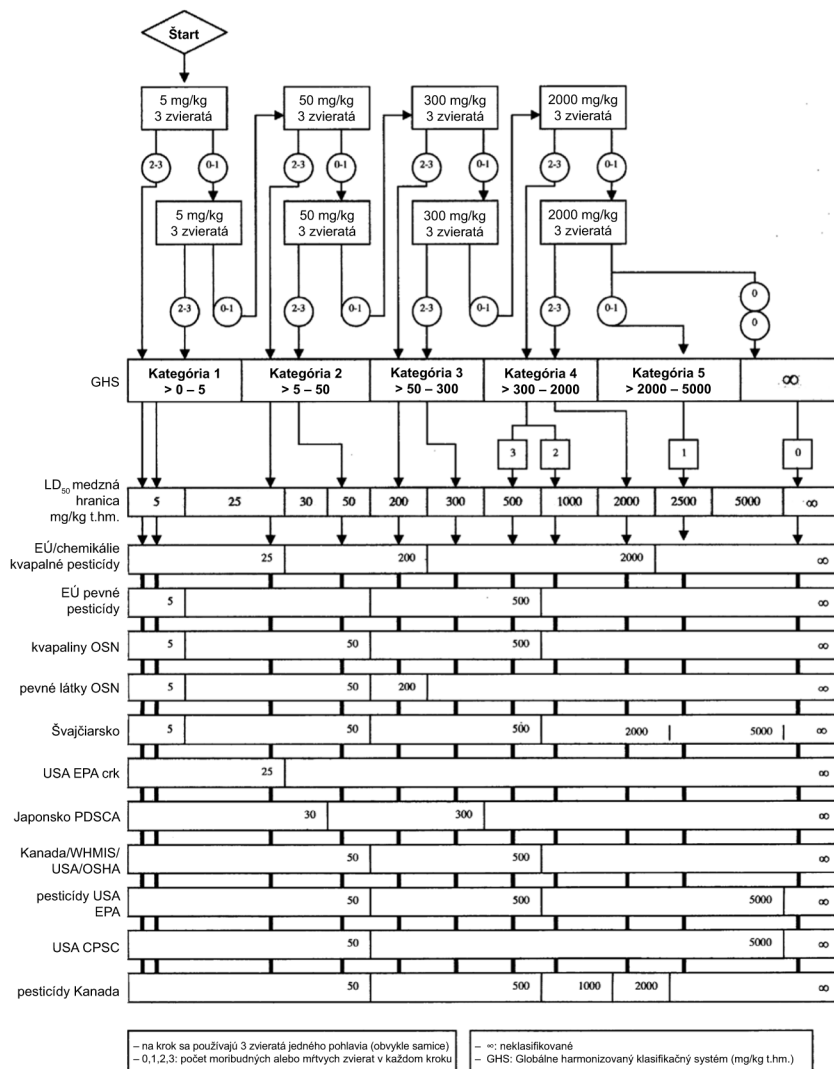
TESTOVANIE S DÁVKAMI NAD 2 000 MG/KG

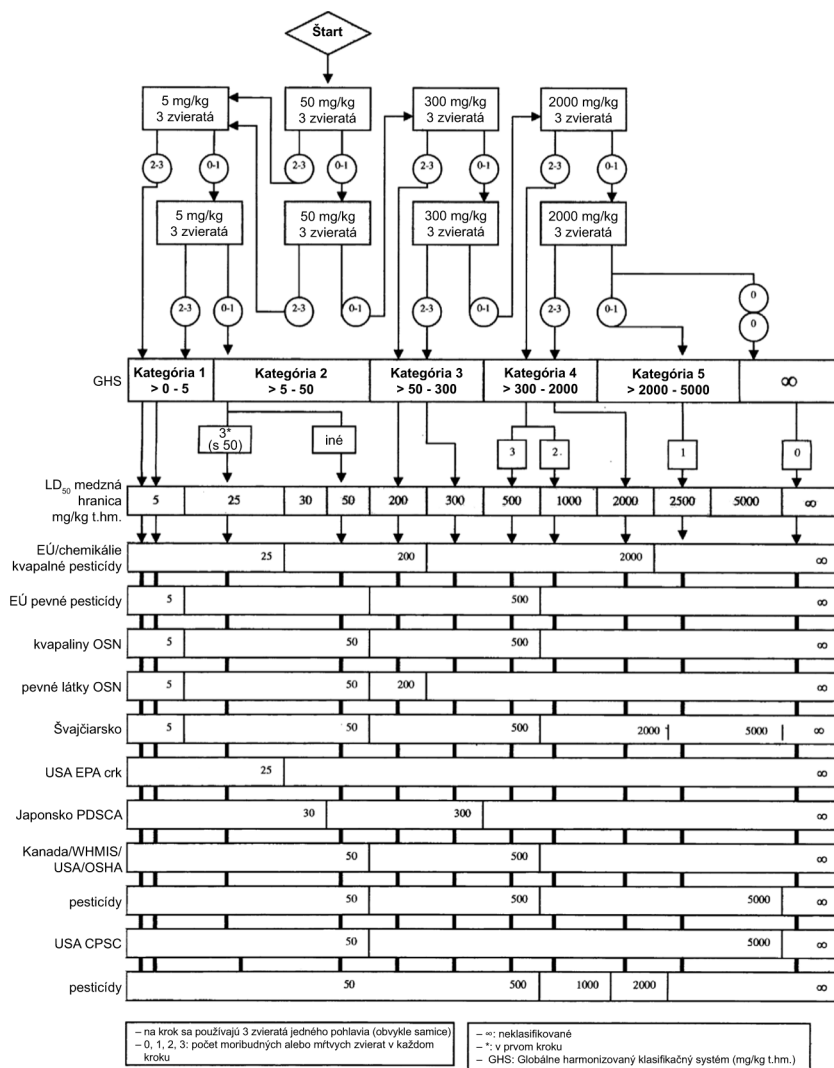
Vzhľadom na potrebu ochrany zvierat sa testovanie zvierat v rozsahoch kategórie 5 (5 000 mg/kg) neodporúča a môže sa o jeho použití uvažovať iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že by výsledky takéhoto testu mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat (10). Nie je potrebné uskutočniť ďalšie testovanie s vyššími dávkami.

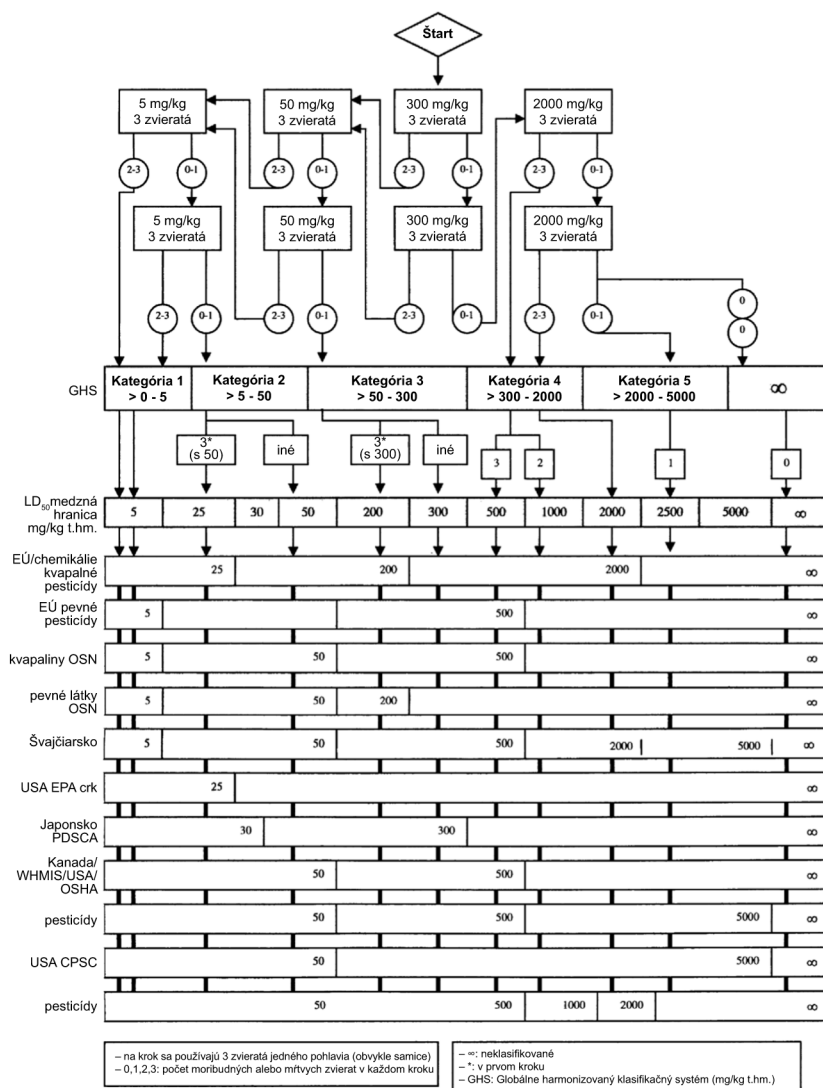
Ak sa pre testovanie vyžaduje dávka 5 000 mg/kg, je potrebný iba jeden krok (t. j. tri zvieratá). Ak zviera, ktorému sa najskôr podala dávka, uhynie, potom podávanie dávok pokračuje s dávkou 2 000 mg/kg v súlade s postupovými diagramami v prílohe 1. Ak prvé zviera prežije, dvom ďalším sa podajú dávky. Ak uhynie iba jedno z troch zvierat, očakáva sa, že hodnota LD₅₀ bude vyššia ako 5 000 mg/kg. Ak obe zvieratá uhynú, potom sa podajú dávky s veľkosťou 2 000 mg/kg.

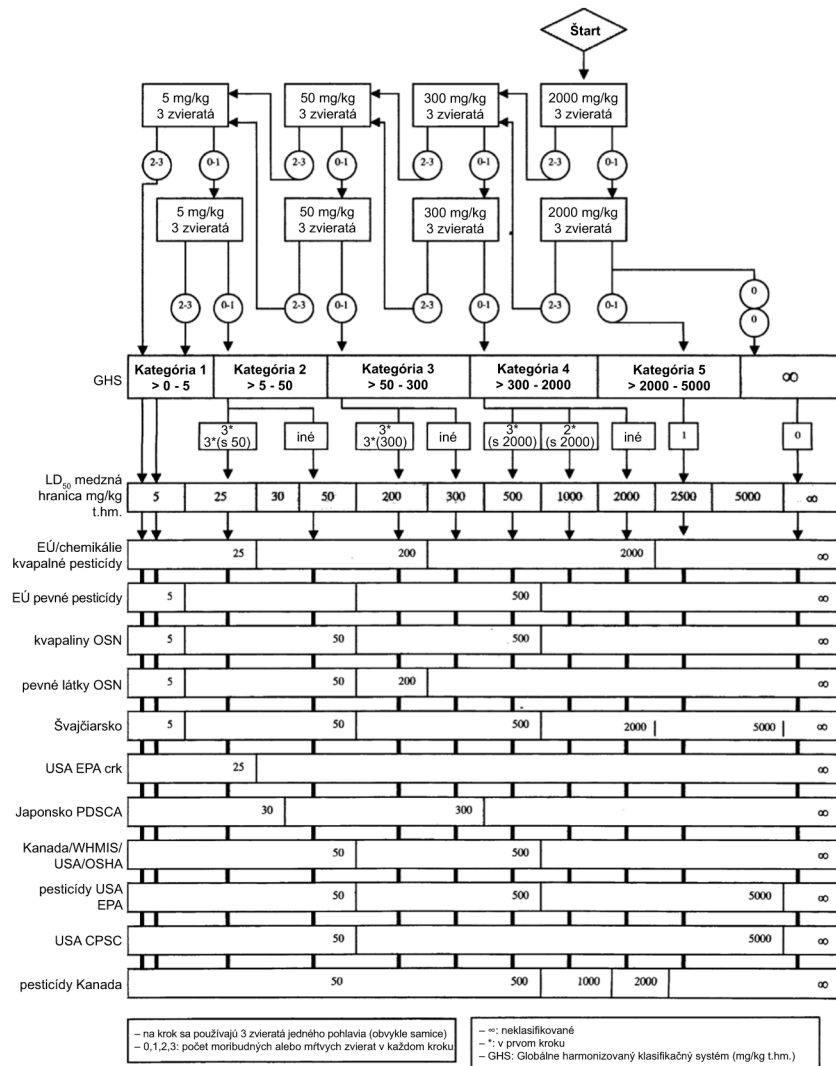
Príloha 3

TESTOVACIA METÓDA B.1 tris: Usmernenie pre klasifikáciu podľa schémy EÚ na prekonanie prechodného obdobia až do úplného zavedenia Globálne harmonizovaného klasifikačného systému (GHS) [prevzaté z odkazu (8)]









B.2. AKÚTNA TOXICITA (INHALAČNÁ)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Je výhodné mať predbežné údaje o rozdelení častíc podľa veľkosti, o tlaku pary, o teplote tavenia, teplote vzplanutia, teplote varu a o výbušnosti látky.

Pozri aj všeobecný úvod časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Viacero skupín pokusných zvierat sa exponuje s testovanou látkou v odstupňovaných koncentráciách na určený čas, a to jedna koncentrácia na jednu skupinu. Nakoniec sa zaregistrujú pozorované následky a prípady úmrtia. Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú.

Zvieratá s ťažkými a pretrvávajúcimi príznakmi utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť. Látky, o ktorých je známe, že týmto spôsobom spôsobujú na základe svojich žieravých a silno dráždivých účinkov bolesť a utrpenie, sa nemusia testovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred testom sa zdravé mladé dospelé zvieratá randomizujú a priradujú k jednotlivým testovaným skupinám. Simulovaná expozícia je potrebná len vtedy, ak si to vyžaduje použitá operatívna expozičná podmienka.

Pri tuhých testovaných látkach môže byť potrebná mikronizácia, aby sa zachovali častice vhodnej veľkosti.

Ak je to potrebné, môže sa do testovanej látky pridať vhodná pomocná látka, aby sa dosiahla potrebná koncentrácia testovanej látky v atmosfére, a v takom prípade sa musí vytvoriť kontrolná skupina, ktorá obsahuje len pomocnú látku. Ak sa k dávke pridá na zjednodušenie podania pomocná látka alebo iná prímes, musia byť známe jej relevantné toxické vlastnosti. Môžu sa použiť prípadne údaje z prechádzajúcich testov.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Ak neexistujú mimoriadne dôvody, tak sa uprednostňuje potkan. Používajú sa známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu na začiatku testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú koncentráciu sa musí použiť minimálne 10 hlodavcov (5 samčekov a 5 samičiek). Samičky nesmú byť po vrhu ani gravidné.

Poznámka: Pri testoch akútnej toxicity na zvieratách, ktoré patria k vyšším stavovcom, ako hlodavce, sa prihliada na použitie nižšieho počtu zvierat. Dávky by sa mali zvoliť starostlivo a veľký dôraz treba klásť na to, aby sa neprekročili primerané toxické dávky. Pri takýchto testoch by sa malo zabrániť podávaniu testovanej látky v letálnych dávkach.

1.6.2.3. Expozičná koncentrácia

Skupiny dávok, najmenej tri, musia stačiť na zachovanie testovaných skupín s toxickými účinkami a medzami úmrtnosti podľa príslušnej klasifikácie. Získané údaje by mali byť dostačujúce na zobrazenie krivky koncentrácie a úmrtnosti, a ak je to možné, mali by umožniť prijateľné určenie LC_{50} .

1.6.2.4. Limitný test

Ak sa u piatich samčekov a piatich samičiek pokusných zvierat vystaveným na štyri hodiny 20 mg/l plynu alebo 5mg/l aerosolu prípadne častíc (alebo maximálnym dosiahnuteľným koncentráciám tam, kde toto v dôsledku fyzikálnych alebo chemických vlastností, napríklad výbušných, skúšanej látky nie je možné) nedokáže mortalita spojená s látkou počas 14 dní nasledujúcich po skúške, ďalšie skúšanie sa nepokladá za nevyhnutné. (18. ATP, smernica 93/21/EHS, L1 10/93)

1.6.2.5. Expozičný čas

Expozičný čas by mal byť štyri hodiny.

1.6.2.6. Vybavenie

Pre testy so zvieratami by sa malo používať inhalačné zariadenie, ktoré zabezpečuje dynamický prúd vzduchu minimálne 12-krát za hodinu, ako aj adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozloženú expozičnú atmosféru. Ak sa používa jedna komora, tak sa musí zostaviť tak, aby boli pokusné zvieratá v nej čo najmenej stlačené a aby bola expozícia maximalizovaná inhaláciou testovanej látky. Aby sa zabezpečila stabilita atmosféry v inhalačnej komore, nemal by „celkový objem“ pokusných zvierat prekročiť 5 % objemu komory. Pre expozície oblasti nosa a úst, hlavy alebo celého tela sa musia používať špeciálne inhalačné komory; obidva prvé druhy expozície majú prispieť k tomu, aby čo najviac obmedzili prijatie testovanej látky inými cestami.

1.6.2.7. Pozorovací čas

Pozorovací čas by mal byť minimálne 14 dní. Čas pozorovania by sa nemal určiť dogmaticky. Mal by závisieť od druhu obrazu otravy, časového prejavu symptómov a od trvania zotavovacej fázy; musí sa predĺžiť vtedy, ak je to nevyhnutné. Časový moment, keď sa prejavia príznaky otravy a zasa odznejú, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú známe príznaky pre spomalenú úmrtnosť.

1.6.3. Postup

Zvieratá sa musia odvážiť bezprostredne pred expozíciou a po expozícii pri nastavení rovnováhy komorovej koncentrácie testovanej látky v určenej aparatúre počas štyroch hodín. Nastavenie rovnováhy by malo zabráť len veľmi málo času. Teplota by mala byť počas testu 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť vzduchu sa udržiava medzi 30 % a 70 %, s výnimkou prípadov, keď sa to nedá realizovať (napr. testy s niektorými aerosólmi). Udržiavanie ľahkého podtlaku v komore (> 5 mm vody) zabráňuje unikaniu testovanej látky do okolia. Počas expozície sa nepodáva žiadna potrava ani voda. Mal by sa používať vhodný systém na vytváranie a kontrolu skúšobnej atmosféry. Systém má zabezpečovať čo najrýchlejšie dosiahnutie konštantných expozičných podmienok. Komora by mala byť nastavená a obsluhovaná tak, aby sa udržalo homogénne rozdelenie skúšobnej atmosféry v komore.

Potrebné je vykonať tieto merania alebo kontroly:

- a) merania prietokového množstva vzduchu (priebežne);

- b) skutočná koncentrácia testovanej látky sa meria počas expozície v dýchacej oblasti minimálne trikrát (v niektorých druhoch atmosféry, napr. aerosóloch vo vysokej koncentrácii, môže byť potrebná častejšia kontrola). Počas expozičnej doby by sa nemala koncentrácia odkláňať o viac ako $\pm 15\%$ od strednej priemernej hodnoty. Pri niektorých aerosóloch sa takáto testovacia úroveň možno nedá dosiahnuť, v takom prípade sa akceptuje väčší rozsah rozptylu. Pre aerosóly sa musí čo možno najčastejšie robiť analýza veľkosti častíc (aspoň na jednu testovanú skupinu);
- c) teplota a vlhkosť vzduchu, ak je to možné, tak priebežne.

Počas expozície a po expozícii sa zvieratá pozorujú a zapisujú sa nálezy pre každé zviera. Tieto pozorovania sa počas prvého dňa vykonávajú veľmi často. Minimálne raz za každý pracovný deň by sa malo vykonať dôkladné klinické vyšetrenie, ostatné denné pozorovania a príslušné opatrenia majú mať za cieľ obmedziť stratu zvierat pre štúdiu, napríklad autopsiou alebo schladením nájdených uhynutých zvierat, alebo izoláciou, alebo humánnym usmrtením slabých a zomierajúcich zvierat.

Pozorovania by mali zahŕňať zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchania a krvného obehu, autonómneho a centrálného nervového systému, ako aj zmeny somatomotoriky a správania. Mimoriadnu pozornosť treba venovať trasu, dýchaniu, kŕčom, slineniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme. Čas smrti sa musí zachytiť čo možno najpresnejšie. Hmotnosť jednotlivých zvierat by sa mala určovať po expozícii týždenne a v čase smrti.

Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, a zvieratá, ktoré prežili až do konca testu, sa pitvú s mimoriadnym ohľadom na všetky zmeny v hornom a dolnom dýchacom trakte. Všetky patologické zmeny sa musia zaprotokolovať. Ak je to potrebné, mali by sa odobrať tkanivá na histopatologické vyšetrenie.

2. ÚDAJE

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky. Z nej musí vyplývať pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, čas smrti jednotlivých zvierat, počet zvierat s ďalšími príznakmi jedovatého účinku, opis toxických následkov a sekčné nálezy. Zmeny hmotnosti sa musia určiť a zapísať, pokiaľ zvieratá prežijú dlhšie ako jeden deň. Zvieratá, ktoré boli predčasne humánne usmrtené z dôvodu podmienených bolestí a utrpenia látkou, sa zaznamenávajú ako látkou podmienené prípady úmrtia. LC_{50} sa vypočítava uznávanou metódou. Vyhodnotenie by malo zahŕňať, ak je to možné, vzťah medzi podanou dávkou, ako aj vznik a stupeň všetkých abnormalít vrátane zmien v správaní, klinických symptómov, ťažkých poškodení, zmien v telesnej hmotnosti, úmrtnosti a iných toxikologických následkov.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- druh zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,
- podmienky skúšania: opis expozičného aparátu vrátane typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému tvorby aerosólov, klimatizačného systému a druhu umiestnenia zvierat v skúšobnej komore. Musia sa opísať prístroje na meranie teploty, vlhkosti vzduchu a koncentrácie aerosólov, ako aj rozdelenie podľa veľkosti častíc.

Expozičné údaje

Tieto údaje sa musia uvádzať v tabuľke a musia sa zobrazovať uvedením stredných priemerných hodnôt a s ohľadom na odchýlky (napr. štandardná odchýlka), a ak je to možné, obsahujú tieto údaje:

- a) prietokové množstvo vzduchu v inhalačnom zariadení;
- b) teplotu a vlhkosť vzduchu;
- c) nominálnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky, ktorá bola daná do inhalačného zariadenia, vydelené objemom vzduchu);

- d) charakteristické vlastnosti vehikula, ak sa použilo;
- e) aktuálnu koncentráciu v dýchacej oblasti;
- f) strednú veľkosť aerodynamických častíc (MMAD) a geometrickú smerodajnú odchýlku (GSD);
- g) čas na nastavenie rovnováhy;
- h) expozičnú dobu;
 - údaje o reakcii vo forme tabuľky, podľa pohlavia a koncentrácie (počet zvierat uhynutých a humánne usmrtených počas testu, počet zvierat prejavujúcich príznaky toxicity, počet exponovaných zvierat),
 - čas smrti počas alebo po podaní testovanej látky, dôvody a kritériá na predčasné usmrčovanie zvierat,
 - všetky pozorovania,
 - hodnotu LC_{50} pre každé pohlavie, zistenú na konci pozorovacieho času (s udaním výpočtovej metódy),
 - 95 % intervalu spoľahlivosti pre LC_{50} (tam, kde je to možné),
 - krivku dávok/úmrtnosti a sklon (tam, kde to metóda stanovenia umožňuje),
 - sekčné nálezy,
 - všetky histopatologické nálezy,
 - diskusiu výsledkov (zvláštnu pozornosť treba venovať vplyvu, aký môže mať predčasné humánne usmrtenie zvierat počas testu na vypočítanú hodnotu LC_{50}),
 - interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

B.3. AKÚTNA TOXICITA (DERMÁLNA)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu v odstupňovaných dávkach viacerým testovaným skupinám, a to jedna dávka na jednu skupinu. Nakoniec sa registrujú pozorované príznaky otravy a prípady úmrtia. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

Zvieratá so silnými a pretrvávajúcimi príznakmi utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť. Látka, o ktorých je známe, že týmto spôsobom spôsobujú svojimi žieravými alebo dráždivými účinkami výrazné bolesti a utrpenie, sa nemusia testovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava**

Pred testom sa zvieratá vo svojich pokusných klietkach aklimatizujú minimálne päť dní na experimentálne chovateľské a krmné podmienky. Pred začatím testu sa zdravé, mladé dospelé zvieratá randomizujú a priradujú k jednotlivým testovaným skupinám. Asi 24 hodín pred začiatkom testu sa strihaním alebo holením odstráni na chrbte pokusných zvierat srst'. Pri strihaní alebo holení treba brať ohľad na to, aby sa nepoškodila koža zvierat, pretože by to viedlo k zmene priepustnosti. Minimálne 10 % plochy tela je potrebné pripraviť na aplikáciu testovanej látky. Ak sa použijú tuhé látky, ktoré možno prípadne rozdrviť na prášok, mala by sa testovaná látka dostatočne navlhčiť vodou alebo prípadne vhodnou pomocnou látkou, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Pri použití vehikula sa musí zohľadniť jeho vplyv na vnikanie testovanej látky do kože. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené.

1.6.2. **Podmienky skúšania**1.6.2.1. *Pokusné zvieratá*

Môžu sa použiť dospelé potkany alebo králiky. Môžu sa používať aj iné zvieratá, ale ich použitie sa musí zdôvodniť. Je potrebné používať známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu na začiatku testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. *Počet a pohlavie*

Používajte minimálne 5 zvierat pre každú koncentráciu. Mali by byť rovnakého pohlavia. Ak sa používajú samičky, nesmú byť po vrhu gravidné. Ak existujú informácie o tom, že jedno pohlavie reaguje výrazne citlivejšie, mali by sa používať zvieratá tohto pohlavia.

Poznámka: Pri testoch akútnej toxicity na zvieratách, ktoré patria k vyššiemu rádu ako hlodavce, sa berie ohľad na použitie menšieho počtu zvierat. Dávky by sa mali voliť starostlivo a veľký dôraz by sa mal klásť na to, aby sa neprekročili primerané toxické dávky. Pri takýchto testoch by sa malo zabrániť podávaniu testovanej látky v letálnych dávkach.

1.6.2.3. Veľkosti dávok

Počet veľkostí dávok by mal byť dostatočný, najmenej tri, a dávky by mali byť vhodne odstupňované, aby vznikli skúšobné skupiny s výrazným rozsahom toxických účinkov a mortality. Pri určovaní veľkosti dávok by sa mal zohľadňovať možný žieravý alebo dráždivý účinok. Získané údaje by mali stačiť na zobrazenie krivky o účinku dávky a tam, kde je to možné, aj na prijateľné stanovenie LD₅₀.

1.6.2.4. Limitný test

Môže sa vykonať limitný test s jednou jedinou dávkou minimálne 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na jednej skupine s 5 samčkami a 5 samičkami pri použití opísaného postupu. Ak sa zistia prípady úmrtia podmienené látkou, mal by sa uvážiť kompletný test.

1.6.2.5. Čas pozorovania

Čas pozorovania by mal trvať minimálne 14 dní. Nemal by však byť určený dogmaticky. Musí závisieť od druhu obrazu otravy, časového vzniku symptómov a od trvania zotavovacej fázy. Pozorovací čas sa musí predĺžiť, ak sa to ukáže nevyhnutné. Časový moment, keď vznikajú a odznievajú príznaky otravy, ich trvanie, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú poznateľné príznaky spomalenej úmrtnosti.

1.6.3. Postup

Zvieratá by sa mali chovať v kliebkach jednotlivo. Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % plochy tela. Pri veľmi toxických látkach môže byť táto plocha menšia, avšak čo možno najväčšia plocha by mala byť pokrytá čo možno najtenšou a najrovnomernejšou vrstvou.

Testovaná látka musí mať počas expozičnej doby 24 hodín kontakt s kožou prostredníctvom porózneho gázového obväzu a nedráždivej náplaste. Pokusná plocha sa musí okrem toho vhodným spôsobom zakryť, aby sa zafixoval a zaistil gázový obväz a testovaná látka, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku, úplná imobilizácia sa však neodporúča.

Po uplynutí expozičnej doby sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ sa dá, použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Pozorovania sa systematicky zaznamenávajú. Pre každé zviera sa vyhotovujú individuálne záznamy. Prvý deň sa pozorujú zvieratá často. Minimálne raz v pracovný deň by sa malo vykonať starostlivé klinické vyšetrenie. Ostatné denné pozorovania a príslušné opatrenia majú za cieľ obmedziť stratu zvierat pre štúdiu, napr. autopsiou alebo schladením nájdených uhynutých zvierat a izoláciou alebo humánnym usmrtením slabých alebo umierajúcich zvierat.

Pozorovania obsahujú zmeny na srsti, koži, očiach, slizniciach, zmeny dýchania a krvného obehu, autonómneho a centrálného nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Mimoriadnu pozornosť treba venovať trasu, kŕčom, slineniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme. Časový moment smrti sa musí zachytiť čo možno najpresnejšie. Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, a zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú. Všetky patologické zmeny sa musia zaprotokolovať. Ak je to potrebné, musia sa odobrať tkanivá na histopatologické vyšetrenie.

Vyhodnotenie toxicity u druhého pohlavia

Po ukončení testu so zvieratami jedného pohlavia sa podáva testovaná látka skupine minimálne s 5 zvieratami iného pohlavia, aby sa zistilo, či tieto zvieratá nereagujú citlivejšie na testovanú látku. Za určitých okolností môže byť oprávnené použitie menšieho počtu zvierat. Ak existuje dostatok dôkazov o tom, že zvieratá skúmaného pohlavia reagujú výrazne citlivejšie, možno upustiť od testu zvierat iného pohlavia.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z nej musí pre každú testovanú skupinu vyplývať počet zvierat na začiatku testu, čas smrti jednotlivých zvierat, počet zvierat prejavujúcich iné známky toxicity, opis toxických účinkov a sekčné nálezy. Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanoví a zaznamená krátko pred aplikáciou testovanej látky, potom v týždenných intervaloch a v čase smrti; zmeny hmotnosti treba stanoviť a zaznamenať, ak zvieratá prežívajú dlhšie než jeden deň. Zvieratá, ktoré boli humánnym spôsobom usmrtené kvôli utrpeniu a bolesti vyvolanej aplikovanou látkou, sa zaznamenávajú ako uhynutie vyvolané látkou. Hodnota LD_{50} sa vypočíta pomocou uznávanej metódy.

Vyhodnotenie údajov by malo, ak je to možné, zahŕňať vzťah medzi podávanou dávkou, ako aj vznik a stupeň všetkých abnormalít vrátane zmien v správaní, klinických symptómov ťažkých poškodení, zmien telesnej hmotnosti, úmrtnosti a iných toxikologických účinkov.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- druh zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,
- podmienky skúšania (vrátane postupu čistenia kože a druhu obväzu – okluzívny alebo neokluzívny),
- veľkosti dávky (s vehikulom, ak sa použije, a koncentrácia),
- pohlavie exponovaných zvierat,
- údaje o reakcii vo forme tabuľky, podľa pohlavia a koncentrácie (počet zvierat uhynutých a humánne usmrtených počas testu, počet zvierat prejavujúcich príznaky toxicity, počet exponovaných zvierat),
- čas smrti po aplikácii dávky, dôvody a kritériá na predčasné usmrcovanie zvierat,
- všetky pozorovania,
- hodnotu LD_{50} pre pohlavie, u ktorého bola vykonaná úplná štúdia, stanovená pre 14-dňové pozorovanie, s uvedením metódy stanovenia,
- 95 % intervalu spoľahlivosti pre LD_{50} (tam, kde je to možné),
- krivku dávok/úmrtnosti a sklon tam, kde to metóda stanovenia umožňuje,
- sekčné nálezy,
- všetky histopatologické nálezy,
- výsledky akéhokoľvek testu na iné pohlavie,
- diskusiu o výsledkoch (zvláštnu pozornosť treba venovať vplyvu, aký môže mať predčasné humánne usmrtenie zvierat počas testu na vypočítanú hodnotu LD_{50}),
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

B.4. AKÚTNÁ TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE KOŽE

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 404 (2002).

1.1. ÚVOD

Pri príprave tejto aktualizovanej metódy sa osobitná pozornosť venovala možným zlepšeniam v súvislosti so starostlivosťou o zvieratá a posúdeniu všetkých existujúcich informácií o testovanej látke, aby sa zabránilo zbytočnému testovaniu na laboratórnych zvieratách. Táto metóda zahrnuje odporúčanie, aby sa pred uskutočnením opísaného *in vivo* testu na poleptanie/podráždenie látkou urobila kritická analýza existujúcich príslušných údajov. Ak dostačujúce údaje nie sú dostupné, môžu sa získať na základe postupného testovania (1). Stratégia testovania zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* testov a je uvedená ako príloha k tejto metóde. Okrem toho sa v prípade potreby odporúča v počiatočnom *in vivo* teste použiť postupne, a nie súčasne, tri testovacie náplasti na zviera.

V záujme vedeckej spoľahlivosti a aj starostlivosti o zvieratá sa *in vivo* testovanie nevykonáva, pokiaľ neboli všetky dostupné údaje súvisiace s potenciálnym poleptaním/podráždením kože látkou vyhodnotené v kritickej analýze. Takéto údaje zahrnujú dôkaz z existujúcich štúdií na ľuďoch a/alebo laboratórnych zvieratách, dôkaz o poleptaní/podráždení jednou alebo viacerými štrukturálne príbuznými látkami alebo zmesami takýchto látok, údaje dokazujúce silnú aciditu alebo alkalitu látky (2) (3) a výsledky z validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov (4) (5) (5a). Táto analýza zníži potrebu *in vivo* testovania na poleptanie/podráždenie kože látkami, pre ktoré už existujú dostatočné dôkazy z iných štúdií k uvedeným dvom konečným bodom.

Uprednostňovaná stratégia postupného testovania, ktorá zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov na poleptanie/podráždenie, je do tejto metódy zahrnutá ako príloha. Stratégia bola vypracovaná a jednomyselne odporúčená účastníkmi workshopu OECD (6) a bola prijatá ako odporúčaná stratégia testovania v Globálne harmonizovanom systéme pre klasifikáciu chemických látok (GHS) (7). Odporúča sa, aby sa táto stratégia testovania dodržiavala pred uskutočnením *in vivo* testovania. V prípade nových látok sa na získanie vedecky spoľahlivých údajov o poleptaní/podráždení látkou odporúča koncepcia postupného testovania. V prípade existujúcich látok s nedostačujúcimi údajmi o poleptaní/podráždení kože sa vedená stratégia použije na získanie chýbajúcich údajov. Použitie odlišnej stratégie testovania alebo testovacej metódy alebo rozhodnutie nepoužiť koncepciu postupného testovania, je potrebné zdôvodniť.

Ak sa poleptanie alebo podráždenie nemôže stanoviť s použitím kritickej analýzy, ktorá je konzistentná so stratégiou postupného testovania, je potrebné uvažovať o použití *in vivo* testu (pozri prílohu).

1.2. DEFINÍCIE

Podráždenie kože: je vznik reverzibilného poškodenia kože po aplikácii testovanej látky v trvaní do 4 hodín.

Poleptanie kože: je vznik ireverzibilného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľné nekrózy cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej látky v trvaní do štyroch hodín. Pre reakcie na poleptanie sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch strata farby následkom vyblednutia kože, kompletne partie bez srsti a jazvy. Na vyhodnotenie nejasných poškodení je potrebné uvažovať o vykonaní histopatologického vyšetrenia.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Látka, ktorá sa má testovať, sa aplikuje v jednorazovej dávke na kožu pokusného zvieratá; neošetrené časti kože testovaného zvieratá slúžia ako kontrola. V stanovených intervaloch zistí a vyhodnotí stupeň podráždenia/poleptania a následne sa opíše, aby sa zabezpečilo kompletne posúdenie účinkov. Trvanie štúdie má byť dostatočné na posúdenie reverzibility alebo ireverzibility pozorovaných účinkov.

Zvieratá, ktoré vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia a/alebo bolesti v ktoromkoľvek štádiu testu, sa humánnym spôsobom usmrtia a daná látka sa na základe toho posúdi. Kritéria pre rozhodnutie o humánnom spôsobe usmrtenia moribundných a silne trpiacich zvierat je možné nájsť v odkaze (8).

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava na *in vivo* test**

1.4.1.1. *Výber druhu zvierat*

Ako laboratórne zviera sa prednostne používa králik-albín a použijú sa zdravé mladé dospelé králiky. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

1.4.1.2. *Príprava zvierat*

Približne 24 hodín pred testom sa dôkladným ostrihaním na chrbtovej časti trupu týchto zvierat odstráni srst. Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa koža neodrala, a použijú sa iba zvieratá so zdravou, neporušenou kožou.

Niektoré druhy králikov majú miesta s hustou srstou, ktoré sa objavujú v určitých obdobiach roka. Takéto miesta, zarastené hustou srstou, by sa nemali používať ako miesta na testovanie.

1.4.1.3. *Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie*

Zvieratá sa umiestnia jednotlivo. Teplota miestnosti pre králiky ako pokusné zvieratá má byť 22 °C ($\pm$ 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť má byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

1.4.2. **Postup testu**

1.4.2.1. *Aplikácia testovanej látky*

Testovaná látka sa aplikuje na malé plochy (približne 6 cm²) kože a zakryje náplasťou z gázy, ktorá sa prichytí leukoplastom, ktorý nespôsobuje podráždenie. V prípadoch, keď nie je možná priama aplikácia (napr. kvapaliny alebo niektoré pasty), sa testovaná látka naniesie najskôr na náplasť z gázy, ktorá sa potom aplikuje na kožu. Náplasť sa voľne prichytí, aby mala kontakt s kožou pomocou vhodného semiokluzívneho obväzu počas trvania expozície. Ak sa testovaná látka aplikuje na náplasť, pripevní sa tak, aby mala dobrý kontakt s kožou a aby látka bola na koži rovnomerne rozložená. Je potrebné zabrániť tomu, aby zviera dosiahlo na náplasť a aby požilo alebo vdýchlo testovanú látku.

Kvapalné testované látky sa zvyčajne používajú neriedené. Pri testovaní tuhých látok (ktoré sa môžu v prípade potreby rozotrieť na prach) sa testovaná látka navlhčí malým množstvom vody (alebo v prípade potreby iným vhodným nosičom), ktoré bude dostatočné na to, aby zabezpečilo dobrý kontakt s kožou. Ak sa použijú iné nosiče ako voda, prípadný vplyv nosiča na podráždenie kože má byť minimálny.

Po skončení expozície, ktorá trvá zvyčajne 4 hodiny, sa zvyšná testovaná látka odstráni podľa potreby s použitím vody alebo vhodného roztoku bez toho, aby sa pozmenila existujúca reakcia alebo integrita epidermy.

1.4.2.2. *Veľkosť dávky*

Na testované miesto sa aplikuje dávka o veľkosti 0,5 ml kvapaliny alebo 0,5 g tuhej látky alebo pasty.

1.4.2.3. *Počiatkový test (in vivo test podráždenia/poleptania kože na jednom zvierati)*

Dôrazne sa odporúča, aby sa v *in vivo* počiatkovom teste použilo jedno zviera, najmä keď sa predpokladá, že látka môže byť žieravá. Je to v súlade so stratégiou postupného testovania (pozri prílohu 1).

Keď sa na základe kritickej analýzy usúdi, že látka je žieravá, ďalšie testovanie na zvieratách nie je potrebné. Pre väčšinu látok, o ktorých sa predpokladá, že sú žieravé, ďalšie *in vivo* testovanie zvyčajne nie je potrebné. V tých prípadoch, kde však následkom nedostatočných dôkazov chýbajú ďalšie potvrdzujúce údaje, sa môže vykonať testovanie na zvieratách v obmedzenom rozsahu na základe tohto prístupu: postupne sa aplikujú na zviera tri

testovacie náplasti. Prvá náplasť sa odstráni po troch minútach. Ak sa nezistí závažná reakcia kože, aplikuje sa druhá náplasť a odstráni sa po jednej hodine. Ak zo zistení v tomto štádiu vyplýva, že je humánne, aby sa expozícia mohla predĺžiť na štyri hodiny, aplikuje sa tretia náplasť a odstráni sa po štyroch hodinách a reakcia sa vyhodnotí.

Ak sa zistí žieravý účinok po ktorejkoľvek z troch postupných expozícií, test sa ihneď ukončí. Ak sa po odstránení poslednej náplasti nezistí žieravý účinok, zviera sa pozoruje 14 dní, pokiaľ sa poleptanie neprejaví skôr.

V tých prípadoch, keď sa neočakáva, že testovaná látka spôsobí poleptanie, ale môže byť dráždivá, aplikuje sa jediná náplasť jednému zvieraťu na štyri hodiny.

1.4.2.4. *Potvrdzujúci test (in vivo test podráždenia kože na ďalších zvieratách)*

Ak sa nezistí žieravý účinok v počiatočnom teste, dráždivá alebo negatívna reakcia sa potvrdí na maximálne dvoch ďalších zvieratách, každé s jednou náplastou s časom expozície štyri hodiny. Ak sa v počiatočnom teste zistí dráždivý účinok, môže sa vykonať potvrdzujúci test postupným spôsobom alebo expozíciou dvoch ďalších zvierat súčasne. Vo výnimočnom prípade, keď sa neuskutoční počiatočný test, dvom alebo trom zvieratám sa môže aplikovať jediná náplasť, ktorá sa odstráni po štyroch hodinách. V prípade, keď sa použijú dve zvieratá, ak obidve vykazujú rovnakú reakciu, nie je potrebné ďalšie testovanie. V opačnom prípade sa testuje aj tretie zviera. Môže byť potrebné, aby sa nejednoznačné reakcie vyhodnotili na ďalších zvieratách.

1.4.2.5. *Doba pozorovania*

Dĺžka času pozorovania má byť dostatočná na celkové posúdenie reverzibility zistených účinkov. Pokus je však potrebné ukončiť vždy, keď zviera vykazuje pretrvávajúce príznaky silnej bolesti alebo utrpenia. Na určenie reverzibilných účinkov sa zvieratá pozorujú do 14 dní po odstránení náplastí. Ak sa pozoruje reverzibilita pred uplynutím 14 dní, pokus je potrebné v tomto čase ukončiť.

1.4.2.6. *Klinické pozorovania a vyhodnotenie kožných reakcií*

Všetky zvieratá sa vyšetrí, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože) a edému (opuchu) a reakcie po 60 minútach sa vyhodnotia a potom po 24, 48 a 72 hodinách po odstránení náplasti. V prípade počiatočného testu na jednom zvierati sa testované miesto tiež vyšetrí bezprostredne po odstránení náplasti. Kožné reakcie sa vyhodnotia a zaznamenajú podľa stupňov v nižšie uvedenej tabuľke. Ak sa vyskytne poškodenie kože, ktoré nie je možné označiť ako podráždenie alebo poleptanie po 72 hodinách, budú potrebné pozorovania až do 14. dňa, aby sa určila reverzibilita účinkov. Okrem toho na pozorovanie podráždenia, všetky lokálne toxické účinky, ako je odmastenie pokožky a všetky systémové nepriaznivé účinky (napr. účinky na klinické príznaky toxicity a telesnú hmotnosť), sa celkovo opíšu a zaznamenajú. Na objasnenie nejednoznačných reakcií je potrebné uvažovať o vykonaní histopatologického vyšetrenia.

Vyhodnotenie kožných reakcií je nevyhnutne subjektívne. Na podporu zosúladenia pri vyhodnocovaní kožnej reakcie a na pomoc testovacím laboratóriám a tým, ktorí sú zainteresovaní na uskutočňovaní a interpretovaní výsledkov, zamestnanci uskutočňujúci vyšetrenia musia byť primerane vyškolení na používanie systému hodnotenia. Užitočnou by mohla byť ilustrovaná príručka na vyhodnotenie podráždenia kože a iných poškodení (9).

2. ÚDAJE

2.1. PREDKLADANIE VÝSLEDKOV

Výsledky štúdie sa zhrnú v podobe tabuliek v záverečnej správe z testu a vzťahujú sa na všetky body uvedené v oddiele 3.1.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Stupne podráždenia kože sa posudzujú v súvislosti s charakterom a závažnosťou poškodení a ich reverzibilitou alebo ireverzibilitou. Jednotlivé stupne nepredstavujú pre dráždivé vlastnosti materiálu absolútnu normu, keďže sa hodnotia aj iné účinky testovaného materiálu. Skôr je potrebné na jednotlivé stupne nazerať ako na referenčné hodnoty, ktoré sa majú posudzovať v súvislosti s inými pozorovaniami zo štúdie.

Pri hodnotení dráždivých reakcií je potrebné posúdiť reverzibilitu poškodení kože. Keď reakcie ako alopecia (obmedzená), hyperkeratóza, hyperplázia a šupinatosť pretrvávajú do konca 14-denného obdobia pozorovania, testovaná látka sa pokladá za dráždivú.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. **SPRÁVA O TESTE**

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

Zdôvodnenie *in vivo* testovania: kritická analýza údajov z predchádzajúcich testov, vrátane výsledkov zo stratégie postupného testovania:

- opis dôležitých údajov dostupných z predchádzajúceho testovania,
- údaje získané v každom štádiu stratégie testovania,
- opis vykonaných *in vitro* testov, vrátane údajov o postupoch, získaných výsledkov s testovanými/referenčnými látkami,
- kritická analýza pre uskutočnenie *in vivo* štúdie.

Testovaná látka:

- identifikačné údaje (napr. číslo CAS; zdroj; čistota; známe nečistoty; číslo šarže),
- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita),
- v prípade zmesi, zloženie a vzájomný percentuálny podiel zložiek.

Nosič:

- identifikácia, koncentrácia (v prípade potreby), použitý objem,
- zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

- použitý druh/kmeň, zdôvodnenie pre použitie iných zvierat ako králik – albín,
- počet zvierat každého pohlavia,
- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku a konci testu,
- vek na začiatku štúdie,
- zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Testovacie podmienky:

- technika prípravy miesta pre náplasť,
- údaje o použitých materiáloch na náplasť a metóda pokrytia náplastou,

- údaje o príprave testovanej látky, aplikácii a odstránení.

Výsledky:

- tabuľkové spracovanie stupňov reakcie podráždenia/poleptania pre každé zviera vo všetkých meraných časoch,
- opisy všetkých pozorovaných poškodení,
- podrobný opis charakteru a stupňa zisteného podráždenia alebo poleptania a všetky histopatologické nálezy,
- opis iných nepriaznivých lokálnych (napr. odmastenie kože) a systémových účinkov okrem podráždenia kože alebo poleptania,
- diskusia k výsledkom.

4. **ODKAZY**

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, L., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 – 429.
- (2) 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 2(5), 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) Testovacia metóda B.40 Leptanie kože.
- (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. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 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, potvrdený 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, november 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (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.

[Na požiadanie k dispozícii na sekretariáte OECD].

Tabuľka I

STUPNE REAKCIÍ KOŽE

Vytvorenie erytému alebo chrasty

Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabráňujúcej posúdeniu erytému	4

Maximálne možný: 4

Vytvorenie edému

Žiadny edém	0
Veľmi slabý edém (sotva pozorovateľný)	1
Slabý edém (okraje oblasti jasne ohraničené zreteľným opuchom)	2
Mierny edém (opuch približne 1 mm)	3
Výrazný edém (opuch viac ako 1 mm a presahujúci za oblasť expozície)	4

Maximálne možný: 4

Na objasnenie nejednoznačných reakcií sa môže vykonať histopatologické vyšetrenie.

Príloha

Stratégia postupného testovania podráždenia a poleptania kože**VŠEOBECNÉ HLADISKÁ**

V záujme vedeckej spoľahlivosti a starostlivosti o zvieratá je dôležité zabrániť bezdôvodnému používaniu zvierat a minimalizovať každé testovanie, ktoré môže spôsobiť silné reakcie u zvierat. Všetky informácie o látke, týkajúce sa jej potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie kože, sa posúdia pred uvažovaním o použití *in vivo* testovania. Môže sa stať, že už existujú dostatočné dôkazy na klasifikáciu testovanej látky, pokiaľ ide o jej potenciál spôsobiť poleptanie alebo podráždenie kože bez toho, aby bolo potrebné vykonať testovanie na laboratórnych zvieratách. Z tohto dôvodu použitie kritickej analýzy a stratégie postupného testovania minimalizuje potrebu *in vivo* testovania, najmä ak látka môže spôsobiť silné reakcie.

Odporúča sa, aby sa kritická analýza používala na posúdenie existujúcich informácií týkajúcich sa podráždenia a poleptania kože látkami na zistenie, či je potrebné vykonať ďalšie štúdie iné ako *in vivo* dermálne štúdie na charakterizáciu tohto potenciálu. Ak sú potrebné ďalšie štúdie, odporúča sa, aby sa na získanie potrebných experimentálnych údajov použila stratégia postupného testovania. V prípade látok, ktoré sa ešte netestovali, sa použije stratégia postupného testovania, aby sa získali údaje potrebné na vyhodnotenie jej potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie kože. Stratégia testovania opísaná v tejto prílohe bola vyvinutá na workshope OECD (1) a neskôr bola potvrdená a rozšírená v Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances a potvrdená 28. spoločným zasadáním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie v novembri 1998 (2).

Aj keď táto stratégia postupného testovania nie je integrálnou súčasťou testovacej metódy B.4, vyjadruje odporúčaný prístup pre určenie charakteristík podráždenia/poleptania kože. Tento prístup predstavuje najlepší postup a aj etický štandard pre *in vivo* testovanie na podráždenie/poleptanie kože. Testovacia metóda poskytuje usmernenie na vykonanie *in vivo* testu a sumarizuje faktory, ktoré je potrebné preskúmať pred začatím takéhoto testu. Stratégia poskytuje prístup pre vyhodnotenie existujúcich údajov o dráždivých/žieravých vlastnostiach testovaných látok a viacstupňový prístup na vytvorenie príslušných údajov o látkach, pre ktoré sú potrebné ďalšie štúdie, alebo pre ktoré sa ešte neuskutočnili žiadne štúdie. Odporúča tiež vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov pre poleptanie/podráždenie kože za špecifických podmienok.

OPIS HODNOTENIA A STRATÉGIE TESTOVANIA

Pred uskutočnením testov ako časti stratégie postupného testovania (obrázok) je potrebné vyhodnotiť všetky dostupné informácie na určenie, či je potrebné *in vivo* testovanie kože. Aj keď by sa mohli získať významné informácie z hodnotenia jednotlivých parametrov (napr. extrémna hodnota pH), je potrebné posúdiť úplnosť existujúcich informácií. Všetky dôležité údaje o účinkoch príslušnej látky alebo jej analógov sa vyhodnocujú pri rozhodovaní na základe kritickej analýzy a uvedie sa zdôvodnenie tohto rozhodnutia. Dôraz sa prednostne kladie na existujúce údaje o účinkoch látky na ľudí a zvieratá, za ktorými nasledujú výsledky z *in vitro* alebo *ex vivo* testovania. Vždy, keď je to možné, je potrebné vyhnúť sa uskutočneniu *in vivo* štúdií žieravých látok. Hodnotenú faktory v stratégii testovania zahŕňujú:

Vyhodnotenie existujúcich údajov o účinkoch látky na ľudí a zvieratá (stupeň 1). Existujúce údaje o účinkoch na ľudí, napr. klinické alebo štúdie expozície na pracovisku a prípadové správy a/alebo údaje z testov na zvieratách, napr. z jednorazových alebo zmesí takýchto látok, z ktorých vyplývajú ich možné žieravé/dráždivé účinky na kožu, dá sa predpokladať, že hodnotenie s účinkami na kožu. Látky, ktorých dráždivé alebo žieravé účinky sú známe, a tie látky, u ktorých je jasne dokázané, že nemajú žieravé alebo dráždivé účinky, nie je potrebné testovať v *in vivo* štúdiách.

Analýza súvislosti medzi štruktúrou a aktivitou (ŠAR) (stupeň 2). Posúdia sa výsledky testovania štrukturálne príbuzných látok, ak sú k dispozícii. Ak je k dispozícii dostatok údajov o účinkoch na ľudí a/alebo zvieratá štrukturálne príbuzných látok alebo zmesí takýchto látok, z ktorých vyplývajú ich možné žieravé/dráždivé účinky na kožu, dá sa predpokladať, že hodnotená testovaná látka vyvolá rovnakú reakciu. V týchto prípadoch sa testovaná látka nemusí testovať. Negatívne údaje zo štúdií štrukturálne príbuzných látok alebo zmesí takýchto látok podľa stratégie postupného testovania neposkytujú dostatočný dôkaz o nežieravých/nedráždivých účinkoch látky. Validované a uznané SAR prístupy sa použijú na identifikáciu potenciálu spôsobiť poleptanie a aj podráždenie kože.

Fyzikálno-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (stupeň 3). Látky vykazujúce extrémne hodnoty pH ako $\leq 2,0$ a $\geq 11,5$ môžu mať veľmi silné lokálne účinky. Ak je extrémna hodnota pH základom pre identifikáciu látky ako žieravú pre kožu, potom jej sa môže tiež zohľadniť jej acidita/alkalita (alebo tlmivá kapacita) (3) (4). Ak z tlmivej kapacity vyplýva, že látka *nemôže* byť pre kožu žieravá, potom sa uskutoční ďalšie testovanie na potvrdenie tejto domnienky, pričom sa prednostne použije validovaný a uznaný *in vitro* alebo *ex vivo* test (pozri stupne 5 a 6).

Dermálna toxicita (stupeň 4). Ak sa dokázalo, že chemikália je veľmi toxická dermálnou cestou a *in vivo* štúdie podráždenia/poleptania kože nie je možné vykonať, pretože množstvo testovanej látky, ktoré sa zvyčajne aplikuje, by mohlo prevýšiť veľmi toxickú dávku a následne spôsobiť uhynutie alebo silné utrpenie zvierat. Okrem toho, ak sa štúdie dermálnej toxicity, pri ktorých sa používajú králiky – albíny, už uskutočnili s limitnou dávkou do 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti alebo vyššou a nepozorovalo sa žiadne podráždenie alebo poleptanie kože, ďalšie testovanie na podráždenie/poleptanie kože sa nemusí vykonať. Pri hodnotení akútnej dermálnej toxicity zo skôr uskutočnených štúdií je potrebné pamätať na množstvo aspektov. Napríklad informácie uvedené v správach o poškodeniach kože môžu byť neúplné. Testovanie a pozorovania sa mohli vykonať na iných druhoch ako králik a v citlivosti svojich reakcií sa môžu druhy značne odlišovať. Aj forma testovanej látky aplikovanej zvieratám nemusí byť vhodná na posúdenie podráždenia/poleptania kože (napr. zriedenie látok na testovanie dermálnej toxicity) (5). V tých prípadoch, keď sa však uskutočnili na králikoch dobre zostavené a vykonané štúdie dermálnej toxicity, môžu sa negatívne zistenia posudzovať ako dostatočný dôkaz, že látka nie je žieravá alebo dráždivá.

Výsledky z in vitro alebo ex vivo testov (stupne 5 a 6). Látky, ktoré dokázali žieravé alebo silne dráždivé vlastnosti vo validovanom a uznanom *in vitro* alebo *ex vivo* teste (6) (7) určenom pre hodnotenie týchto špecifických účinkov, nie je potrebné testovať na zvieratách. Je možné predpokladať, že takéto látky vyvolajú podobné závažné účinky *in vivo*.

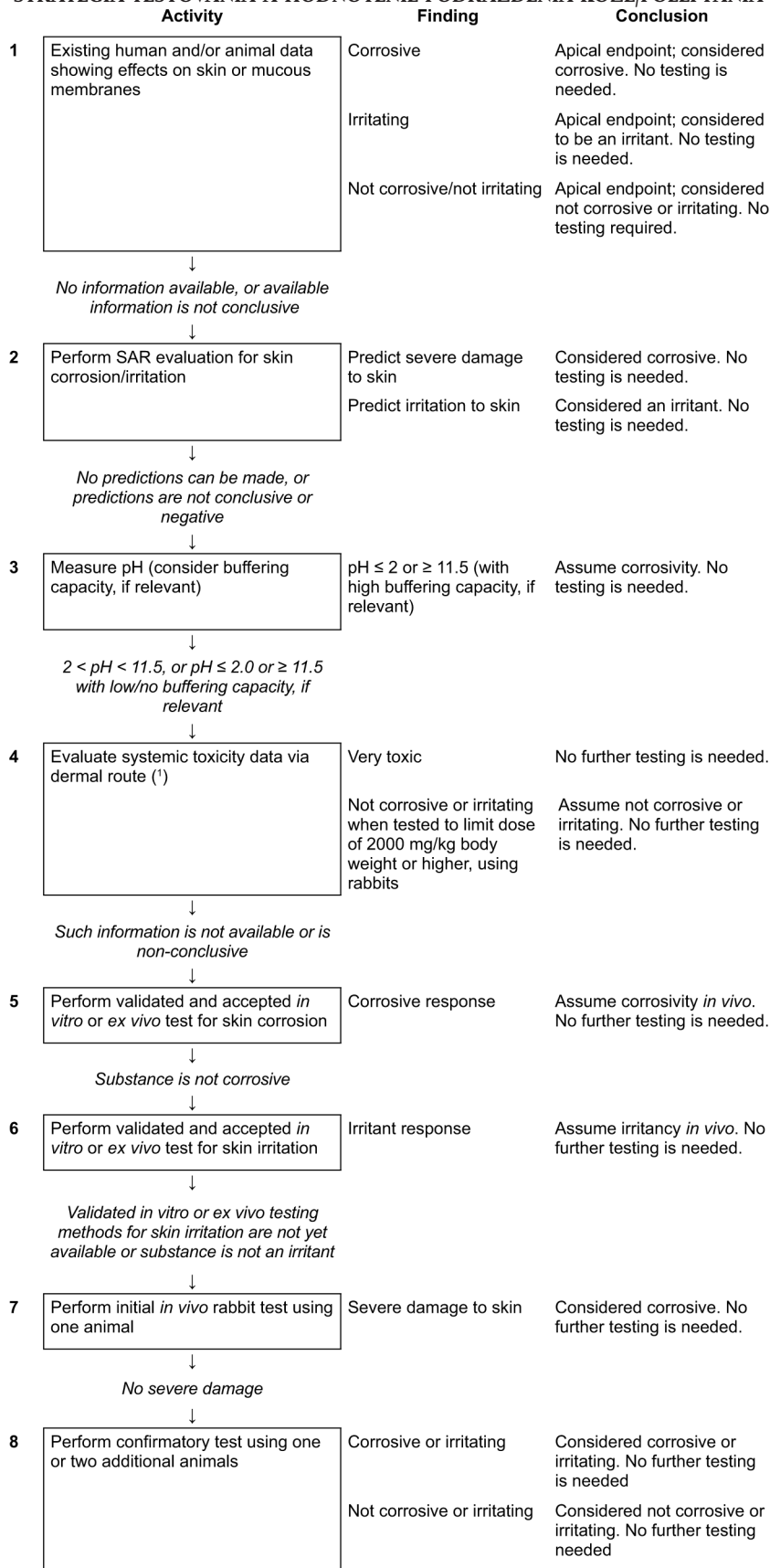
In vivo test na králikoch (stupne 7 a 8). Ak sa zakladá rozhodnutie, či je potrebné vykonať *in vivo* testovanie, na kritickej analýze, malo by sa začať s počiatočným testom na jednom zvierati. Ak výsledky tohto testu preukážu, že látka je žieravá pre kožu, nie je potrebné vykonať ďalšie testovanie. Ak sa nezistí žieravý účinok v počiatočnom teste, dráždivá alebo negatívna reakcia sa potvrdí na maximálne dvoch ďalších zvieratách po dobu expozície štyri hodiny. Ak sa zistí dráždivý účinok v počiatočnom teste, môže sa vykonať potvrdzujúci test postupným spôsobom alebo expozíciou ďalších dvoch zvierat súčasne.

ODKAZY

- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 1996 (http://www.1.oecd.org/ehs/test/b_ackground.htm).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, potvrdený 28. spoločným zasadáním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, 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 Skin Corrosion. ATLA 26, 709 – 720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) pp 19 – 26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411 – 436.
- (6) Testovacia metóda B.40.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Holzhtutter, 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.

Obrázok

STRATÉGIA TESTOVANIA A HODNOTENIE PODRÁŽDENIA KOŽE/POLEPTANIA



(*) can be considered before Steps 2 and 3.

B.5. AKÚTNÁ TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE OKA

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 405 (2002).

1.1. ÚVOD

Pri príprave tejto aktualizovanej metódy sa osobitná pozornosť venovala možným zlepšeniam na základe vyhodnotenia všetkých existujúcich informácií o testovanej látke, aby sa zabránilo zbytočnému testovaniu na pokusných zvieratách, a tým zohľadnila ochrana zvierat. Táto metóda zahrnuje odporúčanie, aby sa pred uskutočnením opísaného *in vivo* testu poleptania/podráždenia oka látkou uskutočnila kritická analýza existujúcich príslušných údajov. Ak nie sú k dispozícii dostačujúce údaje, odporúča sa, aby sa získali na základe postupného testovania (2) (3). Stratégia testovania zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* testov a je uvedená ako príloha k testovacej metóde. Okrem toho sa odporúča použiť *in vivo* test podráždenia/poleptania kože na predpovedanie poleptania oka pred uvážením *in vivo* očnému testu.

V záujme vedeckej spoľahlivosti a aj starostlivosti o zvieratá nie je potrebné uvažovať o *in vivo* testovaní, pokiaľ neboli všetky dostupné údaje súvisiace s potenciálnym poleptaním/podráždením oka látkou vyhodnotené v kritickej analýze. Takéto údaje zahŕňujú dôkaz z existujúcich štúdií na ľuďoch a/alebo laboratórnych zvieratách, dôkaz o poleptaní/podráždení jednou alebo viacerými štrukturálne príbuznými látkami alebo zmesami takýchto látok, údaje dokazujúce silnú aciditu alebo alkalitu látky (4) (5) a výsledky z validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov na poleptanie a podráždenie kože (6) (6a). Štúdie je možné vykonať pred kritickou analýzou alebo ako jej výsledok.

V prípade určitých látok takáto analýza môže poukázať na potrebu *in vivo* štúdií potenciálu látky spôsobiť poleptanie/podráždenie oka. Vo všetkých takýchto prípadoch sa pred uvažovaním o použití *in vivo* očnému testu pokiaľ možno uskutoční najskôr štúdia *in vivo* účinkov látky na kožu a vyhodnotí sa v súlade s testovacou metódou B.4 (7). Použitie kritickej analýzy a stratégie postupného testovania má znížiť potrebu *in vivo* testovania poleptania/podráždenia oka látkami, pre ktoré už existuje dostatok dôkazov z iných štúdií. Ak sa stanovenie poleptania alebo podráždenia oka nedá vykonať s použitím stratégie postupného testovania, ani po uskutočnení *in vivo* štúdie poleptania a podráždenia kože, môže sa vykonať *in vivo* test poleptania/podráždenia oka.

Uprednostňovaná stratégia postupného testovania, ktorá zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov poleptania/podráždenia, je zahrnutá v prílohe k tejto testovacej metóde. Stratégia bola vypracovaná a jednomyselne odporúčaná účastníkmi workshopu OECD (8) a bola prijatá ako odporúčaná stratégia testovania v Globálne harmonizovanom systéme pre klasifikáciu chemických látok (GHS) (9). Odporúča sa, aby sa táto stratégia testovania dodržiavala pred uskutočnením *in vivo* testovania. V prípade nových látok sa na získanie vedecky spoľahlivých údajov o poleptaní/podráždení látkou odporúča koncepcia postupného testovania. V prípade existujúcich látok s nedostačujúcimi údajmi o poleptaní/podráždení kože a oka sa uvedená stratégia použije na získanie chýbajúcich údajov. Použitie odlišných stratégií testovania alebo testovacieho postupu alebo rozhodnutie nepoužiť koncepciu postupného testovania je potrebné zdôvodniť.

1.2. DEFINÍCIE

Podráždenie oka: je vytvorenie zmien na oku po aplikácii testovanej látky na vonkajší povrch oka, ktoré sú úplne reverzibilné do 21 dní po aplikácii.

Poleptanie oka: je vytvorenie poškodenia tkaniva oka alebo závažné fyzické oslabenie zraku po aplikácii testovanej látky na vonkajší povrch oka, ktoré nie sú úplne reverzibilné do 21 dní po aplikácii.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa aplikuje v jednorazovej dávke do jedného oka pokusného zvieratá; neošetrené oko slúži ako kontrola. Stupeň podráždenia/poleptania oka sa vyhodnotí na základe hodnotenia poškodenia spojoviek, rohovky a dúhovky v špecifických intervaloch. Iné účinky na oku a nepriaznivé systémové účinky sa tiež opíšu, aby sa uviedlo úplné vyhodnotenie účinkov. Trvanie štúdie má byť dostatočné na posúdenie reverzibility alebo ireverzibility účinkov.

Zvieratá vykazujúce pretrvávajúce príznaky silného utrpenia a/alebo bolesti v ktoromkoľvek štádiu testu sa humánnym spôsobom usmrť a daná látka sa na základe toho zatriedi. Kritéria pre rozhodnutie humánnym spôsobom usmrť moribundné a silne trpiace zvieratá je možné nájsť v odkaze (10).

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava na *in vivo* test**

1.4.1.1. *Výber druhov*

Ako laboratórne zviera sa pokiaľ možno použije králik – albín a použijú sa zdravé mladé dospelé zvieratá. Je potrebné uviesť zdôvodnenie, ak sa použijú iné kmene alebo druhy.

1.4.1.2. *Príprava zvierat*

Obe oči každého pokusného zvieraťa, predbežne vybraného na testovanie, sa 24 hodín pred začatím testovania vyšetrí. Nepoužijú sa zvieratá vykazujúce podráždenie očí, očné poruchy alebo predchádzajúce zranenie rohovky.

1.4.1.3. *Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie*

Zvieratá majú byť umiestnené jednotlivo. Teplota miestnosti na pokusy s králikmi má byť 22 °C ($\pm$ 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť má byť aspoň 30 % a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

1.4.2. **Postup testu**

1.4.2.1. *Aplikácia testovanej látky*

Testovaná látka sa umiestni do spojkového vaku jedného oka každého zvieraťa po jemnom odtiahnutí spodného viečka od očnej gule. Viečka sa jemne podržia pri sebe asi jednu sekundu, aby sa zabránilo stratám materiálu. Druhé oko, ktoré nebolo ošetrované, slúži ako kontrola.

1.4.2.2. *Vymývanie*

Oči testovaných zvierat sa nevymývajú aspoň 24 hodín po nakvapkaní testovanej látky, okrem tuhých látok (pozri oddiel 1.4.2.3.2), a v prípade okamžitých leptavých alebo dráždivých účinkov. Po 24 hodinách sa môžu vymyť, ak sa usúdi, že je to potrebné.

Použitie ďalšej skupiny zvierat na vyšetrenie vplyvu vymytia sa neodporúča, pokiaľ to nie je vedecky odôvodnené. Ak je potrebná súbežná skupina, použijú sa dva králiky. Podmienky vymytia sa starostlivo zdokumentujú, napr. čas vymytia; zloženie a teplota vymývacieho roztoku, trvanie, objem a rýchlosť aplikácie.

1.4.2.3. *Veľkosť dávky*

1.4.2.3.1. *Testovanie kvapalín*

Pre testovanie kvapalín sa používa dávka 0,1 ml. Na nakvapkanie látky priamo do oka sa nepoužijú pumpičkové spreje. Tekutina zo spreja sa vystrieka a zozbiera v nádobke predtým, ako sa kvapne do oka 0,1 ml.

1.4.2.3.2. *Testovanie tuhých látok*

Pri testovaní tuhých látok, pást a látok, ktoré sú tvorené z častíc, použité množstvo má mať objem 0,1 ml alebo hmotnosť maximálne 100 mg. Testovaný materiál sa pomelie na jemný prášok. Objem tuhého materiálu sa zmeria po jemnom zhutnení, napr. poklepaním nádoby na meranie. Ak testovaná tuhá látka nebola fyziologicky odstránená z oka pokusného zvieraťa pri prvom zisťovaní v časovom bode 1 hodina po ošetrovaní, oko sa môže vymyť fyziologickým roztokom alebo destilovanou vodou.

1.4.2.3.3. *Testovanie aerosólov*

Odporúča sa, aby sa všetky látky v pumpičkových sprejoch a aerosóloch vystriekali a zozbierali pred nakvapkaním do oka. Jedinou výnimkou sú látky v tlakových aerosólových nádobách, ktoré sa nedajú vystrikať a zozbierať kvôli vyparovaniu. V takýchto prípadoch sa oko ponechá otvorené a testovaná látka sa aplikuje do oka ako jednorazové vstriknutie približne jednu sekundu zo vzdialenosti 10 cm priamo na prednú časť oka. Táto vzdialenosť sa môže meniť v závislosti od tlaku spreja a jeho obsahu. Pozornosť je potrebné venovať tomu, aby sa tlakom zo spreja nepoškodilo oko. V určitých prípadoch môže byť potrebné posúdiť možnosť „mechanického“ poškodenia oka tlakom kvapaliny zo spreja.

Odhad dávky z aerosólu sa môže urobiť simulovaním testu takto: látka sa nasprejuje na navažovací papier cez otvor o veľkosti oka kráľika, ktoré je umiestnené tesne pred papierom. Na základe zvýšenia hmotnosti papiera sa odhadne množstvo nasprejované do oka. V prípade prchavých látok sa môže dávka odhadnúť tak, že sa nádobka s materiálom odváži pred odstránením testovaného materiálu a po ňom.

1.4.2.4. *Počiatočný test (in vivo test podráždenia/poleptania oka na jednom zvierati)*

Ako sa zdôrazňuje v stratégii postupného testovania (pozri prílohu 1), dôrazne sa odporúča, aby sa v *in vivo* test uskutočnil najskôr na jednom zvierati.

Ak z výsledkov tohto testu vyplynie, že látka je žieravá alebo silne dráždivá pre oko s použitím uvedeného postupu, ďalšie testovanie na očné dráždivosť nie je potrebné vykonať.

1.4.2.5. *Lokálne anestetiká*

Lokálne anestetiká sa môžu použiť v jednotlivých prípadoch. Ak z kritickej analýzy vyplýva, že látka môže spôsobiť bolesť, alebo počiatočné testovanie ukáže, že sa vyskytne bolestivá reakcia, môže sa pred nakvapkaním testovanej látky použiť lokálne anestetikum. Je potrebné starostlivo zvoliť typ, koncentráciu a dávku lokálneho anestetika, aby sa zabezpečilo, že rozdiely v reakcii na testovanú látku nevzniknú na základe toho, že sa použilo. Kontrolné oko sa rovnako ošetrí anestetikom.

1.4.2.6. *Potvrdzujúci test (in vivo test podráždenia oka na ďalších zvieratách)*

Ak sa v počiatočnom teste nezistí žieravý účinok, dráždivá alebo negatívna reakcia by sa mal potvrdiť na maximálne dvoch ďalších zvieratách. Ak sa zistí silný dráždivý účinok v počiatočnom teste, z ktorého vyplýva silný (ireverzibilný) účinok v potvrdzujúcom testovaní, odporúča sa, aby sa potvrdzujúci test uskutočnil postupným spôsobom v danom čase na jednom zvierati, a nie súčasnou expozíciou dvoch ďalších zvierat. Ak sa na druhom zvierati prejaví žieravé alebo silne dráždivé účinky, test sa preruší. Ďalšie zvieratá môže byť potrebné použiť na potvrdenie slabých alebo miernych dráždivých reakcií.

1.4.2.7. *Doba pozorovania*

Dĺžka času pozorovania má byť dostatočná na celkové posúdenie miery a reverzibility zistených účinkov. Pokus je však potrebné ukončiť vždy, keď zviera vykazuje pretrvávajúce príznaky silnej bolesti alebo utrpenia (9). Na stanovenie reverzibility účinkov sa zvieratá zvyčajne pozorujú spravidla 21 dní po podaní testovanej látky. Ak sa zistí reverzibilita pred uplynutím 21 dní, pokus sa v tomto čase ukončí.

1.4.2.7.1. *Klinické pozorovania a vyhodnotenie reakcií oka*

Oči sa vyšetrí po 1, 24, 48 a 72 hodinách po aplikácii testovanej látky. Hneď ako sa získa konečná informácia, zvieratá už nie potrebné ďalej testovať. Zvieratá vykazujúce pretrvávajúce príznaky silného utrpenia alebo bolesti sa ihneď humánnym spôsobom usmrť a daná látka sa na základe toho posúdi. Zvieratá, ktoré po nakvapkaní majú tieto poškodenia oka, sa humánnym spôsobom usmrť: perforácia rohovky alebo závažná ulcerácia rohovky vrátane stafylomu; krvácanie prednej komory oka; nepriehľadnosť rohovky 4. stupňa, ktoré pretrváva 48 hodín; chýbajúca reakcia zreničiek na svetlo (reakcia dúhovky stupeň 2), ktorá pretrváva 72 hodín; ulcerácia spojovkovej membrány (conjunctiva); nekróza spojoviek alebo tretieho viečka, alebo odlupovanie. Je to kvôli tomu, že takéto poškodenia zvyčajne nie sú reverzibilné.

Zvieratá, u ktorých sa nevyskytlo žiadne poškodenie oka, môžu byť usmrtené najskôr 3 dni po nakvapkaní látky. Zvieratá so slabými až miernymi poškodeniami sa pozorujú, pokiaľ poškodenia nezmiznú, alebo 21 dní, keď je štúdia ukončená. Pozorovania sa uskutočnia na 7., 14. a 21. deň na stanovenie stavu poškodení a ich reverzibility alebo ireverzibility.

Stupne reakcií oka (spojovky, rohovky a dúhovky) sa pri každom vyšetrení zaznamenajú (tabuľka I). Každé ďalšie poškodenie oka (napr. panus, sfarbenie) alebo systémové nepriaznivé účinky sa tiež zaznamenajú.

Na vyšetrenie reakcií sa môže použiť binokulárna lupa, ručná štrbinová lampa alebo biomikroskop, alebo iný vhodný prístroj. Po tom, ako sa zaznamenajú zistenia po 24 hodinách, sa ďalej môžu oči vyšetriť fluoresceínom.

Vyhodnotenie reakcií oka je nevyhnutne subjektívne. Na podporu harmonizácie pri vyhodnotení reakcie oka a na pomoc testovacím laboratóriám a tým, ktorí sú zainteresovaní na uskutočňovaní a interpretovaní výsledkov, musia byť zamestnanci, ktorí uskutočňujú pozorovania, primerane vyškolení na používanie systému hodnotenia.

2. ÚDAJE

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Vyhodnotenie podráždenia oka sa posúdi v súvislosti s charakterom a závažnosťou poškodení a ich reverzibilitou alebo ireverzibilitou. Jednotlivé stupne nepredstavujú absolútne kritérium pre dráždivé vlastnosti materiálu, keďže sa hodnotia aj iné účinky testovaného materiálu. Skôr je potrebné na jednotlivé stupne nazerať ako na referenčné hodnoty, ktoré majú zmysel iba vtedy, keď sú doložené celkovým opisom a posúdením všetkých vyšetrení.

3. PODÁVANIE SPRÁV

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Zdôvodnenie pre *in vivo* testovanie: kritická analýza údajov z predchádzajúcich testov, vrátane výsledkov zo stratégie postupného testovania:

- opis dôležitých údajov dostupných z predchádzajúceho testovania,
- údaje získané v každom štádiu stratégie testovania,
- opis uskutočnených *in vitro* testov, vrátane údajov o postupoch, získaných výsledkov s testovanými/referenčnými látkami,
- opis *in vivo* uskutočnenej štúdie podráždenia/poleptania kože, vrátane získaných výsledkov,
- kritická analýza pre uskutočnenie *in vivo* štúdie.

Testovaná látka:

- identifikačné údaje (napr. číslo CAS; zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),
- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita, reaktivita s vodou),
- v prípade zmesi, zloženie a vzájomný percentuálny podiel zložiek,
- ak sa použije lokálne anestetikum, identifikácia, čistota, typ, dávka a prípadná interakcia s testovanou látkou.

Nosič:

- identifikácia, koncentrácia (v prípade potreby), použitý objem,

- zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

- použitý druh/kmeň, zdôvodnenie pre použitie iných zvierat ako králik – albín,
- vek každého zvieratá na začiatku štúdie,
- počet zvierat každého pohlavia v testovaných a kontrolných skupinách (v prípade potreby),
- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku a konci testu,
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Výsledky:

- opis použitej metódy na hodnotenie podráždenia v každom čase vyšetrenia (napr. ručná štrbinová lampa, biomikroskop, fluorescein),
- tabuľkové spracovanie údajov o dráždivých/žieravých účinkoch pre každé zviera v každom čase vyšetrenia až do vylúčenia každého zvieratá z testu,
- podrobný opis stupňa zisteného podráždenia alebo poleptania,
- opis všetkých pozorovaných poškodení oka (napr. vaskularizácia, vytvorenie panusu, sfarbenie),
- opis iných lokálnych a systémových nepriaznivých účinkov, ktoré sa nevyskytujú na oku, a prípadné histopatologické zistenia.

Diskusia k výsledkom.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Extrapolácia výsledkov štúdií podráždenia oka u laboratórnych zvierat na ľudí je možná len v obmedzenej miere. V mnohých prípadoch je králik – albín citlivejší na látky, ktoré spôsobujú podráždenie alebo poleptanie oka, ako ľudia.

Pozornosť je potrebné venovať interpretácii údajov na vylúčenie podráždenia vyplývajúceho zo sekundárnej infekcie.

4. ODKAZY

- (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., Schleder, 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) Testovacia metóda B.40 Léptanie kože.
- (7) Testovacia metóda B.4. Akútna toxicita: podráždenie/poleptanie kože.
- (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. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (09) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, potvrdený 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, november 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

Tabuľka I

STUPNE POŠKODENIA OKA

Rohovka

Nepriehľadnosť (opacita): stupeň zákalu (odčítava sa od najhustejšej oblasti) (*)

Žiadna ulcerácia alebo nepriehľadnosť (opacita)	0
Roztrúsené alebo difúzne oblasti nepriehľadnosti (opacity) (iné ako ľahký zákal normálneho lesku); zreteľne viditeľné detaily dúhovky	1
Ľahko rozoznateľná priehľadná oblasť; detaily dúhovky mierne zakalené	2
Perleťová oblasť; neviditeľné detaily dúhovky, veľkosť zreničky ťažko rozoznateľná	3
Nepriehľadná rohovka; dúhovka nezistiteľná cez zákal	4

Maximálne možný: 4

POZNÁMKY

(*) Veľkosť nepriehľadnej oblasti rohovky sa zaznamená

Dúhovka

Normálna	0
Nápadne privreté riasy, prekrvenie, opuch, mierne prekrvenie okolo rohovky; alebo injekcia, dúhovka reaguje na svetlo (pomalá reakcia sa pokladá za pozitívnu)	1
Krvácanie, hrubé poškodenie, bez reakcie na svetlo	2

Maximálne možný: 2

Spojovky

Sčervenanie (týka sa palpebrálnych a bulbárnych spojoviek, bez rohovky a dúhovky)

Normálne	0
Niektoré cievy prekrvené (injektované)	1
Difúzne karmínové zafarbenie, jednotlivé cievy ťažko rozoznateľné	2
Difúzna tmavá červeň	3

Maximálne možný: 3

Chemóza

Opuch (týka sa viečok a/alebo tretieho viečka)

Normálne	0
Trocha opuchnuté nad normálom	1
Zreteľný opuch s čiastočným vyvrátením viečok	2
Opuch s polovičným uzavretím viečok	3
Opuch s väčším ako polovičným uzavretím viečok	4

Maximálne možný: 4

Príloha

Stratégia postupného testovania podráždenia a poleptania oka**VŠEOBECNÉ HLADISKÁ**

V záujme vedeckej spoľahlivosti a starostlivosti o zvieratá je dôležité zabrániť bezdôvodnému používaniu zvierat a minimalizovať testovanie, ktoré môže spôsobiť silné reakcie u zvierat. Všetky informácie o látke, ktoré sa týkajú jej potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie oka, je potrebné posúdiť pred uvažovaním o použití *in vivo* testovania. Môžu už existovať dostatočné dôkazy na klasifikáciu testovanej látky, pokiaľ ide o jej potenciál spôsobiť poleptanie alebo podráždenie oka bez toho, aby bolo potrebné vykonať testovanie na laboratórnych zvieratách. Z tohto dôvodu použitie kritickej analýzy a stratégie postupného testovania minimalizuje potrebu *in vivo* testovania, najmä ak látka môže spôsobiť silné reakcie.

Odporúča sa, aby sa použila kritická analýza na posúdenie existujúcich informácií, týkajúcich sa podráždenia a poleptania oka látkami, a na stanovenie, či je potrebné vykonať ďalšie štúdie iné ako *in vivo* štúdie oka na umožnenie charakterizácie tohto potenciálu. Ak sú potrebné ďalšie štúdie, odporúča sa, aby sa na získanie príslušných experimentálnych údajov použila stratégia postupného testovania. V prípade látok, ktoré sa ešte netestovali, sa použije stratégia postupného testovania, aby sa získali údaje, potrebné na vyhodnotenie jej potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie oka. Stratégia testovania, opísaná v tejto prílohe, bola vyvinutá na workshope OECD (1). Neskôr bola potvrdená a rozšírená v Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances a potvrdená 28. spoločným zasadáním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie v novembri 1998 (2).

Aj keď táto stratégia testovania nie je integrálnou súčasťou testovacej metódy B.5, vyjadruje odporúčaný prístup pre určovanie charakteristík podráždenia/poleptania oka. Tento prístup predstavuje najlepší postup a aj etický štandard pre *in vivo* testovanie podráždenia/poleptania oka. Testovacia metóda poskytuje usmernenie na vykonanie *in vivo* testu a sumarizuje faktory, ktoré je potrebné preskúmať pred začatím takéhoto testu. Stratégia postupného testovania poskytuje prístup na základe kritickej analýzy na vyhodnotenie existujúcich údajov o dráždivých/žieravých vlastnostiach látok pre oko a viacstupňový prístup na vytvorenie príslušných údajov o látkach, pre ktoré sú potrebné ďalšie štúdie, alebo pre ktoré sa ešte neuskutočnili žiadne štúdie. Stratégia zahŕňa vykonanie najskôr validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov a potom testovacej metódy B.4 štúdie poškodenia/poleptania kože v špecifických podmienkach (3)(4).

OPIS STRATÉGIE POSTUPNÉHO TESTOVANIA

Pred vykonaním testov ako súčasti stratégie postupného testovania (obrázok) sa posúdia všetky dostupné informácie na určenie, či je potrebné *in vivo* testovanie na oku. Aj keď by bolo možné získať významné informácie z hodnotenia jednotlivých parametrov (napr. extrémna hodnota pH), je potrebné posúdiť úplnosť existujúcich informácií. Všetky dôležité údaje o účinkoch príslušnej látky a jej štrukturálnych analógov sa vyhodnotia pri rozhodovaní na základe kritickej analýzy a uvedie zdôvodnenie rozhodnutia. Prednostne je potrebné zamerať sa na existujúce údaje o účinkoch látky na ľudí a zvieratá, za ktorými nasledujú výsledky z *in vitro* alebo *ex vivo* testovania. Vždy, keď je to možné, je potrebné zabrániť, aby sa uskutočňovali *in vivo* štúdie žieravých látok. Hodnotené faktory v stratégii testovania zahŕňujú:

Vyhodnotenie existujúcich účinkov látky na ľudí a zvieratá (stupeň 1). Existujúce údaje o účinkoch na ľudí, napr. klinické štúdie alebo štúdie expozície na pracovisku a prípadové správy a/alebo údaje z testovania pri štúdiách na očiach na zvierat sa posúdia ako prvé, pretože poskytujú informácie priamo súvisiace s účinkami na oči. Potom sa posúdia dostupné údaje zo štúdií na ľuďoch a/alebo zvieratách, ktorými sa hodnotilo poleptanie/podráždenie kože. Látky, ktorých žieravé alebo silne dráždivé účinky na oko sú známe, sa neaplikujú do očí zvierat a ani tie látky, u ktorých je preukázané, že majú žieravé alebo dráždivé účinky na kožu, takéto látky by sa mali pokladať za žieravé a/alebo dráždivé aj na oči. Látky s dostatočnými dôkazmi o nežieravých a nedráždivých účinkoch z prechádzajúcich štúdií uskutočnených na očiach tiež už nie je potrebné testovať v *in vivo* štúdiách na očiach.

Analýza súvislostí medzi štruktúrou a aktivitou (ŠAR) (stupeň 2). Je potrebné posúdiť výsledky testovania štrukturálne príbuzných chemikálií, ak sú k dispozícii. Ak je k dispozícii dostatok údajov o účinkoch na ľudí a/alebo zvieratá o štrukturálne príbuzných látkach alebo zmesiach takýchto látok, z ktorých vyplývajú ich možné žieravé/dráždivé účinky na oči, dá sa predpokladať, že testovaná látka vyvolá rovnaké reakcie. V týchto prípadoch sa látka nemusí testovať. Negatívne údaje zo štúdií štrukturálne príbuzných látok alebo zmesi takýchto látok podľa stratégie postupného testovania neposkytujú dostatočný dôkaz o nežieravých/nedráždivých účinkoch látky. Validované a uznané prístupy ŠAR sa použijú na identifikáciu potenciálu spôsobiť poleptanie a podráždenie kože a očí.

Fyzikálno-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (stupeň 3). Látky vykazujúce extrémne hodnoty pH ako $\leq 2,0$ a $\geq 11,5$ môžu mať veľmi silné lokálne účinky. Ak je extrémna hodnota pH základom pre identifikáciu látky, že spôsobuje poleptanie alebo podráždenie očí, potom sa tiež môže zohľadniť jej acidita/alkalita (alebo tlmivá kapacita) (5) (6). Ak z tlmivej kapacity vyplýva, že látka *nemôže* spôsobiť poleptanie oka, potom je potrebné vykonať ďalšie testovanie na potvrdenie tejto domnienky, pričom sa pokiaľ možno použije validovaný a uznaný *in vitro* alebo *ex vivo* test (pozri oddiel stupeň 5 a 6).

Posúdenie ďalších existujúcich informácií (stupeň 4). V tomto stupni sa posúdia všetky dostupné informácie o systémovej toxicite dermálnou cestou. Tiež sa posúdi akútna dermálna toxicita testovanej látky. Ak sa testovaná látka prejavila ako veľmi toxická dermálnou cestou, nemusí sa testovať na oku. Aj keď bezpodmienečne neexistuje vzťah medzi akútnou dermálnou toxicitou a podráždením/poleptaním oka, dá sa predpokladať, že ak je látka veľmi toxická dermálnou cestou, bude vykazovať vysokú toxicitu aj pri aplikácii do oka. Takéto údaje sa tiež môžu hodnotiť medzi stupňami 2 a 3.

Výsledky z in vitro alebo ex vivo testov (stupne 5 a 6). Látky, ktoré preukázali žieravé alebo silne dráždivé vlastnosti v in vitro alebo ex vivo teste (7) (8), ktoré boli validované a uznané na hodnotenie špecifických žieravých/dráždivých účinkov na oko alebo kožu, nie je potrebné testovať na zvieratách. Dá sa predpokladať, že takéto látky vyvolajú podobné závažné účinky in vivo. Ak nie sú k dispozícii validované a uznané in vitro/ex vivo testy, vynechajú sa stupne 5 a 6 a pristúpi sa priamo k stupňu 7.

Posúdenie in vivo dráždivých alebo žieravých účinkov látky na kožu (stupeň 7). Ak neexistuje dostatok dôkazov na vykonanie presvedčivej kritickéj analýzy potenciálu látky spôsobiť podráždenie/poleptanie oka založených na údajoch z uvedených štúdií, je potrebné najskôr posúdiť in vivo potenciál spôsobiť podráždenie/poleptanie kože s použitím testovacej metódy B.4 (4) a k nej patriacej prílohy (9). Ak je o látke známe, že spôsobuje poleptanie alebo silné podráždenie kože, pokladá sa za látku so žieravými/dráždivými účinkami na oči, pokiaľ z iných informácií nevyplýva iný záver. Na základe toho nie je potrebné vykonať in vivo očný test. Ak látka nie je žieravá alebo silne dráždivá pre kožu, in vivo očný test je potrebné vykonať.

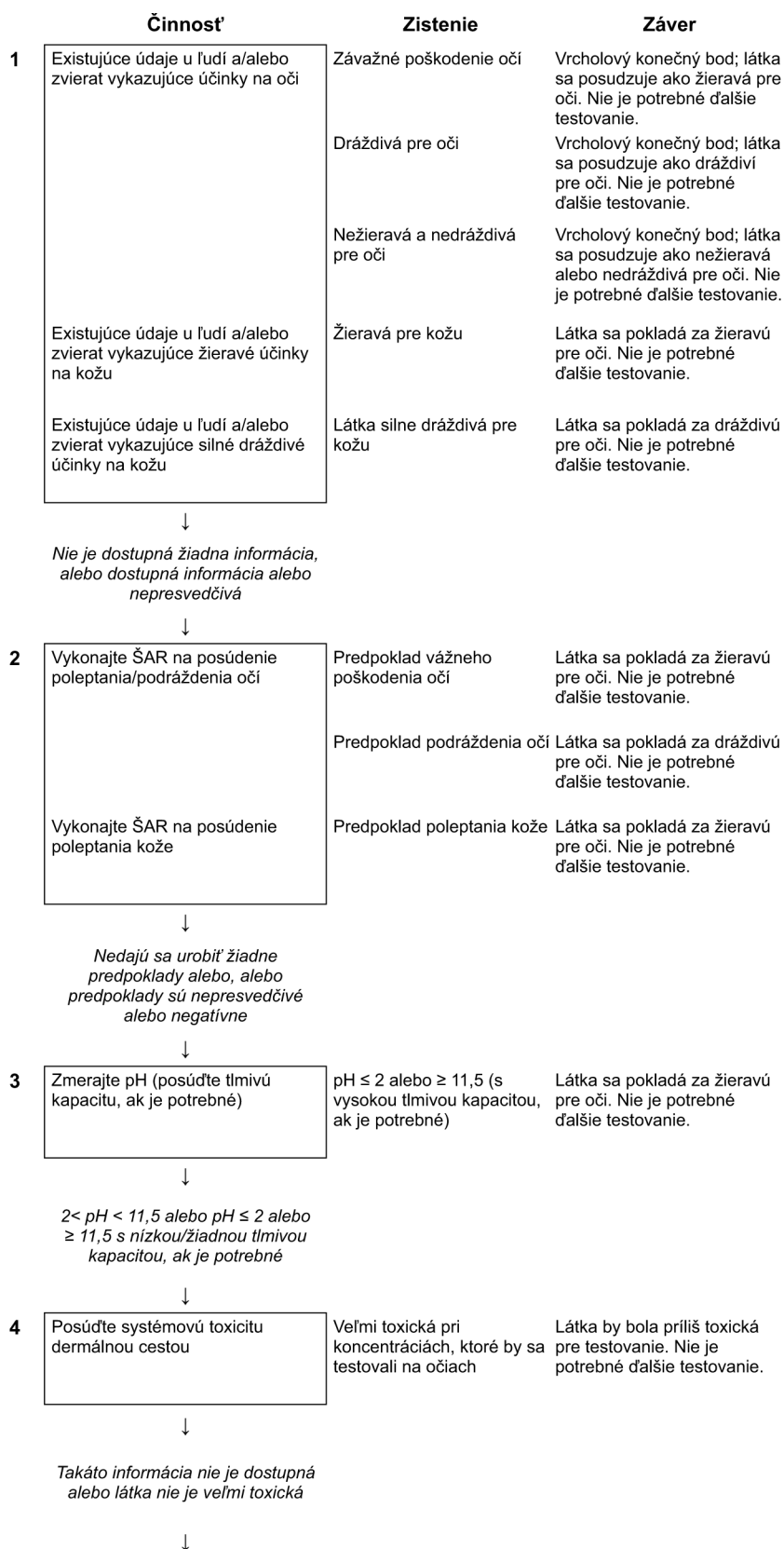
In vivo test na králikoch (stupne 8 a 9). In vivo testovanie na očiach je potrebné začať počiatočným testom na jednom zvierati. Ak výsledky tohto testu preukážu, že látka je silne dráždivá alebo žieravá pre oči, nie je potrebné vykonať ďalšie testovanie. Ak sa nepreukážu žiadne žieravé alebo silne dráždivé účinky, uskutoční sa potvrdzujúci test na dvoch ďalších zvieratách.

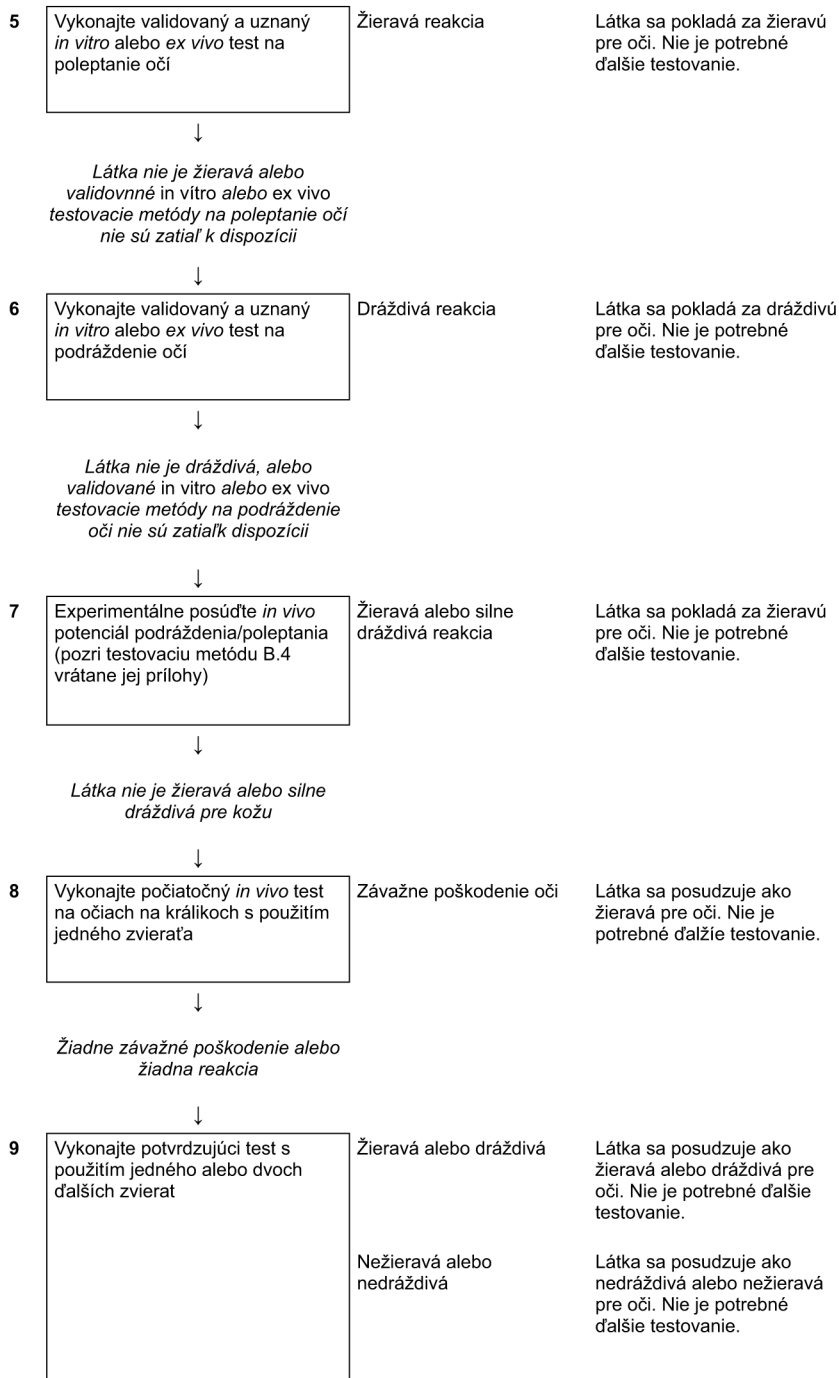
ODKAZY

- (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. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, potvrdený 28. spoločným zasadáním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, november 1998 (<http://www1.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) Testovacia metóda B.4. Akútna toxicita: podráždenie/poleptanie kože.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19 – 26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483 – 524.
- (8) Testovacia metóda B.4.0 leptanie kože.
- (9) Príloha k testovacej metóde B.4: Stratégia postupného testovania podráždenia a poleptania kože.

Obrázok

STRATÉGIA TESTOVANIA A HODNOTENIA PODRÁŽDENIA/POLEPTANIA OKA





B.6. PODRÁŽDENIE POKOŽKY

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Poznámky:

Citlivosť a schopnosť testov zistiť potenciál senzibilizátorov ľudskej pokožky je považovaný v systéme klasifikácie toxicity dôležitej pre ľudské zdravie za dôležitý.

Neexistuje jednoduchá metóda testovania, ktorá by postačujúco rozpoznala všetky látky s potenciálom dráždenia ľudskej pokožky a ktorá by bola vhodná pre všetky látky.

Pri výbere testu sa berú do úvahy také faktory, ako sú fyzikálne vlastnosti látky, vrátane jej schopnosti prenikať do pokožky.

Skúšky s adjuvansom sú pravdepodobne presnejšie v predpovedi pravdepodobného senzibilizačného účinku na ľudskú pokožku ako metódy bez použitia Freundsovho kompletného adjuvansu, a preto sa im dáva prednosť.

Vyvinuli sa dva typy testov, pri ktorých sa používajú morčatá: testy s pomocnou látkou, v ktorých je alergický stav zosilňovaný rozpustením alebo suspendovaním látky v kompletnom Freundsovom adjuvanse (FCA), a testy bez pomocnej látky.

Často používaným typom adjuvansového testu je maximalizovaný test morčiat (GPMT). Hoci sa na zistenie potenciálu látky spôsobujúcej precitlivosť pokožky používajú aj iné metódy, GPMT sa medzi adjuvansovými metódami uprednostňuje.

U väčšiny skupín chemikálií sa neadjuvansové metódy (uprednostňuje sa Buehlerov test) považujú za menej citlivé.

V určitých prípadoch môžu existovať príčiny pre výber Buehlerovho testu, v ktorom sa využíva miestne použitie namiesto intradermálneho vstrekovania využívaného maximalizovaným testom morčiat (GPMT). Pri použití Buehlerovho testu je nevyhnutné vedecké zdôvodnenie jeho použitia.

V tejto metóde je opísaný maximalizovaný test morčiat (GPMT) aj Buehlerov test. Iné metódy sa môžu použiť za predpokladu, že sú dostatočne overené a vedecky zdôvodnené.

Ak sa v screeningovom teste zistia pozitívne výsledky, látka sa navrhne ako potenciálny senzibilizátor a nie je potrebné uskutočniť ďalšie testovanie s morčatami. Ak sa v takomto teste zistia negatívne výsledky, je nutné uskutočniť test s morčatami použitím postupu opísaného v tejto testovacej metóde.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Precitlivosť pokožky: (alergická kontaktná dermatitída) je imunologicky sprostredkovaná kožná reakcia na látku. U človeka sú reakcie charakterizované svrbením, sčervenaním pokožky, edémami, bradavicami, vezikulami, bulami alebo ich kombináciou. U iných druhov môžu byť reakcie odlišné a môže sa spozorovať iba sčervenanie kože a edémy.

Indukcia expozície: experimentálna expozícia jedinca testovanou látkou s cieľom vyvolania precitlivého stavu.

Doba indukcie: doba najmenej jeden týždeň nasledujúca po indukci expozície, počas ktorej sa vyvinul precitlivý stav.

Opakované vyvolanie reakcie expozíciou: experimentálna expozícia jedinca testovanou látkou nasledujúca po dobe indukcie. Zisťuje sa ňou, či jedinec reaguje hypersenzitívne.

1.3. ODPORÚČANÉ LÁTKY

Citlivosť a spoľahlivosť použitej experimentálnej metódy sa stanovuje každých šesť mesiacov použitím látok, u ktorých sú známe mierne účinky na precitlivosť pokožky.

V správne riadených testoch sa očakáva u látok s miernymi účinkami na precitlivosť pokožky prinajmenšom 30 % odozva v adjuvansovom teste a 15 % v neadjuvansovom teste.

Uprednostňujú sa nasledujúce látky:

CAS číslo	EINECS číslo	EINECS názov	Bežný názov
101-86-0	202-983-3	aldehyd kys. α -hexyl škoricovej	aldehyd kys. α -hexyl škoricovej
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (merkaptoben-zotiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokaín	nordkaín

Pri splnení horeuvedených kritérií sa za určitých okolností môžu použiť s primeraným zdôvodnením aj iné kontrolné látky.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Na začiatku sú testované zvieratá vystavené účinku testovanej látky intradermálnym vstrekaním a/alebo epidermálnou aplikáciou (indukcia expozície). Nasleduje vyčkávacie obdobie perióda 10 až 14 dní (indukcia expozície), počas ktorej sa vyvíja imunitná odozva, a potom sa zvieratá vystavia účinku opakovanej dávky. U testovaných zvierat sa rozsah a stupeň reakcie pokožky pri opakovanej expozícii porovná s kontrolnými zvieratami, ktoré boli podrobené simulovanej aplikácii počas indukcie a bola na nich použitá opakovaná expozícia.

1.5. OPIS TESTOVACÍCH METÓD

Ak sa považuje za nevyhnutné odstrániť testovanú látku, uskutočňuje sa to vodou alebo vhodným rozpúšťadlom bez toho, aby sa tým zmenila už existujúca odozva, alebo aby bola porušená celistvosť pokožky.

1.5.1. *Maximalizovaný test morčiat (GPMT)*1.5.1.1. *Príprava*

Mladé zdravé dospelé morčatá (albíny) sa aklimatizujú na laboratórne podmienky prinajmenšom počas 5-tich dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne pridelené do testovaných skupín. Srst sa im v závislosti od použitej metódy ostrihá, oholí alebo chemicky depiluje. Je nutné chrániť pokožku pred obrúsením. Pred začatím testu a pri jeho ukončení sa zvieratá zväžia.

1.5.1.2. *Podmienky testovania*1.5.1.2.1. *Testované zvieratá*

Bežne sa používajú laboratórne kmene albínov morčiat.

1.5.1.2.2. *Počet a pohlavie*

Používajú sa samce a/alebo samice. Ak sa používajú samice musia to byť jedinci, ktoré zatiaľ nerodili, a nie sú tehotné.

V testovanej skupine sa používa minimálne 10 zvierat a v kontrolnej skupine 5 zvierat. Ak sa použije menej ako 20 testovaných a 10 kontrolných morčiat a nie je možné dôjsť k záveru, že testovaná látka je senzibilizátor, testuje sa s dodatočnými zvieratami, pričom sa výrazne doporučuje pracovať s minimálne 20 zvieratami v testovanej skupine a 10 zvieratami v kontrolnej skupine.

1.5.1.2.3. Hladiny dávok

Koncentrácia testovanej látky pri každej indukcii expozície musí byť systematicky tolerovaná a musí byť použitá najvyššia z dávok spôsobujúcich mierne podráždenie pokožky. Pri opakovanej expozícii sa používa najvyššia dávka nespôsobujúca podráždenie. Ak je to nevyhnutné, vhodné koncentrácie sa určujú pri pilotnej štúdii používajúcej dve alebo tri zvieratá. Pri aplikácii sa používa kompletný Freundsov Adjuvans (FCA).

1.5.1.3. Postup

1.5.1.3.1. Indukcia

Deň 0 – testovaná skupina

Na oblasť pleca zbaveného srsti sa použijú tri páry intradermálneho vstreknutia objemu 0,1 ml.

Vstrekovanie 1: zmes 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok

Vstrekovanie 2: vybraná koncentrácia testovanej látky vo vhodnom nosiči

Vstrekovanie 3: vybraná koncentrácia testovanej látky zmiešaná so zmesou 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok.

Pri 3. vstrekaní sú rozpustné látky rozpustené vo vodnej fáze ešte pred zmiešaním s FCA. Lipofilné alebo nerozpustné látky sa suspendujú v FCA ešte pred spojením s vodnou fázou. Výsledná koncentrácia musí byť totožná s koncentráciou použitou pri 2. vstrekaní.

Vstrekovania 1 a 2 sú prevedené blízko seba, a to čo najbližšie k hlave, zatiaľ čo vstrekovanie 3 sa prevedie kaudálnym smerom na testovanom povrchu.

Deň 0 – kontrolná skupina

Na to isté miesto ako u testovanej skupiny sa použijú tri páry intradermálneho vstreknutia objemu 0,1 ml.

Vstrekovanie 1: zmes 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok

Vstrekovanie 2: neriedený nosič

Vstrekovanie 3: zmes 50 % v/v nosiča v zmesi 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok.

Deň 5 – 7 – testovaná a kontrolná skupina.

V prípade látky, ktorá nedráždi pokožku, sa približne dvadsať štyri hodín pred uskutočnením indukcie pri lokálnom nanášaní testovaný povrch po ostrihaní a/alebo oholení ošetrí 0,5 ml 10 % sodnej soli sulfátu kyseliny laurovej vo vazeline, čím sa lokálne podráždenie vyvolá.

Deň 6 – 8 – testovaná skupina

Na testovanej ploche sa opäť odstráni srst. Filtračný papier (2 × 4 cm) zmáčaný testovanou látkou vo vhodnom nosiči sa priloží na testovaný povrch a počas 48 hodín sa udržiava s ním v kontakte pomocou nepriepustného obväzu alebo nepriepustného obalu.

Deň 6 – 8 – kontrolná skupina

Na testovanej ploche sa opäť odstráni sršť. Podobným spôsobom sa vhodný nosič priloží na testovaný povrch a počas 48 hodín sa udržiava v kontakte s ním pomocou nepriepustného obväzu alebo nepriepustného obalu.

1.5.1.3.2. Opakovaná aplikácia

Deň 20 – 22 – testovaná a kontrolná skupina

Z bokov testovaných a kontrolných zvierat sa odstráni sršť. Náplasť zmáčaná testovanou látkou sa použije na jeden bok zvierat, a ak je to potrebné, na druhý bok sa použije náplasť zmáčaná samotným nosičom. Náplasti sa počas 24 hodín udržiavajú v kontakte s testovaným povrchom pomocou nepriepustného obväzu alebo obalu.

1.5.1.3.3. Pozorovania a odstupňovanie odozvy: testovaná a kontrolná skupina

- približne 21 hodín po odstránení náplasti je testovaný povrch vyčistený, ostrihaný a/alebo vyholený a depilovaný, ak je to nevyhnutné,
- približne o 3 hodiny neskôr (približne 48 hodín po začatí opakovanej aplikácie) sa sleduje kožná reakcia a pozorovanie sa zaznamená podľa stupňov uvedených v dodatku,
- približne 24 hodín po tomto a druhom (72 hodín) pozorovaní sa pozorovanie uskutoční opäť a zaznamená sa.

Odporúča sa uskutočnenie slepého pokusu testovaných aj kontrolných zvierat.

Ak je potrebné potvrdiť výsledky získané opakovanou aplikáciou, uskutoční sa opätovná opakovaná aplikácia s použitím novej kontrolnej skupiny. Táto aplikácia sa prevádza približne jeden týždeň po prvej. Opätovná opakovaná aplikácia sa tiež prevádza s pôvodnou kontrolnou skupinou.

Všetky kožné reakcie a nezvyčajné nálezy, vrátane systémových reakcií, zistené pri metóde indukčnej aj opakovanej aplikácie je nutné zaznamenať podľa klasifikačnej škály Magnusson/Kligman (pozri dodatok). Pri objasňovaní nejednoznačných reakcií sa uskutočňujú ďalšie postupy, napríklad histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky zriadenia pokožky.

1.5.2. *Buehlerov test*

1.5.2.1. Príprava

Mladé zdravé dospelé morčatá (albíny) sa aklimatizujú na laboratórne podmienky prinajmenšom počas 5-tich dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne pridelené do testovaných skupín. Sršť sa im v závislosti od použitej metódy ostrihá, oholí alebo chemicky depiluje. Je nutné chrániť pokožku pred obrúsením. Pred začatím testu a pri jeho ukončení sa zvieratá zväžia.

1.5.2.2. Podmienky testovania

1.5.2.2.1. Testované zvieratá

Bežne sa používajú laboratórne kmene albínov morčiat.

1.5.2.2.2. Počet a pohlavie

Používajú sa samce a/alebo samice. Ak sa používajú samice, musia to byť jedince, ktoré zatiaľ nerodili a nie sú tehotné.

V testovanej skupine sa používa minimálne 20 zvierat a v kontrolnej skupine 10 zvierat.

1.5.2.2.3. Hladiny dávok

Pri každej indukcii expozície sa používa koncentrácia testovanej látky zodpovedajúca najvyššej dávke spôsobujúcej mierne, ale nie nadmerné podráždenie pokožky. Pri opakovanej expozícii sa používa najvyššia

dávka nespôsobilajúca podráždenie. Ak je to nevyhnutné, vhodné koncentrácie sa určujú pri pilotnej štúdii, ktorá používa dve alebo tri zvieratá.

Pre testované látky rozpustné vo vode je vhodné použiť vodu alebo zriedený roztok zmáčadla ako nosiča. U iných testovaných materiálov sa uprednostňuje pri indukčnej aplikácii 80 % etanol/voda a pri opakovanej aplikácii acetón.

1.5.2.3. Postup

1.5.2.3.1. Indukcia

Deň 0 – testovaná skupina

Jeden bok je vyčistený od srsti (krátkym ostrihaním). Náplasti musia byť zmáčané testovanou látkou vo vhodnom nosiči (výber nosiča musí byť oprávnený; ak je to výhodné, môžu byť kvapalné testované látky použité neriedené).

Náplasť sa použije na testovaný povrch a počas 6 hodín sa udržiava s ním v kontakte pomocou vhodného obväzu alebo obalu.

Náplasti musia byť nepriepustné. Vhodné sú bavlnené vankúšiky buď kruhového, alebo štvorcového tvaru veľkosti približne 4 – 6 cm². Uprednostňuje sa zabezpečenie pohltienia použitím vhodných ochranných materiálov. Pri použití obväzovania je možné, že sa bude musieť použiť doplnujúca expozícia.

Deň 0 – kontrolná skupina

Jeden bok je vyčistený od srsti (krátkym ostrihaním). Použije sa iba nosič, a to obdobne ako pri kontrolnej skupine. Náplasť sa počas 6 hodín udržiava v kontakte s pokožkou pomocou nepriepustného obväzu alebo obalu. Ak je dokázané, že nie je nevyhnutné použiť simulovanú kontrolnú skupinu, používa sa obyčajná kontrolná skupina.

Deň 6 – 8 a 13 – 15 – testovaná a kontrolná skupina

Na tej istej testovanej ploche (ak je to potrebné, vyčistenej) toho istého boku sa používa tá istá aplikácia ako v 0. dni aj v 6. – 8. dni a aj v 13. – 15. dni.

1.5.2.3.2. Opakovaná aplikácia

Deň 27 – 29 – testovaná a kontrolná skupina

Netestovaný bok testovaných a kontrolných zvierat sa vyčistí od srsti (krátkym ostrihaním). Vhodné množstvo testovanej látky na nepriepustnom obväze alebo v obale sa použije na zadnú časť netestovaného boku testovaných a kontrolných zvierat. Používa sa maximálna koncentrácia, pri ktorej nedochádza k podráždeniu.

Ak je to vhodné, na predtým netestovanú časť boku testovaných aj kontrolných zvierat sa použije nepriepustná náplasť alebo obal s nosičom. Nepriepustná náplasť alebo obal prichytený vhodným obväzom sa udržiava v kontakte s pokožkou počas 6 hodín.

1.5.2.3.3. Pozorovania a odstupňovanie odozvy: testovaná a kontrolná skupina

- približne 21 hodín po odstránení náplasti je testovaný povrch opäť vyčistený od srsti,
- približne o 3 hodiny neskôr (asi 30 hodín po začatí opakovanej aplikácie) sa sleduje kožná reakcia a pozorovanie sa zaznamená podľa stupňov uvedených v dodatku,
- približne 24 hodín po predchádzajúcom pozorovaní (asi 54 hodín po opakovanej aplikácii) sa uskutoční ďalšie pozorovanie a opäť sa zaznamená.

Odporúča sa uskutočnenie slepého pokusu testovaných aj kontrolných zvierat.

Ak je potrebné potvrdiť výsledky získané prvou opakovanou aplikáciou, uskutoční sa druhá opakovaná aplikácia s použitím novej kontrolnej skupiny. Táto aplikácia sa prevádza približne jeden týždeň po prvej. Opätovná opakovaná aplikácia sa uskutočňuje tiež s pôvodnou kontrolnou skupinou.

Všetky kožné reakcie a nezvyčajné nálezy, vrátane systémových reakcií, zistené pri metóde indukčnej aj opakovanej aplikácii je nutné sledovať a zaznamenať podľa klasifikačnej škály Magnusson/Kligman (pozri prílohu). Pri objasňovaní nejednoznačných reakcií sa uskutočňujú ďalšie postupy, napríklad histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky zriadenia pokožky.

2. ÚDAJE (GPMT A BUEHLER)

Všetky údaje musia byť zhrnuté v tabuľkovej forme s každou pozorovanou reakciou podráždenia pokožky zvieratá.

3. SPRÁVA (GPMT A BUEHLER)

Ak sa pred testom morčiat uskutoční screeningová skúška, je potrebné uviesť spolu s výsledkami uskutočneného testu a odporúčanými testovacími látkami aj opis alebo odkaz na screeningovú skúšku (napríklad skúška lokálnych lymfatických uzlín (LLNA), test opuchnutia ucha u myší (MEST)), vrátane podrobností o postupoch.

Správa o teste (GPMT a Buehler)

Správa o teste má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

Testované zvieratá:

- kmeň použitých morčiat,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky bývania, strava atď.,
- individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

- metódu prípravy náplastí,
- podrobnosti o materiáli náplastí a technike ich použitia pri testovaní,
- výsledky pilotnej štúdie s vyhodnotením koncentrácií použitých pri indukčnej a opakovanej aplikácii,
- podrobnosti o príprave použitej látky, o jej aplikácii a odstránení,
- zdôvodnenie výberu nosiča,
- koncentrácie nosiča a testovanej látky použité pri indukčnej a opakovanej expozícii a celkové množstvo aplikovanej látky použitej pri indukčnej aj opakovanej expozícii.

Výsledky:

- zostavenie tabuliek posledných výsledkov precitlivenosti a kontrole spoľahlivosti (pozri 1.3) vrátane informácií o testovanej látke, jej koncentrácii a nosiči,
- o každom zvierati vrátane systému stupňovania dávok,

- podrobný opis povahy a stupňa pozorovaných účinkov,
- histopatologické nálezy.

Diskusia

Záver

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 406.

Dodatok

TABULKA

Klasifikačná škála pre vyhodnotenie škodlivých účinkov vyvolaných škvrn podľa Magnusson/Kligmana

0 = žiadne viditeľné zmeny

1 = nespojitý alebo škvrnitý erytém (sčervenanie kože)

2 = stredne silný a zlievajúci sa erytém

3 = intenzívny erytém a edém

B.7. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE PO ORÁLNEJ APLIKÁCII**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Niekoľkým skupinám experimentálnych zvierat sa denne orálne podáva testovaná látka v odstupňovaných dávkach spôsobom, pri ktorom sa každej skupine podáva jedna dávka počas 28-dňovej periódy. Počas periódy podávania sa zvieratá často pozorujú, pričom sa denne kontroluje prítomnosť znakov toxického účinku. Pitva sa uskutoční aj na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, tak aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

Pri tejto metóde sa kladie väčší dôraz na neurologické účinky ako osobitný parameter a zvláštnu pozornosť je potrebné venovať klinickým pozorovaniam zvierat tak, aby sa získalo čo najviac informácií. Pri tejto metóde je potrebné určiť neurotoxický potenciál látok a získať tak oprávnenie pre podrobné preskúmanie tohto aspektu. Navyše môže táto metóda poskytnúť indikácie o imunologických účinkoch a o toxicite na reprodukčné orgány.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.4.1. Príprava**

Náhodne sa do kontrolných a testovaných skupín vyberú mladé zdravé dospelé zvieratá. Kletky sa musia umiestniť tak, že bude minimalizovaný vplyv umiestnenia na účinky. Zvieratá musia byť jednoznačne rozpoznateľné a najmenej 5 dní pred začiatkom testovania sú držané v kletkách, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky.

Testovaná látka sa podáva žalúdočnou sondou alebo prostredníctvom stravy alebo pitnej vody. Metóda orálnej aplikácie závisí od účelov testovania a od fyzikálno-chemických vlastností látok.

Ak je potrebné, testovaná látka sa rozpustí alebo je suspendovaná vo vhodnom nosiči. Ako prvé sa, pokiaľ je to možné, odporúča použitie vodných roztokov alebo suspenzií, ako druhé použitie (kukurličných) olejových roztokov alebo suspenzií a potom iných roztokov v iných nosičoch. Toxické vlastnosti nevodných nosičov by mali byť známe. Stabilita testovanej látky v nosiči sa musí stanoviť.

1.4.2. Podmienky testovania**1.4.2.1. Testované zvieratá**

Uprednostňovaným druhom zvierat sú potkany, aj keď sa môžu použiť aj iné hlodavce. Používajú sa bežné laboratórne kmene mladých zdravých a dospelých jedincov. Musia sa vybrať samice, ktoré zatiaľ nerodili, a nie sú tehotné. Testovanie je nutné začať čo najskôr po odstavení dojčiat a v niektorých prípadoch pred dosiahnutím veku deväť týždňov.

Na začiatku štúdie musia byť rozdiely hmotností zvierat minimálne a nesmú presahovať 20 % priemernej hmotnosti u každého pohlavia.

Ak je štúdia opakovanej orálnej dávky predbežnou štúdiou dlhodobej štúdie, pokiaľ je to možné, používajú sa v oboch štúdiách zvieratá toho istého kmeňa a z toho istého zdroja.

1.4.2.2. Počet a pohlavie

Na každej hladine dávkovania sa použije prinajmenšom 10 zvierat (päť samíc a päť samcov). Ak sa medzitým plánuje usmrcovanie zvierat, ich množstvo sa zvyšuje o plánovaný počet zvierat, ktoré sa usmrtnia pred ukončením štúdie.

Môže sa naviac použiť sprievodná skupina 10 zvierat (5 z každého pohlavia), ktorej sa podáva vyššia dávka počas 28 dní a sleduje sa reverzibilita, perzistencia, alebo oneskorenie toxických účinkov počas 14 dní po ukončení aplikácie. Tak isto sa používa sprievodná skupina 10 kontrolných zvierat (5 z každého pohlavia).

1.4.2.3. Hladiny dávok

Bežne sa používajú tri testované a jedna kontrolná skupina. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať tak isto ako so zvieratami v testovaných skupinách s výnimkou podania testovanej látky. Ak sa pri podávaní testovanej látky používa nosič, kontrolná skupina ho musí dostať v najvyššom objeme, v akom je použitý v testovaných skupinách.

Ak sa zo zhodnotenia iných údajov neočakávajú žiadne účinky pri dávke 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň, uskutočňuje sa limitný test. Ak nie sú k dispozícii žiadne vhodné údaje, uskutočňuje sa vyhľadávací test s cieľom stanoviť dávky, ktoré sa používajú.

Pri výbere hladín dávok sa berú do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-) kinetike testovanej látky a príbuzných látok. Najvyššia dávka sa vyberá tak, aby indukovala toxické účinky, ale nespôsobovala uhynutie zvierat alebo vážne utrpenie. Podľa toho sa vyberá aj znižujúca sa postupnosť hladín dávok s cieľom určenia závislosti odozvy od dávky a stanovenia hodnoty NOAEL pri najnižšej hladine. Pri nastavovaní klesania úrovní sú často najvhodnejšie dvoj- až štvorúrovňové intervaly a pridanie štvrtej testovacej skupiny sa považuje za výhodnejšie z dôvodu zvýšenia veľkosti intervalov (napríklad viac ako o faktor 10) medzi hladinami dávok.

Pri látkach podávaných prostredníctvom stravy alebo pitnej vody je dôležité sa uistiť, že používané množstvá testovanej látky neinterferujú s obvyklou výživovou hodnotou stravy alebo s vodnou rovnováhou. Testovaná látka sa v strave podáva buď pri konštantnej koncentrácii v strave (ppm), alebo pri konštantnej hladine vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat; použitá alternatíva musí byť určená. Pri podávaní žalúdočnou sondou sa dávka používa v rovnakom čase každý deň a prispôbuje sa telesnej hmotnosti zvierat, čím sa zachová konštantnosť dávky.

Ak je štúdia opakovanej orálnej dávky predbežnou štúdiou dlhodobej štúdie, v oboch štúdiách sa používa rovnaká strava.

1.4.2.4. Limitný test

Ak sa zistí, že test pri jednej hladine najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň, alebo rovnocenné množstvo v percentách v strave alebo v pitnej vode (založené na určení telesnej hmotnosti) nespôsobil u testovaných zvierat žiadne toxické príznaky, a ak sa toxické účinky neočakávajú ani na základe údajov štruktúrne príbuzných zlúčenín, potom sa nepovažuje za nevyhnutné uskutočniť celú štúdiu s použitím troch hladín. Výnimkou je prípad, keď expozícia človeka indikuje potrebnosť skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

1.4.2.5. Doba pozorovania

Doba pozorovania trvá 28 dní. Zvieratá v sprievodnej skupine, ktoré sa plánujú použiť pri ďalšom sledovaní, sa držia najmenej ďalších 14 dní bez akéhokoľvek podávania, aby bolo možné zistiť oneskorené účinky alebo ich perzistenciu, alebo zotavenie sa po nich.

1.4.3. Postup

Dávky sú zvieratám podávané denne sedem dní v týždni počas obdobia 28 dní, použitie 5-dňového režimu dávkovania je nutné zdôvodniť. Ak sa testovaná látka podáva žalúdočnou sondou, uskutočňuje sa to v jednej dávke a to buď žalúdočnou sondou, alebo vhodnou intubačnou kanylou. Maximálny objem kvapaliny, ktorý môže byť použitý naraz závisí od veľkosti testovaných zvierat. Objem nesmie presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti s výnimkou vodných roztokov, pri ktorých sa používa objem 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Kolísanie objemu sa minimalizuje nastavením koncentrácie, aby sa zabezpečil konštantný objem pri všetkých dávkovaných úrovniach, s výnimkou dráždiacich alebo žieravých látok, ktoré bežne so zvyšujúcou sa koncentráciou zhoršujú účinky.

1.4.3.1. Všeobecné pozorovania

Najmenej raz denne je nutné uskutočniť všeobecné klinické pozorovania, najlepšie vždy v tom istom čase s ohľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po podaní. Zaznamenáva sa zdravotný stav zvierat. Najmenej dvakrát denne si treba všimáť chorobnosť a úmrtnosť zvierat. Pri zaznamenaní umierajúcich zvierat a zvierat viditeľne trpiacich alebo viditeľne pociťujúcich bolesť sa tieto odstrániť, humanne usmrtiť a preveď sa ich pitva.

Raz pred prvou aplikáciou (je dovoľené porovnanie jednotlivých zvierat medzi sebou) a potom najmenej raz týždenne sa uskutočňujú u všetkých zvierat podrobné klinické skúmania. Uskutočňujú sa mimo domovských kliebok, pokiaľ možno, vždy v tom istom čase. Pozorovania sa starostlivo zaznamenávajú najlepšie systémom čiarok v políčkach podrobne formulovanými testujúcim laboratóriom. Je potrebné zaistiť čo najmenšie zmeny testovacích podmienok a výhodné je, ak pozorovania vedie pozorovateľ nepoznajúci postup testovania. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všimáť, patria zmeny na koži, kožušine, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (slzenie, piloerкция, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), ale uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny chôdze, postoj a reakcia na manipuláciu, ako aj prítomnosť škľabavých pohybov alebo svalové napätie, stereotypné (napríklad nadmerné očisťovanie tela, opakované krúženie) alebo výstredné správanie (napríklad samozmrzačovanie, cúvanie) je nutné tiež zaznamenať.

Vo štvrtom týždni expozície sa uskutočňuje určenie zmyslovej reaktivity podnecovanej odlišnými spôsobmi (napríklad zvukovými, zrakovými a proprioceptívnymi podnetmi), určenie sily zovretia a určenie motorickej aktivity. Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré sa majú uskutočniť, sú uvedené v literatúre (pozri všeobecný úvod časť B).

Funkčné pozorovania vo štvrtom týždni expozície sa nemusia uskutočniť, ak je štúdia uskutočňovaná ako predbežná štúdia subchronickej štúdie (90 dní). V tomto prípade sa funkčné pozorovania uskutočnia v nasledujúcej štúdii. Na druhej strane, dostupnosť údajov o funkčných pozorovaniach zo štúdie opakovanej dávky zvyšujú možnosť výberu úrovni dávkovaných v nasledujúcej subchronickej štúdii.

Výnimočne sa nemusia uskutočniť funkčné pozorovania u skupiny, v ktorej sa inak preukáže toxické príznaky v takom rozsahu, že by mohli významne interferovať s uskutočnením funkčných testov.

1.4.3.2. Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

Všetky zvieratá sa vážia najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy a vody sa uskutočňuje najmenej raz za týždeň. Pokiaľ je testovaná látka podávaná v pitnej vode, meria sa aj spotreba vody najmenej raz za týždeň.

1.4.3.3. Hematológia

Na konci testovacieho obdobia sa uskutočňujú nasledujúce hematologické testy: hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenčný počet leukocytov, počet krvných doštičiek a meranie času/potenciálu zrážanlivosti krvi.

Vzorky krvi sa odoberajú zo stanoveného miesta tesne pred alebo počas postupu usmrtenia zvierat a uchováajú sa za vhodných podmienok.

1.4.3.4. Klinická biochémia

Klinická biochémia skúma hlavné toxické účinky v tkanivách a najmä účinky na obličky a pečeň. Vyšetrenie sa uskutočňuje zo vzoriek krvi, ktoré sa odoberajú všetkým zvieratám tesne pred alebo počas postupu usmrtenia zvierat a uchováajú sa za vhodných podmienok (okrem uhynutých a/alebo práve usmrtených zvierat). Noc pred odberom vzoriek krvi sa odporúča zvieratám potravu nepodávať ⁽¹⁾. Vyšetrenie plazmy alebo séra zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinín, celkové proteíny a albumín, najmenej dva enzýmy indukujúce hepatocelulárne účinky (ako alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, alkalická fosfatáza, gama-glutamyl transpeptidáza a sorbitol-dehydrogenáza). Meranie ďalších enzýmov (hepatálneho alebo iného pôvodu) a žlčových kyselín môže za určitých okolností poskytnúť užitočné informácie.

⁽¹⁾ Pri mnohých meraniach v sére a plazme, najmä glukózy, sa uprednostňuje nepodávanie potravy cez noc pred odberom. Hlavným dôvodom je zvýšenie pravdepodobnosti kolísania hodnôt ako nevyhnutný dôsledok prijímania potravy. Môže to viesť k zakrytiu jemnejších účinkov a sťažovať interpretáciu. Na druhej strane nočné postenie môže rušivo vplyvať na celkový metabolizmus zvierat a čiastočne aj na štúdie výživy, a môže to rušiť aj dennú expozíciu testovanou látkou. Ak sa použije nočné postenie, klinickobiochemické vyšetrenie sa uskutočňuje po funkčných pozorovaniach vo štvrtom týždni štúdie.

Nepovinne sa uskutočňujú počas posledného týždňa štúdie nasledujúce analýzy moču, ktorý sa zhromažďuje v závislosti od času: vzhľad, objem, osmolalita alebo určitá hmotnosť, pH, proteíny, glukóza a krv/krvinky.

Navyše sa berú do úvahy aj štúdie na vyšetrenie sérových markerov poškodenia hlavných tkanív. Ďalšie stanovenia sa uskutočňujú, ak známe vlastnosti testovanej látky môžu ovplyvňovať alebo sú podozrievané z toho, že ovplyvňujú príbuzné metabolické profily vrátane vápnika, fosfátov, stálych triglyceridov, určitých hormónov, methemoglobínu a cholinesterázy. Tieto parametre je potrebné určiť pri látkach určitých tried alebo od jedného prípadu k druhému.

Celkovo je potrebný pružný prístup, ktorý závisí od druhu zvierat a od pozorovaných a/alebo očakávaných účinkov s danou látkou.

Ak je historická databáza údajov nedostatočná, musí sa pred začatím podávania odôvodniť uskutočnenie stanovenia hematologických a klinickobiochemických premenných.

1.4.3.5. *Makroskopická pitva*

Všetky zvieratá v štúdiu sa podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa starostlivé skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetky otvory a lebečnú, hrudnú a brušnú dutinu a ich obsah. Pečeň, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, týmus, slezina, mozog a srdce všetkých zvierat sa v prípade potreby orežú od prirastených tkanív a odvážia sa za mokra čo najskôr po pitve, aby sa zabránilo ich vysušeniu.

V čo najvhodnejších stabilizačných médiách sa uchovávajú obidva druhy tkanív a kvôli budúcemu histopatologickému skúmaniu sa uchovávajú nasledujúce tkanivá: všetky makroskopické poškodenia tkaniva, mozog (reprezentatívne časti vrátane mozgu, mozočka a mosta), miecha, žalúdok, tenké a hrubé črevo (vrátane Peyerových škvŕn), pečeň, obličky, nadoblička, slezina, srdce, týmus, štítna žľaza, priedušnica a pľúca (konzervované nafúknutím fixačným prostriedkom a potom ponorením doň), pohlavné žľazy, vedľajšie pohlavné orgány (napríklad maternica, prostata), močový mechúr, lymfatické uzliny (pokiaľ možno jednu lymfatickú uzlinu na skúmanie trasy podávanej látky a jednu vzdialenejšiu od miesta podania na skúmanie systémových účinkov), periférne nervy (ischiatické alebo holenné) prednostne blízko roximálneho svalu a časť kostnej drene (alebo ako náhrada mikroskopicky odsatá čerstvá kostná dreň). Klinické a ďalšie nálezy naznačujú potrebu skúmania ďalších tkanív. Podobne sa uchovávajú aj orgány považované za cieľové orgány na základe známych vlastností testovanej látky.

1.4.3.6. *Histopatologické vyšetrenie*

Úplná histopatológia sa uskutočňuje na uchovaných orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine aj v skupinách testovaných vysokými dávkami. Histopatologické vyšetrenie sa môže rozšíriť aj na zvieratá v skupinách s iným dávkovaním, ak sa pozorovali od dávky závislé zmeny v skupine s vysokou dávkou.

Skúmajú sa všetky makroskopické poškodenia.

Pri použití sprievodnej skupiny zvierat sa histopatológia uskutoční na tkanivách a orgánoch, pri ktorých v testovaných skupinách boli zistené nejaké účinky.

2. ÚDAJE

Pre každé zviera sa musia zabezpečiť osobitné údaje. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo usmrtených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo humánneho usmrtenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, u ktorých sa prejavili známky toxicity, opis pozorovaných známkov toxicity vrátane nábehu, času a prudkosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení a percentuálne množstvo zvierat, u ktorých sa prejavil daný typ poškodenia.

Ak je to možné, numerické výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistická metóda sa vyberá počas plánovania štúdie.

3. SPRÁVA**SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

Testované zvieratá:

- druh/použitý kmeň,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky bývania, stravu atď.,
- individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu, v týždenných intervaloch po začiatku a na konci testu.

Podmienky testovania:

- zdôvodnenie iného výberu nosiča ako voda,
- logické zdôvodnenie výberu dávky,
- podrobnosti o príprave testovanej látky/príprave potravy (krmiva), dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,
- podrobnosti o podávaní testovanej látky,
- prepočet z koncentrácie testovanej látky v potrave (krmive)/vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak bolo použité,
- podrobnosti o kvalite potravy (krmiva) a vody.

Výsledky:

- telesná hmotnosť/zmeny telesnej hmotnosti,
- spotreba potravy a spotreba pitnej vody, ak sa použila,
- údaje o toxickej odozve podľa pohlavia a dávky vrátane príznakov toxicity,
- povaha, intenzita a trvanie klinických pozorovaní (či boli reverzibilné, alebo nie),
- senzorická aktivita, sila zovretia a určenie motorickej aktivity,
- hematologické testy s príslušnou základňou hodnôt,
- klinickobiochemické testy s príslušnou základňou hodnôt,
- telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o hmotnosti orgánov,
- pitevné nálezy,
- podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

- údaje o absorpcii, ak sú prístupné,
- štatistické spracovanie výsledkov, ak je vhodné.

Diskusia.

Záver.

4. **ODKAZY**

Táto metóda je podobná OECD TG 407.

B.8. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (INHALAČNÁ)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Je užitočné mať vopred k dispozícii údaje o distribúcii veľkosti častíc, o tlaku pary, teplote topenia, teplote varu, teplote vzplanutia a prípadne o výbušnosti látky.

Pozri aj všeobecný úvod časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Viacere skupiny pokusných zvierat sa denne vystavujú na určitý čas testovanej látke v odstupňovaných koncentráciách na 28 dní, pričom sa použije jedna koncentrácia pre každú skupinu. Ak sa použije pomocná látka, aby sa vytvorila vhodná koncentrácia testovanej látky v atmosfére, musí sa nasadiť kontrolná skupina s pomocnou látkou. Počas trvania testu sa zvieratá denne pozorujú, aby sa zistili symptómy toxických účinkov. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, a zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a krmné podmienky. Pred testom sa mladé zdravé zvieratá randomizujú a priradujú k potrebnému počtu skupín. Ak je to potrebné, môže sa k testovanej látke pridať vhodné vehikulum, aby sa získala želaná koncentrácia testovanej látky vo vzduchu. Ak sa na zjednodušenie podávania použije ehikulum alebo iná prísada, musí byť o nej známe, že nemá toxické účinky. Na tento účel sa môžu prípadne použiť údaje z predošlých testov.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Ak neexistujú mimoriadne dôvody proti, mali by sa vykonávať testy s potkanmi. Používajú sa zdravé mladé zvieratá známych testovaných kmeňov.

Odchýlka telesnej hmotnosti zvierat pre daný test by nemala byť na začiatku testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú veľkosť dávky sa použije najmenej 10 zvierat (päť samičiek a päť samcov). Samičky musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak sa medzitým plánuje usmrcovanie zvierat, ich množstvo sa zvyšuje o plánovaný počet zvierat, ktoré sa usmrtia pred ukončením štúdie. Môže sa použiť sprievodná skupina najviac 10 zvierat (päť z každého pohlavia), ktorej sa aplikuje vyššia dávka počas 28 dní, a sleduje sa reverzibilita, perzistencia alebo oneskorenie toxických účinkov počas 14 dní po ukončení aplikácie. Takisto sa používa sprievodná skupina 10 kontrolných zvierat (päť z každého pohlavia).

1.6.2.3. Expozičná koncentrácia

Musia sa zvoliť minimálne tri koncentrácie, ako aj jedna kontrolná skupina, alebo ak sa použila pomocná látka, jedna kontrolná skupina s pomocnou látkou (podľa koncentrácie pomocnej látky pri najvyššej expozičnej koncentrácii). Odhliadnuc od expozície s testovanou látkou, ošetrujú sa zvieratá kontrolnej skupiny takisto ako pokusné zvieratá. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade vznikli toxické účinky, ale aby zvieratá neuhynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia dávka nesmie vyvolať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o výške expozície u človeka, tak by najnižšia koncentrácia nemala prekročiť túto hodnotu. Podľa možnosti by stredná koncentrácia mala spôsobovať len malé zistiteľné toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, tak by sa mali voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou, ako aj v kontrolných skupinách by mal byť počet prípadov úmrtí nízky, aby sa umožnilo výrazné vyhodnotenie výsledkov.

1.6.2.4. Expozičná doba

Denná expozičná doba by mala byť šesť hodín, na základe špecifických požiadaviek sa môže prípadne ukázať, že sú nutné aj iné časové intervaly.

1.6.2.5. Vybavenie

Pre testy so zvieratami by sa malo používať inhalačné zariadenie, ktoré umožňuje dynamické prúdenie vzduchu s výmenou vzduchu minimálne 12-krát za hodinu, aby sa zabezpečil dekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená expozičná atmosféra. Ak sa používa komora, tak sa zostaví tak, aby pokusné zvieratá boli čo najmenej stlačené a aby sa maximalizovala expozícia testovanej látke inhaláciou. Na zabezpečenie stability atmosféry v inhalačnej komore by nemal celkový „objem“ pokusných zvierat zásadne prekročiť 5 % objemu komory. Používajú sa expozície oronazálnej oblasti, hlavy a celého tela v inhalačných komorách; prvé dva druhy expozície slúžia na obmedzenie príjmu testovanej látky inými cestami.

1.6.2.6. Čas pozorovania

Pri pokusných zvieratách sa počas celého času pozorovania neexponovanej fázy denne sledujú symptómy toxických účinkov. Nástup smrti a čas, keď sa prejavia symptómy a keď zaniknú, sa musia zachytiť.

1.6.3. Postup

Zvieratá sa vystavujú testovanej látke denne 5 až 7 dní za týždeň počas 28 dní. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by mali byť nasledujúcich 14 dní bez expozície, aby sa zistila reverzibilita toxických efektov alebo ich pretrvávanie. Teplota by mala byť počas testu $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ideálna relatívna vlhkosť by mala byť 30 % a 70 % s výnimkou prípadov, keď sa to nedá uskutočniť (napr. testy s určitými aerosólmi). Udržiavanie ľahkého podtlaku v komore ($< 5\text{ mm}$ vodného stĺpca) zabráňuje unikaniu testovanej látky do okolia. Počas expozície sa nepodáva ani krmivo, ani voda.

Mal by sa používať dynamický inhalačný systém s vhodným analytickým postupom na určovanie koncentrácie. Na zachovanie použiteľných expozičných koncentrácií sa odporúča vykonať predbežný test. Prietokové množstvo vzduchu sa nastaví tak, aby boli podmienky skúšania v celej expozičnej komore jednotné. Systém má zabezpečovať čo najrýchlejšie dosiahnutie konštantných expozičných podmienok.

Je potrebné vykonať tieto merania a kontroly:

- a) meranie prietokového množstva vzduchu (priebežne);
- b) skutočná koncentrácia testovanej látky sa meria v dýchacej oblasti. Počas dennej expozičnej doby sa nesmie koncentrácia odchyľovať od priemernej hodnoty o viac ako $\pm 15\%$. V prípade niektorých aerosólov sa však táto testovaná hladina nedá dosiahnuť. V takom prípade sa akceptuje väčší rozsah rozptylu. Počas celého trvania testu sa udržiava konštantná koncentrácia zo dňa na deň. Pre aerosóly sa musí minimálne raz do týždňa vykonať analýza veľkosti častíc pre každú testovanú skupinu;
- c) teplota a vlhkosť vzduchu (priebežne).

Zvieratá sa pozorujú počas expozície a po nej a všetky nálezy u každého zvieratá sa zapisujú. Všetky zvieratá sa musia denne pozorovať, zapisovať príznaky toxických účinkov, v rámci toho aj čas vzniku, ako aj stupeň a trvanie. Pozorovania zvierat by sa mali týkať hlavne zmien na koži, srsti, čiach a slizniciach, dýchaní, krvnom obeh, autonómnom a centrálnom nervovom systéme, ako aj na somatomotorike a na správaní. Príjem potravy a hmotnosť zvierat sa určuje každý týždeň. Pravidelné pozorovanie zvierat je potrebné, aby sa zabezpečilo, že zvieratá sa navzájom neusmrtnia (kanibalizmus), že neuhynú v dôsledku autolýzy tkanív alebo chyby pri premiestňovaní. Po ukončení testu sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou satelitnej skupiny, pitvú. Uhynuté zvieratá, ako aj zvieratá, pri ktorých sa zistili silné príznaky utrpenia a bolesti, sa musia okamžite izolovať a humánne usmrtiť a podrobiť pitve.

Na konci testu sa podrobia všetky zvieratá, vrátane kontrolných, nasledujúcim testom:

- i) hematologickému vyšetreniu, ktoré by malo zahŕňať minimálne určovanie hodnoty hematokrytu a koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov, ako aj hemokoagulačné testy;
- ii) klinickobiochemickej analýze krvi, na posúdenie funkcie pečene a obličiek by sa mal určiť minimálne jeden z týchto parametrov: alanín-amino-transferáza (skôr známa ako sérumpyruvát-transamináza), aspartát-aminotransferáza (skôr známa ako sérumglutamát-oxalacetát-transamináza), močovínový dusík, albumín, celkový bilirubín a celkové bielkoviny v sére.

Ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť prípadne potrebné na adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú: vápnik, fosfor, chlorid, sodík, draslík, glukózu nalačno, lipidy, hormóny, rovnováhu medzi kyselinami a zásadami, methemoglobín, aktivitu cholinesterázy.

Dodatočné klinickobiochemické analýzy môžu byť potrebné na rozšírenie skúmania pozorovaných toxických účinkov.

1.6.3.1. Pitva

Na všetkých zvieratách, ktoré sa zúčastnili na teste, sa vykoná dôkladná pitva. Minimálne pečeň, obličky, nadobličky, pľúca a semenníky sa čo najskôr po sekcii odvážia vo vlhkom stave, aby sa zabránilo ich vysychaniu. Orgány a tkanivá (dýchacie orgány, pečeň, obličky, slezina, semenníky, nadobličky, srdce, ako aj všetky orgány s makroskopickými zmenami alebo zmenami vo veľkosti) sa uchovávajú vo vhodnom médiu s ohľadom na neskoršie histopatologické vyšetrenia. Pľúca sa odstraňujú v intaktnom stave, odvážia sa a ošetrí vhodným fixatívom na zachovanie pľúcnej štruktúry.

1.6.3.2. Histopatologické vyšetrenie

U všetkých zvierat skupiny s najvyššou dávkou, ako aj u zvierat kontrolnej skupiny (kontrolných skupín) sa musí vykonať histologické vyšetrenie konzervovaných orgánov a tkanív. Všetky orgány a tkanivá, ktoré vykázali v skupine s najvyššou dávkou poškodenie podmienené testovanou látkou, sa musia vyšetriť aj vo všetkých ostatných skupinách s nízkou dávkou. U zvierat satelitnej skupiny sa musia s veľkou pozornosťou vyšetriť tie orgány a tkanivá, pri ktorých sa v iných ošetrovaných skupinách prejavili toxické účinky.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky. Z nej musí pre každú dávkovú skupinu a kontrolnú skupinu vyplývať počet zvierat na začiatku testu a počet zvierat s jednotlivými formami poškodenia lézií.

Všetky získané výsledky sa vyhodnocujú vhodnou štatistickou metódou. Môže sa použiť akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, ak je to možné, obsahovať nasledujúce informácie:

— živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,

- podmienky skúšania.

Opis expozičného aparátu vrátane zostavy, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému na výrobu aerosólov, klimatizačného systému, spracovania odpadového vzduchu a prípadne druhu umiestnenia zvierat v skúšobnej komore. Je potrebné opísať prístroje na meranie teploty, vlhkosti vzduchu a prípadne konštanty koncentrácie aerosólov a granulometrického zloženia.

Expozičné údaje

Tieto údaje sa zhrnú do tabuľky a znázornia sa pri uvedení priemerných stredných hodnôt a s ohľadom na odchýlky (napr. smerodajnej odchýlky), a ak je to možné, mali by obsahovať tieto údaje:

- a) prietokové množstvo vzduchu v inhalačnom zariadení;
 - b) teplotu a vlhkosť vzduchu;
 - c) nominálnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky, ktoré sa dalo do inhalačného zariadenia, vydelené objemom vzduchu);
 - d) charakter vehikula, ak sa použilo;
 - e) skutočnú koncentráciu v dýchacej oblasti;
 - f) stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a geometrickú smerodajnú odchýlku (GSD);
- údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a koncentrácie,
 - čas smrti počas testu alebo údaj, či zvieratá prežili test,
 - toxické alebo iné účinky, „no-effect level“,
 - čas pozorovania jednotlivých príznakov toxického účinku a ich ďalší priebeh,
 - údaje o kŕmení a telesnej hmotnosti,
 - použité hematologické testy a ich výsledky,
 - použité klinickobiologické testy a ich výsledky,
 - pitevné nálezy,
 - podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
 - štatistické vyhodnotenie výsledkov tam, kde je to možné,
 - diskusiu o výsledkoch,
 - interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

B.9. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (DERMÁLNA)**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu denne v odstupňovaných dávkach viacerým skupinám pokusných zvierat, a to jedna dávka na jednu skupinu počas 28 dní. Počas trvania testu sa zvieratá denne pozorujú, aby sa zistili symptómy toxických účinkov. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradujú k jednotlivým exponovaným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa strihá srst' na chrbte pokusných zvierat. Oholenie srsti je tiež možné, ale dalo by sa vykonať 24 hodín pred začatím testu. Opakované strihanie a holenie je zvyčajne potrebné približne v týždňových intervaloch. Je potrebné dbať na to, aby sa nepoškodila koža. Na aplikáciu sa musí pripraviť minimálne 10 % povrchu kože. Pri určovaní oblasti určenej na ostrihanie aplikačnej plochy sa zohľadňuje hmotnosť zvierat. Ak sa používajú tuhé látky, ktoré sa môžu jemne rozomlieť na prášok, mala by byť testovaná látka dostatočne navlhčená vodou alebo tam, kde je to potrebné, vhodným vehikulom, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené. Aplikácia sa vykonáva denne 5 až 7 dní za týždeň.

1.6.2. Podmienky skúšania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Môže sa použiť dospelý potkan, králik alebo morča. Môžu sa použiť aj iné druhy, ich použitie sa však musí zdôvodniť.

Odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu by nemala byť na začiatku testu viac ako $\pm 20\%$ od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú veľkosť dávky sa používa minimálne 10 zvierat (5 samčiek a 5 samiciek) so zdravou, nepoškodenou kožou. Samičky musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak sa majú počas testu humánne usmrtiť zvieratá, tak sa musí celkový počet zvierat zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť humánne usmrtené, ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže exponovať satelitná skupina s 10 zvieratami (5 zvierat na pohlavie) počas 28 dní s najvyššou dávkou a počas nasledujúcich 14 dní bez ošetrovania sa dbá na reverzibilitu, pretrvávajúce alebo oneskorený prejav toxických účinkov. Používa sa tiež satelitná skupina s 10 kontrolnými zvieratami (5 zvierat na pohlavie).

1.6.2.3. Veľkosti dávok

Musia sa zvoliť minimálne tri dávky, ako aj jedna kontrolná skupina, alebo ak sa použije pomocná látka, kontrolná skupina s pomocnou látkou. Čas pôsobenia by mal trvať minimálne 6 hodín denne. Aplikácia testovanej látky by sa mala vykonávať v ten istý čas každý deň a prispôbenie dávky telesnej hmotnosti sa vykonáva v stanovených intervaloch (raz týždenne alebo dvakrát týždenne), aby sa zachovala konštantná hladina dávky v relácii k telesnej hmotnosti. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky, zvieratá kontrolnej skupiny sa ošetrujú rovnakým spôsobom ako pokusné zvieratá. Ak sa na uľahčenie aplikácie použije vehikulum, tak sa kontrolnej skupine podáva vehikulum rovnakým spôsobom ako exponovaným zvieratám, a to v množstve, aké dostane skupina s najvyššou dávkou. Najvyššia dávka sa volí tak, aby sa v každom prípade prejavili toxické efekty, ale aby zvieratá neuhynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia dávka by nemala vyvolávať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o výške expozície u človeka, tak by mala najnižšia dávka túto hodnotu prekračovať. Podľa možnosti by mala stredná dávka spôsobovať len malé toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzidávky, tak sa majú voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou alebo strednou dávkou, ako aj v kontrolných skupinách by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa zabezpečilo kvalitné vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky vedie k silným podráždeniam kože, mala by sa koncentrácia znížiť, čo môže pri vysokej dávke viesť k zníženiu alebo vynechaniu ostatných toxických účinkov. Ak sa okrem toho koža veľmi poškodila, je za určitých okolností potrebné prerušiť test a nanovo ho realizovať s nižšími koncentraciami.

1.6.2.4. Limitný test

Ak pri realizácii predčasnej štúdie podanie dávky 1 000 mg/kg alebo vyššej dávky, ktorá zodpovedá možnej expozícii u človeka, nespôsobí žiadne toxické účinky, nie je potrebný ďalší test.

1.6.2.5. Čas pozorovania

Pri všetkých zvieratách sa denne pozorujú symptómy toxických účinkov. Smrť a čas vzniku a zániku symptómov sa musia zaznamenať.

1.6.3. Postup

Zvieratá sa musia udržiavať jednotlivito v kliečkach. Testovanú látku dostávajú sedem dní do týždňa počas 28 dní. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by mali byť ďalších 14 dní bez ošetrovania, aby sa pozorovala reverzibilita alebo pretrvávanie toxických účinkov. Expozičná doba je minimálne šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % povrchu tela. Pri veľmi toxických látkach sa môže ošetrovať plocha menšia, ale väčšia plocha by mala byť exponovaná čo možno s najtenšou a najrovnornejšou vrstvou.

Testovaná látka sa počas expozičnej doby udržiava v kontakte s kožou pomocou gázového obväzu a jednej náplasti. Pokusná plocha sa musí okrem toho zakryť vhodným spôsobom, aby sa gázový obväz a testovaná látka prichytili a zaistili a aby zvieratá nemohli orálne prijať testovanú látku. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, avšak úplná imobilizácia sa neodporúča. Ako alternatíva sa môže použiť „manžeta na krk“.

Po uplynutí expozičnej doby sa odstráni, pokiaľ je to možné, zvyšok testovanej látky, a to použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Všetky zvieratá sa musia denne sledovať a zapisovať príznaky toxických účinkov vrátane času vzniku, ako aj stupňa a trvania. Sledovania sa majú zameriavať hlavne na zmeny na koži, srsti, očiach a slizniciach, dýchaní, krvnom obeh, autonómnom a centrálnom nervovom systéme, ako aj na somatomotorike a na správaní. Príjem potravy a hmotnosť zvierat sa určujú každý týždeň. Pravidelné pozorovanie zvierat je potrebné, aby sa dalo čo najlepšie zabezpečiť, aby zvieratá neuhynuli počas testu na kanibalizmus, autolýzu tkanív alebo chybu pri premiestňovaní. Po ukončení testu sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou satelitnej skupiny, pitvú. Hynúce zvieratá, ako aj zvieratá, u ktorých sa zistili silné príznaky utrpenia alebo bolesti, sa musia okamžite oddeliť, humánne usmrtiť a pitvať metódou prijateľnou pre zvieratá.

Na konci testu sa musia všetky zvieratá, vrátane kontrolných zvierat, podrobiť nasledujúcim vyšetreniam:

1. hematologickému vyšetreniu, ktoré by malo zahŕňať aspoň určovanie hodnoty hematokrytu a koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov, ako aj hemokoagulačné parametre;

2. klinickobiochemickej analýze krvi: na posúdenie funkcie pečene a obličiek by sa mal určiť minimálne jeden z týchto parametrov: alanín-amino-transferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-pyruvát-transamináza), asparta-aminotranferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-oxalacetát-transamináza), močovínový dusík, albumín, kreatinín, celkový bilirubín a celkové bielkoviny v sére.

Ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú: vápnik, fosfor, chlorid, sodík, draslík, glukózu nalačno, lipidy, hormóny, rovnováhu medzi kyselinami a zásadami, methemoglobín a aktivitu cholinesterázy.

Tam, kde je to potrebné, sa môžu využiť dodatočné klinickobiochemické analýzy na rozšírenie skúmania pozorovaných účinkov.

1.6.4. **Pitva**

Na všetkých zvieratách, ktoré sa zúčastnili na teste, sa vykoná kompletná autopsia. Aspoň pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa čo najskôr po sekcii odvážia vlhké, aby sa zabránilo ich vysychaniu. Orgány a tkanivá, t. j. neexponovaná a exponovaná koža, pečeň, obličky, slezina, semenníky, nadobličky, srdce a cieľové orgány (orgány s makroskopickými zmenami alebo zmenami veľkosti), sa uchovávajú vo vhodnom médiu na možné neskoršie histopatologické vyšetrenie.

1.6.5. **Histopatologické vyšetrenia**

U všetkých zvierat skupiny s najvyššou dávkou, ako aj u zvierat kontrolnej skupiny sa musí vykonať histologické vyšetrenia konzervovaných orgánov a tkanív. Všetky orgány a tkanivá, ktoré vykazujú v skupinách s najvyššou dávkou poškodenia podmienené testovanou látkou, sa musia vyšetriť aj v ostatných skupinách s nižšou dávkou. U zvierat satelitnej skupiny sa musia veľmi dôkladne vyšetriť tie orgány a tkanivá, v ktorých sa u ostatných exponovaných skupín prejavili príznaky otravy.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z ktorej musí byť jasný počet zvierat pre každú testovanú skupinu a kontrolnú skupinu na začiatku testu a počet zvierat s jednotlivými formami poškodenia.

Všetky zistené výsledky sa vyhodnocujú vhodnou štatistickou metódou. Môže sa použiť akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. **SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- údaje o zvieratách (druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.),
- podmienky skúšania (vrátane druhu obväzu: okluzívny alebo neokluzívny),
- veľkosti dávky (vrátane vehikula, ak sa použilo) a koncentráciu,
- tam, kde je to možné, „no effect-level“,
- údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a koncentrácie,
- čas smrti počas testu alebo údaj, či zvieratá test prežili do konca testu,
- toxické a iné účinky,
- čas pozorovania jednotlivých príznakov toxických účinkov, ich ďalší priebeh,

- údaje o kŕmení a telesnú hmotnosť,
- hematologické testy a ich výsledky,
- klinickobiochemické testy a ich výsledky,
- pitevné nálezy,
- podrobný opis histopatologických nálezov,
- štatistické vyhodnotenie výsledkov,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

B.10. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VITRO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je duplikátom *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov (1997), označenej OECD TG 473.

1.1. ÚVOD

Účelom *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov je identifikovať činidlá, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómove odchýlky v pestovaných bunkách cicavcov (1) (2) (3). Štrukturálne odchýlky môžu byť v dvoch typoch, chromozómove alebo chromatidové. Väčšina chemických mutagénov vyvoláva chromatidové odchýlky, avšak vyskytujú sa tiež chromozómove odchýlky. Nárast polyploidie môže naznačovať, že chemikália má potenciál spôsobiť číselné odchýlky. Táto metóda však nie je určená na meranie číselných odchýlok a bežne sa na tento účel nepoužíva. Chromozómove mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy o tom, že chromozómove mutácie a podobné udalosti spôsobujúce odchýlky onkogénov a génov na potláčanie nádorov somatických buniek sú prítomné pri vzniku rakoviny u ľudí a pokusných zvierat.

In vitro test chromozómovej odchýlky u cicavcov môže obsahovať kultúry preukázaných bunkových línií, bunkové kmene alebo kultúry primárnych buniek. Použité bunky sa vyberajú na základe rastovej schopnosti kultúry, stability karyotypu, chromozómového čísla, chromozómovej diverzity a spontánnej frekvencie chromozómových odchýlok.

Testy vykonávané *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Tento systém metabolickej aktivácie nemôže úplne napodobniť podmienky cicavcov *in vivo*. Je potrebné sa starostlivo vyhnúť podmienkam, ktoré by viedli k pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénosť a ktoré môžu pochádzať zo zmien pH, osmolality alebo vysokých hladín cytotoxicity (4) (5).

Tento test sa používa na zistenie možných mutagénov a karcinogénov u cicavcov. Mnohé zlúčeniny, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú pre cicavcov karcinogénmi, avšak medzi týmto testom a karcinogénnosťou neexistuje dokonalá korelácia. Korelácia závisí od triedy chemikálie a je čoraz viac dôkazov, že existujú karcinogény, ktoré tento test neodhalí, pretože pravdepodobne účinkujú prostredníctvom mechanizmov odlišných od priameho poškodenia DNA.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómove poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a opätovné spojenie chromatidov.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómove poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S perióde replikácie DNA jadro neprechádza do mitózy, ale začína novú S periódu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16... chromatidmi.

Trhlina: achromatická lézia, menšia ako šírka jedného chromatidu s minimálnym posunutím chromatidov.

Mitotický index: pomer buniek v metafáze delený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; náznak stupňa šírenia tejto populácie.

Číselná (numerická) odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou číselnou (numerickou) charakteristikou použitých buniek.

Polyploidia: násobok haploidného počtu chromozómov (*n*) odlišný od počtu diploidov (t. j. 3*n*, 4*n* atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako vynechania a fragmenty, vnútorné zmeny alebo zámeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Bunkové kultúry sú exponované testovacou látkou s metabolickou aktiváciou aj bez nej. Vo vopred určených intervaloch po expozícii bunkových kultúr testovacou látkou sa spracúvajú látkou zastavujúcou metafázu (napr Colcemidom® alebo colchicínom), zozbierajú sa, zafarbia sa a metafázové bunky sa mikroskopicky analyzujú na zistenie prítomnosti chromozómových odchýlok.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**1.4.1.1. *Bunky*

Môžu sa použiť rôzne bunkové línie, kmene alebo primárne bunkové kultúry vrátane ľudských buniek (napríklad: fibroblasty čínskych morčiat, periférne krvné lymfocyty ľudí alebo iných cicavcov).

1.4.1.2. *Médiá a podmienky kultúr*

Pri udržiavaní kultúr sa používajú príslušné médiá a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, koncentrácia CO₂, teplota a vlhkosť). Získané bunkové línie a kmene sa pravidelne kontrolujú na stabilitu modálneho chromozómového čísla a absenciu mykoplazmatickej kontaminácie a v prípade kontaminácie sa nepoužívajú. Mal by byť známy čas normálneho bunkového cyklu a podmienky použitých kultúr.

1.4.1.3. *Príprava kultúr*

Zistené bunkové línie a kmene: bunky sa odoberajú z uskladnených kultúr, zasievajú sa do média kultúry v takej hustote, pri ktorej kultúry nedosiahnu zhuk pred časom zberu, a inkubujú sa pri teplote 37 °C.

Lymfocyty: celá krv ošetrovaná antikoagulantom (napríklad: heparínom) alebo separované lymfocyty získané od zdravých subjektov sa pridávajú do média kultúry obsahujúceho mitogén (napríklad: fytohemaglutinín) a inkubované sa pri teplote 37 °C.

1.4.1.4. *Metabolická aktivácia*

Bunky sú exponované testovacou látkou za prítomnosti i za neprítomnosti príslušného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S 9), pripravená z pečene hlodavcov ošetrovaných prípravkami na indukciu enzýmov, ako napríklad Aroclorom 1254 (6) (7) (8) (9) alebo zmesou fenobarbitonu a beta-naftoflavónu (10) (11) (12).

Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1 % – 10 % v/v v konečnom testovacom médiu. Stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch môže byť vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie.

Pre endogénnu aktiváciu môže poskytnúť potenciál množstvo situácií vrátane vytvorenia geneticky vypestovaných bunkových línií vyjadrujúcich špecifické aktivačné enzýmy. Výber použitých bunkových línií by mal byť vedecky podložený (napríklad: relevantnosťou cytochrómového P450 izoenzymu pre metabolizmus testovacej látky).

1.4.1.5. *Testovacia látka/príprava*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a rozriedujú, ak je to vhodné, pred ošetrovaním buniek. Kvapalné testovacie látky môžu byť pridané priamo do testovacích systémov a/alebo rozriedené pred ošetrovaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa, aby sa kedykoľvek, keď je to možné, zvažilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní vo vode nestabilných látok by organické rozpúšťadlá nemali obsahovať vodu. Vodu možno odstrániť pridaním molekulárneho sitka.

1.4.2.2. *Koncentrácie pri expozícii*

Medzi kritériá, ktoré treba zvážiť pri určovaní najvyššej koncentrácie, patrí cytotoxicita, rozpustnosť v testovacom systéme a zmeny pH alebo osmolality.

Cytotoxicita sa stanovuje s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie pri hlavnom pokuse použitím príslušného označenia integrity a rastu buniek, ako napríklad stupňa zhlukovania, počtu životaschopných buniek alebo mitotického indexu. Užitočné môže byť stanoviť cytotoxicitu a rozpustnosť v predbežnom pokuse.

Používajú sa najmenej tri analyzovateľné koncentrácie. Pri výskyte cytotoxicity tieto koncentrácie pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu; toto zvyčajne znamená, že koncentrácie majú byť oddelené najviac koeficientom medzi 2 a $\sqrt{10}$. V čase zberu by mala najvyššia koncentrácia ukazovať významný pokles stupňa zhlukovania, počtu buniek alebo mitotického indexu (všetky viac ako 50 %). Mitotický index je iba nepriamym meradlom cytotoxických/cytostatických účinkov a závisí od času po ošetrení. Mitotický index je však akceptovateľný pre suspenzné kultúry, v ktorých iné merania toxicity môžu byť náročné a nepraktické. Informácie o kinetike bunkových cyklov, ako napríklad priemerný generačný čas (average generation time – AGT), sa môžu použiť ako doplnkové informácie. AGT je však celkovým priemerom, ktorý nie vždy odhaľuje existenciu oneskorených subpopulácií, a aj malé zvýšenie priemerného generačného času môže byť spojené s veľmi podstatným oneskorením času optimálneho výťažku odchýlok.

Pre relatívne necytotoxické látky sú maximálne testovacie koncentrácie 5 µl/ml (5 mg/ml) alebo 0,01 M, podľa toho, ktorá je najnižšia.

Pre relatívne nerozpustné látky, ktoré nie sú toxické pri koncentráciách nižších ako nerozpustné koncentrácie, najvyššia použitá dávka je koncentráciou nad limit rozpustnosti v konečnom médiu kultúry na konci ošetrovacieho obdobia. V niektorých prípadoch (napríklad keď sa vyskytne toxicita len na vyššej ako najnižšej nerozpustnej koncentrácii) je vhodné testovať na viac než jednej koncentrácii s viditeľným zrážaním. Užitočné môže byť odhadnúť rozpustnosť na začiatku a na konci podávania, keďže rozpustnosť sa môže zmeniť počas priebehu expozície v testovacom systéme pre prítomnosť buniek, séra S9 atď. Nerozpustnosť sa dá zistiť voľným okom. Zrazenina hodnoteniu neprekáža.

1.4.2.3. *Negatívne a pozitívne kontroly*

Každý pokus má obsahovať pozitívne a negatívne (rozpušťač alebo nosič) kontroly, a to obe s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie. Pri použití metabolickej aktivácie je pozitívna kontrolná chemikália tá, pri ktorej sa na vznik mutagénnej reakcie vyžaduje aktivácia.

Pozitívne kontroly využívajú známy elastogén s úrovňami vystavenia, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast na pozadí, ktoré preukazuje citlivosť testovacieho systému.

Koncentrácie pozitívnej kontrolnej látky sa volia tak, aby boli účinky jasné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných sklíčok. Príklady pozitívnych kontrolných látok:

Stav metabolickej aktivácie	Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
Neprítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	metylmetánsulfonát	66-27-3	200-625-0
	etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7
	etylnitrozkarbamid	759-73-9	212-072-2
	mytomicín C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrochinolín-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Prítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	benzo[a]pyrén	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Možno použiť iné vhodné pozitívne kontrolné látky. Podľa dostupnosti sa tiež zväži použitie príbuzných chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v chemickej triede.

Negatívne kontroly pozostávajú iba zo samotného rozpúšťadla alebo nosiča v médiu a ošetrené rovnakým spôsobom ako ošetrované kultúry sa zahrnú pre každý čas zberu. Používajú sa tiež neošetrené kontrolné látky, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje poukazujúce na to, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne rušivé ani mutagénne efekty.

1.4.3. Postup

1.4.3.1. Pôsobenie testovacej látky

Na rozširujúce sa bunky pôsobí testovacia látka za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivity. Ošetrovanie lymfocytov by malo začať približne 48 hodín po mitogénnej stimulácii.

1.4.3.2. Pri každej koncentrácii sa používajú duplicitné kultúry a rozhodne sa odporúčajú pre negatívne/rozpúšťadlové kontrolné kultúry. Ak možno demonštrovať minimálnu variáciu medzi duplicitnými kultúrami (13) (14) z historických údajov, môže byť pre jednotlivé kultúry prijateľné použitie pri každej koncentrácii.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú príslušnými metódami, ako napríklad v hermeticky uzavretých nádobách (15) (16).

1.4.3.3. Čas zberu kultúry

Pri prvom pokuse sú bunky vystavené testovacej látke, a to s metabolickou aktiváciou aj bez metabolickej aktivity na 3 – 6 hodín, a vzorky z nich sa odoberajú v čase rovnajúcom sa približne 1,5-násobku dĺžky bežného cyklu buniek po začatí pokusu (12). Ak tento protokol ukáže negatívne výsledky s aktiváciou i bez aktivity, uskutoční sa ďalší pokus bez aktivity s neustálym podávaním až po odobratie vzorky v čase rovnajúcom sa približne 1,5-násobku dĺžky bežného cyklu buniek. Niektoré chemikálie sa dajú jednoduchšie zistiť pri časoch dlhších ako 1,5-násobok dĺžky cyklu. Negatívne výsledky s metabolickou aktiváciou sa musia potvrdiť od prípadu k prípadu. V tých prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, vypracuje sa zdôvodnenie.

1.4.3.4. Príprava chromozómov

Bunkové kultúry sa ošetrojú Colcemidom® alebo colchicinom zvyčajne 1 – 3 hodiny pred zberom. Každá bunková kultúra sa zbiera a spracúva oddelene na prípravu chromozómov. Príprava chromozómov zahŕňa hypotonické ošetrovanie buniek, fixáciu a sfarbenie.

1.4.3.5. Analýza

Všetky sklíčka vrátane sklíčok s pozitívnymi a negatívnymi kontrolami sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže fixačné postupy často ústia do pretrhnutia časti metafázových buniek so stratou chromozómov, vyhodnocované bunky by preto mali obsahovať niekoľko centromér rovnajúcich sa modálnemu číslu ± 2 pre všetky typy buniek. Na jednu koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vyhodnocuje najmenej 200 dobre rozšírených metafáz, rovnakým dielom rozdelených medzi duplikátmi. Tento počet možno znížiť, ak sa pozoruje vysoký počet odchýlok.

Hoci účelom tohto testu je zistiť štrukturálne chromozómové odchýlky, je dôležité zaznamenať polyploidiu a endoreduplikáciu, keď sa tieto javy pozorujú.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Experimentálnou jednotkou je bunka, a preto sa hodnotí percentuálny podiel buniek so štrukturálnou chromozómovou odchýlkou/odchýlkami. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre pokusné a kontrolné kultúry. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa nezahŕňajú do celkovej frekvencie odchýlok.

Zaznamenávajú sa tiež súbežné merania cytotoxicity pre všetky ošetrené a negatívne kontrolné kultúry pri hlavných pokusoch.

Uvádzajú sa údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa tiež sumarizujú v tabuľkovej forme.

Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej reakcie. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najmä využitím modifikácie pokusných podmienok. Potreba potvrdenia negatívnych výsledkov bola uvedená v bode 1.4.3.3. Modifikácia študijných parametrov na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa zväži pri dodatočných pokusoch. Študijné parametre, ktoré sa môžu modifikovať, zahŕňajú koncentráciu a podmienky metabolickej aktivácie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast spojený s koncentráciou alebo reprodukovateľný nárast počtu buniek s chromozómovými odchýlkami. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (3) (13). Štatistický význam nie je pre pozitívnu reakciu jediným určujúcim faktorom.

Nárast počtu polyploidných buniek môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť mitotické procesy a indukovať numerické chromozómové odchýlky. Nárast počtu buniek s endoreduplikovanými chromozómami môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť priebeh bunkového cyklu (17) (18).

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči konečný verdikt o aktivite testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybiteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov naznačujú, že testovacia látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v kultúrach somatických buniek cicavcov. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v kultúrach somatických buniek cicavcov.

3. PODÁVANIE SPRÁV

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie výberu nosiča,
- rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

- typ a zdroj buniek,
- karyotyp a vhodnosť použitého typu bunky,
- neprítomnosť mykoplasmy, ak je to vhodné,
- informácie o dĺžke cyklu bunky,
- pohlavie darcov krvi, celej krvi alebo separovaných lymfocytov, použitý mitogén,
- počet prechodov, ak je to vhodné,
- metódy udržiavania bunkovej kultúry, ak je to vhodné,

- modálne číslo chromozómov.

Podmienky testov:

- identita látky zadržiavajúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie expozície bunky,
- zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,
- skladba média, koncentrácia CO₂, ak je to vhodné,
- koncentrácia testovacej látky,
- objem nosiča a pridanej testovacej látky,
- inkubačná teplota,
- inkubačná doba,
- trvanie ošetrovania,
- hustota buniek pri vysádzaní, ak je to vhodné,
- typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,
- pozitívne a negatívne kontrolné kultúry,
- metódy prípravy vzoriek,
- kritériá na hodnotenie odchýlok,
- počet analyzovaných metafáz,
- metódy merania toxicity,
- kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

- známky toxicity, napríklad stupeň hromadenia, údaje o cykle bunky, počty buniek, mitotický index,
- príznaky zrážania,
- údaje o pH a osmolalite média, ak sú stanovené,
- definícia odchýlok vrátane trhlín,
- počet buniek s chromozómovými odchýlkami a typ chromozómových odchýlok uvedené oddelene pre každú ošetrovanú a kontrolnú kultúru,
- zmeny v ploidii, ak sa pozorujú,
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

- štatistické analýzy, ak existujú,
- údaje o negatívnej (rozpušťaadlo/nosič) a pozitívnej kultúre,
- historické údaje o negatívnej (rozpušťaadlo/nosič) a pozitívnej kultúre, s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami.

Rozbor výsledkov

Záver

4. ODKAZY

- (1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, vol. 4, Hollander, A. (ed), Plenum Press, New York a Londýn, s. 1 – 29.
- (2) Ishidate, M. Jr. a Sofumi, 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, s. 427 – 432.
- (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. a Zeiger, E. (1978), Chromosome Aberration and Sister Chromatic Exchanges in Chinese Hamster Ovary Cells: Evaluation of 108 chemicals, Environ. Molec. Mutagen, 10 (suppl. 10) s. 1-175.
- (4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. a Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, s. 147 – 204.
- (5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. a Okumura, K. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation. Res., 268, s. 297 – 305.
- (6) Ames, B. N., McCann, J. a Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, s. 347 – 364.
- (7) Maron, D. M a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, s. 173 – 215.
- (8) Natarajan, A. T., Bates, A. D., van Buul, P. P. W., Meyers, M. a de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) a Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat Liver Microsomes, Mutation Res., 37, s. 83 – 90.
- (9) Matsuoka, A., Hayashi, M. a Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in Vitro*, Mutation Res., 66, s. 277 – 290.
- (10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-Induced S9, *In Vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 175 – 177.
- (11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R a Philpot, R. M (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis testing, Elsevier, North Holland, s. 85 – 88.
- (12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. I., Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994) Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation Res., 312, s. 241 – 261.

-
- (13) Richardson, C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. a Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data, Kirkland, D. J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141 – 154.
- (14) Soper, K. A. a Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *in Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, s. 139 – 149.
- (15) Krahn, D. F. Barsky, F. C. a McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, s. 91 – 103.
- (16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. a 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, s. 795 – 801.
- (17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese Hamster cells during Alpha Radiation Induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, s. 403 – 413.
- (18) Huang, Y., Change, C, Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, s. 1362 – 1364.

B.11. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VIVO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY V KOSTNEJ DRENI CICAVCOV**1. METÓDA**

Táto metóda je obdobou metódy OECD TG 475 *in vivo* testu chromozómovej odchýlky v kostnej dreni cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vivo test chromozómovej odchýlky sa používa na zisťovanie štrukturálnych chromozómových odchýlok vyvolaných testovacou látkou v kostnej dreni zvierat, zvyčajne hlodavcov (1) (2) (3) (4). Štrukturálne chromozómové odchýlky sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Zvýšenie hladiny polyploidie môže naznačovať, že chemikália má potenciál indukovať numerické odchýlky. Väčšina chemických mutagénov indukuje odchýlky chromatidového typu, vyskytujú sa však aj odchýlky chromozómového typu. Chromozómové mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy o tom, že chromozómové mutácie a podobné udalosti spôsobujúce zmeny onkogénov a génov na potláčanie nádorov sú prítomné pri výskyte rakoviny u ľudí a v pokusných systémoch.

Pri tomto teste sa zvyčajne používajú hlodavce. Cieľovým tkanivom pri teste je kostná dreň, pretože je to vysoko vaskularizované tkanivo a obsahuje populáciu rýchlo cyklujúcich buniek, ktoré sa dajú jednoducho oddeliť a spracovať. Iné druhy a cieľové tkanivá sa pri tomto teste nepoužívajú.

Tento test chromozómovej odchýlky je osobitne relevantný pre hodnotenie mutagénnych rizík, pretože umožňuje zváženie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA, hoci tieto sa môžu od druhu k druhu a od tkaniva k tkanivu líšiť. *In vivo* test je tiež užitočný pre ďalšie skúmanie mutagénnych účinkov zistených *in vitro* testom.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a spojenie medzi chromatidmi.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S perióde replikácie DNA jadro neprechádza do mitózy, ale začína novú S periódu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16... chromatidmi.

Trhlina: achromatická lézia, menšia ako šírka jedného chromatidu, s minimálnym posunutím chromatidov.

Číselná (numerická) odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou číselnou (numerickou) charakteristikou použitých buniek.

Polyplóidia: násobok haploidného počtu chromozómov (n) odlišný od počtu diploidov (t. j. $3n$, $4n$ atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako vynechania a fragmenty, vnútorné zmeny alebo zámeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sa exponujú testovacej látke vhodnou expozíciou a utrátia sa vo vhodnom čase po ošetrovaní. Pred utratením sa zvieratá ošetrí prostriedkom zastavujúcim metafázu (napríklad Colcemidom® alebo colchicinom). Následne sa z kostnej drene urobí chromozómové prípravky, zafarbí sa a pri metafázových bunkách sa analyzujú chromozómové odchýlky.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Bežne sa používajú krysy, myši a čínske morčatá, hoci použiť sa dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne rody mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť $\pm 20\%$ strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou pre vlhkosť je $50\% - 60\%$.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klieťky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klieťok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriedujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepokazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemalo mať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené referenčnými údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa pre každé pohlavie vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podávania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívna kontrolná skupina vytvára štrukturálne odchýlky *in vivo* pri úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí. Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby účinky boli zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby sa pozitívnym kontrolným skupinám látky podávali spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich sa odoberali iba raz. Možno zvážiť použitie príbuzných chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v triede chemikálií. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu látok:

Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
etyl metánsulfonát	62-50-0	200-536-7
etyl nitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
mytomicin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
trietylénmelamín	51-18-3	200-083-5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú vzorky aj z negatívnych kontrolných skupín ošetrovaných rozpúšťadlom alebo nosičom a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Ak sa pre negatívne kontrolné skupiny používa jeden odber vzorky, najvhodnejším časom je prvý čas odberu. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne účinky.

1.5. POSTUP

1.5.1. Počet a pohlavie zvierat

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat každého pohlavia. Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov a používajúce rovnaké cesty expozície, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, stačí aj testovanie jedného pohlavia. Ak je expozícia chemikálií na ľudí závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. Harmonogram ošetrovania

Testovacie látky sa podávajú pri jednom ošetrovaní. Testovacie látky sa tiež môžu podávať v dvoch dávkach, t. j. dve ošetrenia v ten istý deň niekoľko hodín po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky. Iné dávkovacie režimy sa vedecky zdôvodnia.

Vzorky sa odoberajú v dvoch rôznych časoch po ošetrovaní v jeden deň. Pre hlodavce je prvým intervalom odberu vzorky 1,5-násobok dĺžky bežného bunkového cyklu (zvyčajne 12 – 18 hodín) po ošetrovaní. Keďže čas potrebný na strávenie a metabolizmus testovacej látky, ako aj jej účinky na kinetiku bunkového cyklu môžu ovplyvniť optimálny čas na zistenie chromozómovej odchýlky, odporúča sa neskôršie odobratie vzorky 24 hodín po prvom čase odberu vzorky. Ak sa používajú dávkovacie režimy dlhšie ako jeden deň, používa sa jeden odber vzorky pri 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po poslednom ošetrovaní.

Pred utratením sa zvieratám podáva injekčne intraperitoneálne potrebná dávka prostriedku zastavujúceho metafázu (napríklad Colcemid® alebo colchicin). Po uplynutí potrebného času sa následne odoberajú od zvierat vzorky. Pre myši je tento čas približne 3 – 5 hodín; pre čínske morčatá približne 4 – 5 hodín. Bunky sa zbierajú z kostnej drene a analyzujú sa chromozómové odchýlky.

1.5.3. Úrovně dávok

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu s použitím rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (5). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávkovania založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobuje určité známky toxicity v kostnej dreni (napríklad: vyššie ako 50 % zníženie mitotického indexu).

1.5.4. Limitný test

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch úrovní dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Pre štúdie s dlhším trvaním je limitnou dávkou 2 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce maximálne 14 dní a 1 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce viac ako 14 dní. Očakávaná expozícia ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. Podávanie dávok

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly, alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné cesty expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať žalúdočnou sondou alebo injekciou závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie vyšších objemov sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky

s vyššími koncentraciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava chromozómov**

Ihneď po utratení sa získava kostná dreň, ktorá sa vystaví hypotonickému roztoku a fixuje sa. Bunky sa potom umiestnia na sklíčka a zafarbia.

1.5.7. **Analýza**

Mitotický index sa stanovuje ako meradlo cytotoxicity aspoň na 1 000 bunkách na jedno zviera pre všetky pokusné zvieratá (vrátane pozitívnej kontrolnej skupiny) a pre neošetrené negatívne kontrolné zvieratá.

Pre každé zviera sa analyzuje najmenej 100 buniek. Tento počet možno znížiť pri pozorovaní vysokého počtu odchýlok. Všetky sklíčka vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže postupy prípravy sklíčok často ústia do pretrhnutia časti metafázy so stratou chromozómov, označené bunky by mali obsahovať počet centromér rovnajúci sa hodnote $2n \pm 2$.

2. **ÚDAJE**

2.1. **SPRACOVANIE VÝSLEDKOV**

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa hodnotí počet buniek, počet odchýlok na bunku a percento buniek so štrukturálnou chromozómovou odchýlkou/odchýlkami. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre experimentálne a kontrolné kultúry. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa neudávajú pri celkovej frekvencii odchýlok. Ak neexistujú dôkazy rozdielov medzi reakciami rôznych pohlaví, údaje z oboch pohlaví sa môžu kombinovať pre štatistickú analýzu.

2.2. **HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV**

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo jasný nárast počtu buniek s odchýlkami v jednej dávkovacej skupine pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (6). Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Nárast polyploidie môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál indukovať číselné chromozómové odchýlky. Nárast endoreduplikácie môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť priebeh bunkového cyklu (7) (8).

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vylúčia konečný verdikt o aktivite testovacej látky.

Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vivo* testu chromozómovej odchýlky naznačujú, že určitá látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v kostnej dreni testovaného druhu.

Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v kostnej dreni testovaného druhu.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. **SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie výberu nosiča,
- rozpustnosť a stálosť testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testované zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky chovu, strava atď.,
- individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

- pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,
- údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak sa uskutočnila,
- zdôvodnenie výberu konečnej úrovne,
- podrobnosti o príprave testovacej látky,
- podrobnosti o podávaní testovacej látky,
- zdôvodnenie výberu spôsobu podávania,
- metódy overovania, že testovacia látka dosiahla všeobecný vnútorný obeh alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,
- konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,
- podrobnosti o kvalite stravy a vody,
- metódy merania toxicity,
- identita látky zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie podávania,
- metódy prípravy sklíčok,

- kritériá na hodnotenie odchýlok,
- počet analyzovaných buniek na jedno zviera,
- kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

- známky toxicity,
- mitotický index,
- typ a počet odchýlok uvedený jednotlivo za každé zviera,
- celkový počet odchýlok na skupinu so strednou hodnotou a štandardnou odchýlkou,
- počet buniek s odchýlkami na skupinu so strednou hodnotou a štandardnou odchýlkou,
- zmeny v ploidii, ak sa pozorovali,
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,
- štatistické analýzy, ak sa použili,
- údaje o negatívnych kontrolných skupinách,
- historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,
- údaje o pozitívnych kontrolných skupinách.

Rozbor výsledkov

Závery

4. ODKAZY

- (1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests In Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, S. Venitt a J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D. C, s. 275 – 306.
- (2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. a Shelby, M. (1987), Mammalian *in vivo* Cytogenetic Assays. Analysis of Chromosome Aberration in Bone Marrow Cells, in: Mutation Res., 189, s. 157 – 165.
- (3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. a 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, s. 115 – 141.
- (4) Tice, R. R., Hayashi, M., MacGregaro, 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., Soutou, S. a Vannier, B., (1994) Report from the Working Group on the *in vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosom Aberration Test, Mutation Res., 312, s. 305 – 312.

-
- (5) Fielder, R I, Allen, J. A., Boobis, A. R, Botham, P. A., Doe, I, Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. a Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 313 – 319.
- (6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R, Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R, Richold, M., Papworth, D. G. a 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, s. 184 – 232.
- (7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha Radiation Induced G2 Arrest, *Mutation Res.*, 119, s. 403 – 413.
- (8) Huang, Y., Change, C. a Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells, *Cancer Res.*, 43, s. 1362 – 1364.

B.12. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VIVO* TEST MIKROJADRA ERYTROCYTU U CICAFCOV

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou OECD TG 474 *in vivo* testu mikrojadra erytrocytu u cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vivo test mikrojadra erytrocytu u cicavcov sa používa na zisťovanie poškodenia vyvolaného testovacou látkou na chromozómoch alebo mitotickom aparáte erytroblastov analýzou erytrocytov odobratých z kostnej drene a/alebo periférálnych krvných buniek zvierat, zvyčajne hlodavcov.

Účelom testu mikrojadra je identifikovať látky, ktoré spôsobujú cytogenetické poškodenie s tvorbou mikrojadier obsahujúcich zaostávajúce chromozómové fragmenty alebo celé chromozómy.

Keď sa erytroblast kostnej drene vyvinie na polychromatický erytrocyt, hlavné jadro sa odpudzuje; akýkoľvek mikronukleus, ktorý sa vytvoril, môže zostať pozadu v inak anukleovanej cytoplazme. Vizualizácia mikrojadier je v týchto bunkách jednoduchšia, pretože nemajú hlavné jadro. Nárast frekvencie mikronukleovaných polychromatických erytrocytov u pokusných zvierat je indikáciou vyvolaného chromozómového poškodenia.

Pri tomto teste sa zvyčajne používa kostná dreň hlodavcov, keďže polychromatické erytrocyty sa tvoria v tomto tkanive. Meranie mikronukleovaných nezrelých (polychromatických) erytrocytov v periférnej krvi je rovnako prijateľné pre akékoľvek druhy, pri ktorých sa preukázala neschopnosť sleziny odstraňovať mikronukleované erytrocyty alebo ktoré vykazali rovnakú citlivosť na zistenie činiteľov, ktoré spôsobujú štrukturálne alebo numerické chromozómové odchýlky. Mikrojadrá sa dajú rozlíšiť podľa niekoľkých kritérií. Ide napríklad o identifikáciu prítomnosti alebo neprítomnosti kinetochoru alebo centromerickej DNA v mikrojadrách. Frekvencia mikronukleovaných nezrelých (polychromatických) erytrocytov je principiálnym hlavným parametrom. Počet zreých (normochromatických) erytrocytov v periférnej krvi, ktorá obsahuje mikrojadrá medzi daným počtom zreých erytrocytov, sa tiež môže použiť ako parameter pokusu, ak tento prebieha štyri a viac týždňov.

Tento *in vivo* test mikrojadra cicavcov je pre hodnotenie mutagénneho rizika osobitne relevantný, pretože umožňuje zváženie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA, hoci tieto sa môžu z druhu na druh, z tkaniva na tkanivo a z géna na gén líšiť. *In vivo* test je tiež užitočný pre ďalšie skúmanie mutagénnych účinkov zistených *in vitro* systémom.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Centromera (kinetochora): oblasť/oblasti chromozómu, s ktorými sú spojené vretenové vlákna počas delenia buniek, umožňujúce riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Mikrojadrá: malé jadrá oddelené od hlavných jadier buniek a pridaných k nim, vytvárané počas telofázy mitózy (meiózy) zaostávajúcimi chromozómovými fragmentmi alebo celými chromozómami.

Normochromatický erytrocyt: zrelý erytrocyt, ktorý neobsahuje ribozómy a od nezrelých polychromatických erytrocytov sa líši škrvnami typickými pre ribozómy.

Polychromatický erytrocyt: nezrelý erytrocyt v medzištádiu vývoja, ktorý stále obsahuje ribozómy, a preto sa od zreých normochromatických erytrocytov líši škrvnami typickými pre ribozómy.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú vystavené testovacej látke príslušným spôsobom. Ak sa používa kostná dreň, zvieratá sa utratia vo vhodnom čase po podaní látky, kostná dreň sa vyberie a prípravky (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) sa zhotovia a zafarbí. Ak sa používa periférna krv, odoberá sa vo vhodnom čase po podaní látky a prípravky (4) (8) (9) (10) sa zhotovia a zafarbí. Pre štúdie s periférnou krvou by medzi poslednou expozíciou a zberom buniek mal ubehnúť minimálny čas. Preparáty sa analyzujú na prítomnosť mikrojadier.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšneho druhu*

Ak sa používa kostná dreň, odporúča sa použiť krysy a myši, hoci použiť sa dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov. Ak sa používa periférna krv, odporúča sa použiť myši. Použiť sa však dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov za predpokladu, že ide o druh, v ktorom slezina neodstraňuje mikronukleované erytrocyty, alebo druh, ktorý vykazuje primeranú citlivosť na zistenie činiteľov, ktoré spôsobujú štrukturálne alebo číselné chromozómové odchýlky. Vyberajú sa bežne používané laboratórne kmene mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť $\pm 20\%$ strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou pre vlhkosť je $50\% - 60\%$.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé mladé dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní. Klieťky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klieťok.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriedujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemal vyvolávať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemal by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť referenčné údaje označujúce ich kompatibilitu. Odporúča sa zväziť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa pre každé pohlavie vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontrolné skupiny. Okrem podávania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívne kontrolné skupiny vytvárajú mikrojadrá *in vivo* v úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí. Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby účinky boli zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby sa pozitívnym kontrolným skupinám podávali látky spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich sa odoberali iba raz. Možno zvážiť použitie príbuzných chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v triede chemikálií, ak sú tieto dostupné. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu:

Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7
N-etyl-N-nitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
mytomycín C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 055-19-2	200-015-4
trietylmelamín	51-18-3	200-083-5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú aj vzorky z negatívnych kontrolných skupín ošetrovaných rozpúšťadlom alebo nosičom a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Ak sa pre negatívne kontrolné skupiny používa jeden odber vzorky, najvhodnejším časom je prvý odber. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne efekty.

Ak sa používa periférna krv, prijateľná je tiež vzorka pred podaním látky ako súbežná negatívna kontrola, ale len v prípadoch krátkych štúdií periférnej krvi (napríklad: 1 – 3 dávky), keď výsledné údaje sú v očakávanom rozsahu pre historickú kontrolu.

1.5. POSTUP

1.5.1. Počet a pohlavie zvierat

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat každého pohlavia. Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov a používajúce rovnaké spôsoby vystavenia, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, stačí aj testovanie jedného pohlavia. Ak expozícia chemikálií na ľudí je závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. Harmonogram podávania

Nedá sa odporučiť žiadny štandardný (t. j. jedna, dve alebo tri podania v 24-hodinových intervaloch) harmonogram podávania. Vzorky z predĺžených dávkovacích režimov sú prijateľné, pokiaľ bol pre túto štúdiu preukázaný pozitívny účinok alebo pokiaľ bola pri negatívnej štúdii preukázaná toxicita, alebo ak sa použila limitná dávka a dávkovanie pokračovalo až do času odberu vzorky. Testovacie látky sa tiež môžu podávať v dvoch dávkach, t. j. dve ošetrenia v ten istý deň niekoľko hodín po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky.

Test sa môže uskutočniť dvoma spôsobmi:

- zvieratám sa testovacia látka podá raz. Vzorky kostnej drene sa odoberú minimálne dvakrát, nie skôr ako 24 hodín po podaní, ale nie neskôr ako 48 hodín po podaní s primeranými intervalmi medzi odbermi. Uskutočnenie odberu skôr ako 24 hodín po podaní sa zdôvodní. Vzorky periférnej krvi sa odoberú minimálne dvakrát, minimálne 36 hodín po podaní s primeranými intervalmi po odbere, ale nie neskôr ako po 72 hodinách. Pri zistení pozitívnej reakcie pri niektorom odbere nie je ďalší odber vzorky potrebný;

- b) ak sa použijú dve alebo viac dávok za deň (napríklad dve alebo viac dávok v 24-hodinových intervaloch), vzorky sa odoberajú raz medzi 18. a 24. hodinou nasledujúcou po poslednej dávke pri kostnej dreni a raz medzi 36. a 48. hodinou po poslednej dávke pri periférnej krvi (12).

Ak je to relevantné, použijú sa ďalšie intervaly odberu vzoriek.

1.5.3. Úrovnne dávok

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu s použitím rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (13). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou z kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobuje určité známky toxicity v kostnej dreni (napríklad zníženie podielu nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov v kostnej dreni alebo periférnej krvi).

1.5.4. Limitný test

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch objemov dávok sa nepovažuje za potrebnú. Pre štúdie s dlhším trvaním je limitnou dávkou 2 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce maximálne 14 dní a 1 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce viac ako 14 dní. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávok pri použití limitného testu.

1.5.5. Podávanie dávok

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly, alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné spôsoby expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať žalúdočnou sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie vyšších objemov sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. Príprava kostnej drene/krvi

Bunky kostnej drene sa zvyčajne získavajú zo stehennej kosti (femur) alebo holennej kosti (tibia) ihneď po utratení. Zvyčajne sa bunky z týchto kostí odoberú, pripraví sa a zafarbí použitím bežných metód. Periférna krv sa získava z chvostovej žily alebo inej vhodnej žily. Krvné bunky sa ihneď supraviválne zafarbí (8) (9) (10) alebo sa urobí škvrnové prípravky, ktoré sa následne zafarbí. Použitie špecifického farbiva DNA [napríklad akridínová oranž (14) alebo Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)] môže odstrániť niektoré umelo vzniknuté štruktúry buniek spojené s používaním nešpecifického farbiva DNA. Táto výhoda nedáva predpoklad používania konvenčných farbív (napríklad Giemsa). Použiť sa tiež môžu dodatočné systémy [napríklad celulózne stĺpce na odstránenie nukleovaných buniek (16)], a to za predpokladu, že tieto systémy vykazujú v laboratórnych podmienkach primerané výsledky pri príprave mikrojadier.

1.5.7. Analýza

Pre každé zviera sa stanovuje podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov (zrelých plus nezrelých) spočítaním celkovo najmenej 200 erytrocytov pre kostnú dreň a 1 000 erytrocytov pre periférnu krv (17). Všetky sklíčka vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Na výskyt mikronukleovaných nezrelých erytrocytov sa počíta minimálne 2 000 nezrelých erytrocytov na jedno zviera. Dodatočné informácie možno získať zaznamenávaním zreých erytrocytov na mikrojadrách. Pri analýze sklíčok by podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov nemal byť menej ako 20 % kontrolnej hodnoty. Ak podávanie trvá bez prestávky štyri a viac týždňov, na výskyt mikrojadier sa počíta minimálne 2 000 zreých erytrocytov na jedno zviera. Systémy na automatickú analýzu (vizuálna analýza a toková cytometrická analýza bunkových suspenzií) sú prijateľnou alternatívou manuálneho hodnotenia, ak sa príslušne zdôvodnia a potvrdia.

2. ÚDAJE**2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV**

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa jednotlivo uvádza počet nezrelých erytrocytov, počet mikronukleovaných nezrelých erytrocytov a podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov. Ak podávanie prebieha bez prestávky štyri a viac týždňov, udávajú sa tiež údaje o zrelosti erytrocytov, ak sa zhromažďovali. Pre každé zviera sa udáva podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov, a ak je to vhodné, percentuálny podiel mikronukleovaných erytrocytov. Ak neexistujú dôkazy o rozdieloch medzi reakciami rôznych pohlaví, údaje z oboch pohlaví sa môžu kombinovať pre štatistickú analýzu.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo jasný nárast počtu buniek s odchýlkami v jednej dávkovacej skupine pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (18) (19). Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Testovacia látka, pre ktorú nespĺňajú výsledky vyššie uvedené kritériá, sa pre tento test považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vylúčia konečný verdikt o aktivite testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky testu mikrojadier naznačujú, že určitá látka vyvoláva mikrojadrá, ktoré sú výsledkom chromozómového poškodenia alebo poškodenia mitotického aparátu v erytroblastoch testovaného druhu.

Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka v nezrelých erytrocytoch testovaného druhu mikrojadrá nevytvára.

3. PODÁVANIE SPRÁV**SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie výberu nosiča,
- rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky chovu, strava atď.,
- individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

- pozitívne a negatívne (rozpušťaadlo/nosič) kontrolné skupiny,
- údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak sa uskutočnila,
- zdôvodnenie voľby úrovne dávok,
- podrobnosti o príprave testovacej látky,
- podrobnosti o podávaní testovacej látky,
- zdôvodnenie spôsobu podávania,
- metódy overovania, že testovacia látka dosiahla všeobecný vnútorný obeh alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,
- konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,
- podrobnosti o kvalite stravy a vody,
- podrobný opis harmonogramov podávania a odoberania vzoriek,
- metódy prípravy sklíčok,
- metódy merania toxicity,
- kritériá počítania mikronukleovaných nezrelých erytrocytov,
- počet analyzovaných buniek na jedno zviera,
- kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky

- známky toxicity,
- podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov,
- počet mikronukleovaných nezrelých erytrocytov jednotlivo pre každé zviera,
- $\pm$ stredná hodnota štandardnej odchýlky mikronukleovaných nezrelých erytrocytov na skupinu,
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,
- použité štatistické analýzy a metódy,
- údaje o negatívnych kontrolných skupinách,
- údaje o pozitívnych kontrolných skupinách.

— Rozbor výsledkov

— Závery

4. ODKAZY

- (1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, s. 187 – 190.
- (2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, s. 9 – 15.
- (3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. a Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.*, 123, s. 61 – 118.
- (4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. a Heddle, J. A. (1990), The *In vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, s. 29 – 80.
- (5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. a 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 a T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, s. 555 – 558.
- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R. a Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, s. 103 – 112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. a 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, s. 513 – 522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. a Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, s. 245 – 249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, *Mutation Res.*, 278, s. 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, s. 53 – 159.
- (11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr., F. B., Pacchicotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Soutou, S. a Vannier, B. (1994), *In vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, s. 293 – 304.
- (12) Higashikuni, N. a Soutou, S. (1995), An Optimal Generalised Sampling Time of 30 ± 6 h after Double Dosing in the Mouse Peripheral Micronucleus Test, *Mutagenesis*, 10, s. 313 – 319.
- (13) Fielder, R. I., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, I., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. a Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, s. 313 – 319.
- (14) Hayashi, M., Sofumi, T. a Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, s. 241 – 247.

-
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. a Langlois, R. G (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, s. 269 – 275.
- (16) Romagna, F. a Staniforth, C. D. (1989), The Automated Bone Marrow Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 213, s. 91 – 104.
- (17) Gollapudi, B. a McFadden, L. G (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, s. 97 – 99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G., Bootman, J. a 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, s. 115 – 141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G E., Clare, G, Ferguson, R, Richold, M., Papworth, D. G. a Savage, J. R. K, (1989) Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III*, D. J. Kirkland (ed), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184 – 232.

B.13/14. **MUTAGÉNNOSŤ: BAKTERIÁLNY TEST REVERZNÝCH MUTÁCIÍ**1. **METÓDA**

Táto metóda je obdobou metódy OECD TG 471 bakteriálneho testu reverzných mutácií (1997).

1.1. **ÚVOD**

Bakteriálny test reverzných mutácií používa aminokyseliny vyžadujúce kmene *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* na zistenie bodových mutácií, ktoré zahŕňajú nahradenie, pridanie alebo vymazanie jednej alebo niekoľkých báзовých párov DNA (1) (2) (3). Princípom bakteriálneho testu reverzných mutácií je, že zisťuje mutácie, ktoré vracajú do pôvodného stavu mutácie prítomné v testovacích kmeňoch a obnovujú funkčnú schopnosť baktérií syntetizovať esenciálne aminokyseliny. Reverzné baktérie sa zisťujú prostredníctvom ich schopnosti rásť v neprítomnosti aminokyseliny vyžadovanej rodičovským testovacím kmeňom.

Bodové mutácie sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy, že bodové mutácie onkogénov a génov na potlačanie nádorov somatických buniek sú prítomné pri výskyte rakoviny u ľudí a pokusných zvierat. Bakteriálny test reverzných mutácií je rýchly, lacný a relatívne ľahko uskutočniteľný. Mnohé z testovacích kmeňov majú viacero vlastností, ktoré spôsobujú ich väčšiu citlivosť na zistenie mutácií vrátane reaktívnych DNA sekvencií na reverzných miestach, zvýšenej bunkovej permeability na veľké molekuly a eliminácie opravných systémov DNA alebo zlepšenia opravných procesov DNA náchylných na chyby. Špecifickosť testovacích kmeňov môže poskytnúť užitočné informácie o typoch mutácií, ktoré sú vyvolané genotoxickými činidlami. Dostupná je veľká databáza výsledkov pre rôzne štruktúry pre bakteriálny test reverzných mutácií a boli vyvinuté dobré metódy na testovanie chemikálií s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami vrátane prchavých zmesí.

Pozri tiež všeobecný úvod častí B.

1.2. **DEFINÍCIE**

Test reverzných mutácií buď v *Salmonella typhimurium*, alebo *Escherichia coli* zisťuje mutáciu v kmeni vyžadujúcom aminokyselinu (histidín alebo tryptofán) na vytvorenie kmeňa nezávislého od vonkajšieho prívodu aminokyseliny.

Substitučné mutagény báзовého páru sú činidlá, ktoré spôsobujú báзовú zmenu DNA. V teste reverzných mutácií sa môže táto zmena odohrať na mieste pôvodnej mutácie alebo na inom mieste bakteriálneho genómu.

Konštrukčné mutagény sú činidlá, ktoré spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých báзовých párov DNA, čím menia čítaciu konštrukciu DNA.

1.3. **ÚVODNÉ ÚVAHY**

Bakteriálny test reverzných mutácií využíva prokaryotické bunky, ktoré sa od buniek cicavcov odlišujú vo faktoroch, ako je vstrebávanie, metabolizmus, chromozómová štruktúra a opravné procesy DNA. Testy uskutočnené *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. *In vitro* systémy metabolickej aktivácie nemôžu plne napodobniť *in vivo* podmienky cicavcov. Test preto neposkytuje priame informácie o mutagénnej a karcinogénnej potencii látky u cicavcov.

Bakteriálny test reverzných mutácií sa bežne používa ako počiatočný prieskum genologickej aktivity, a najmä aktivity vyvolávajúcej bodové mutácie. Rozsiahla databáza ukázala, že mnohé chemikálie, ktoré sú v tomto teste pozitívne, tiež vykazujú mutagénnu aktivitu v iných testoch. Existujú príklady mutagénnych činidiel, ktoré sa nezistili týmto testom; príčina týchto chýb sa dá pripísať špecifickej povahe zisteného stavu, rozdielom v metabolickej aktivácii alebo rozdielom v biodostupnosti. Na druhej strane faktory, ktoré zvyšujú citlivosť bakteriálneho testu reverzných mutácií, môžu viesť k preceneniu mutagénnej aktivity.

Bakteriálny test reverzných mutácií nemusí byť vhodný na hodnotenie určitých tried chemikálií, napríklad vysoko bakteriálnych zlúčenín (napríklad určitých antibiotík) a tých, o ktorých sa predpokladá (alebo je o nich známe), že špecificky narušajú replikačný systém buniek cicavcov (napríklad niektoré inhibitory topoizomérázy a niektoré nukleozidové napodobeniny). V takýchto prípadoch sú vhodnejšie testy mutácií u cicavcov.

Hoci mnohé zlúčeniny, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú karcinogénmi u cicavcov, korelácia nie je absolútna. Závisí to od triedy chemikálie a existujú karcinogény, ktoré sa týmto testom nezistia, pretože pôsobia prostredníctvom iných negenotoxických mechanizmov alebo mechanizmov neprítomných v bunkách baktérií.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Suspenzie bakteriálnych buniek sú vystavené testovacej látke v prítomnosti a neprítomnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie. Pri metóde použitia misiek sa tieto suspenzie zmiešajú s krycím agarom a umiestnia sa na veľmi malé médium. Pri metóde predinkubácie sa dávkovaná zmes inkubuje a potom zmieša s krycím agarom pred umiestnením na veľmi malé médium. Pri oboch technikách sa po dvoch alebo troch dňoch inkubácie spočítajú reverzné kolónie a porovnajú sa s počtom spontánnych kolónií revertantov na kontrolných miskách.

Boli opísané viaceré postupy uskutočnenia bakteriálneho testu reverzných mutácií. Medzi bežne používané patrí metóda použitia misiek (1) (2) (3) (4), predinkubačná metóda (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktučná metóda (9) (10) a suspenzná metóda (11). Opísané boli aj modifikácie testovania plynov a pár (12).

Postupy opísané v tejto metóde sa týkajú najmä metódy použitia misky a predinkubačnej metódy. Obe sú prijateľné pre uskutočňovanie pokusov s metabolickou aktiváciou aj bez nej. Niektoré látky sa dajú efektívnejšie zistiť použitím predinkubačnej metódy. Tieto látky patria do tried chemikálií, ktoré zahŕňajú alifatické nitrozamíny s krátkymi reťazcami, bivalentné kovy, aldehydy, azofarbivá a diazozlúčeniny, pyrolizidínové alkaloidy, alylové zlúčeniny a nitrozylúčeniny (3). Zistilo sa, že niektoré triedy mutagénov sa nie vždy objavajú s použitím štandardných postupov, ako napríklad metódou použitia misky alebo predinkubačnou metódou. Tieto mutagény sa považujú za „osobitné prípady“ a na ich zistenie sa dôrazne odporúča použitie alternatívnych postupov. Identifikované boli nasledujúce „osobitné prípady“ (spolu s príkladmi postupov, ktoré by sa dali použiť na ich zistenie): azofarbivá a diazozlúčeniny (3) (5) (6) (13), plyny a prchavé chemikálie (12) (14) (15) (16) a glykozidy (17) (18). Odchýlka od štandardného postupu sa musí vedecky zdôvodniť.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. Prípravné práce

1.5.1.1. Baktérie

Čerstvé kultúry baktérií sa nechajú vyrásť do neskorého exponenciálneho alebo skorého stacionárneho štádia rastu (približne 10^9 buniek na ml). Kultúry v neskorom stacionárnom štádiu sa nepoužívajú. Je dôležité, aby kultúry použité pri pokuse obsahovali vysoký podiel životaschopných baktérií. Podiel sa dá preukázať buď z minulých kontrolných údajov o rastových krivkách, alebo pri každom pokuse prostredníctvom určenia počtu životaschopných buniek miskovým pokusom.

Odporúčaná inkubačná teplota je 37 °C.

Používa sa najmenej päť kmeňov baktérií. Tieto zahŕňajú štyri kmene *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 alebo TA 97a alebo TA 97, TA 98 a TA 100), ktoré boli v laboratóriách preukázateľne spoľahlivé a reprodukčne reaktívne. Tieto štyri kmene *S. typhimurium* majú GC bázoové páry na primárnom reverznom mieste a je známe, že nemusia zistiť určité oxidujúce mutagény, medzispájacie činidle a hydrazíny. Takéto látky sa dajú zistiť pomocou kmeňov *E. coli* WP2 alebo *S. typhimurium* TA 102 (19), ktoré majú AT bázu na primárnom reverznom mieste. Odporúčanou kombináciou kmeňov je preto:

— *S. typhimurium* TA 1535 a

— *S. typhimurium* TA 1537 alebo TA 97, alebo TA 97a a

— *S. typhimurium* TA 98 a

— *S. typhimurium* TA 100 a

— *E. coli* WP2 uvrA alebo *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), alebo *S. typhimurium* TA 102.

Na zistenie spájajúcich mutagénov je vhodnejšie použiť TA 102 alebo pridať kmeň *E. coli* [napríklad *E. coli* WP2 alebo *E. coli* WP2 (pKM101)], ktorý dokonale opravuje DNA.

Na prípravu kultúr, overovanie bunkových znakov a uskladnenie sa používajú overené postupy. Požiadavka na aminokyselinu pre rast sa preukazuje pre každý prípravok zmrazenej kultúry (histidín pre kmene *S. typhimurium* a tryptofán pre kmene *E. coli*). Podobným spôsobom sa overujú iné fenotypové charakteristiky, menovite ak je potrebná prítomnosť alebo neprítomnosť R-faktorových plazmidov [napríklad odolnosť proti ampicilínu v kmeňoch TA 98, TA 100 a TA 97a alebo TA 97, WP2 uvrA alebo WP2 uvrA (pKM101) a odolnosť proti ampicilínu a tetracyklínu v kmeni TA102]; prítomnosť charakteristických mutácií (t. j. rfa mutácia *S. typhimurium* prostredníctvom citlivosti na kryštálovo fialovú a uvrA mutáciu *E. coli* alebo uvrB mutáciu *S. typhimurium* prostredníctvom citlivosti na ultrafialové svetlo) (2) (3). Kmene by tiež mali dosahovať spontánne počty revertantných kolónií v rámci frekvenčných rozsahov očakávaných podľa historických kontrolných údajov laboratória, najlepšie v rozsahu uvedenom v literatúre.

1.5.1.2. *Médium*

Používa sa vhodné minimálne množstvo agaru (napríklad obsahujúci Vogelovo-Bonnerovo minimálne médium E a glukózu) a krycí agar obsahujúci histidín a biotín alebo tryptofán umožňujúci malý počet delení buniek (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolická aktivácia*

Baktérie sa vystavia testovacej látke v prítomnosti i v neprítomnosti vhodného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9), pripravená z pečene hlodavcov ošetrovaných prípravkami na indukciu enzýmov, ako napríklad Aroclorom 1254 (1) (2) alebo kombináciou fenobarbitonu a betanatoftalavónu (18) (20) (21). Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentrácii v rozsahu od 5 % do 30 % v/v v zmesi S9. Výber a stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch je vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie. Pre azofarbivú a diazozmesť je vhodnejšie použiť redukčný systém metabolickej aktivácie (6) (13).

1.5.1.4. *Testovacia látka/prípravok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to potrebné, rozriedujú sa pred podávaním baktériám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepokazujú na vhodnosť uskladnenia.

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9 (22). Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť údaje označujúce ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, ak je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní vo vode nestabilných látok by organické rozpúšťadla nemali obsahovať vodu.

1.5.2. **Podmienky testov**

1.5.2.1. *Testovacie kmene (pozri 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Koncentrácie dávok*

Medzi kritériá, ktoré je potrebné brať do úvahy pri stanovovaní najvyššieho množstva použitej testovacej látky, patrí cytotoxicita a rozpustnosť v konečnej zmesi.

Je užitočné stanoviť toxicitu a nerozpustnosť pri predbežnom pokuse. Cytotoxicita sa dá zistiť redukciami v množstve revertantných kolónií, vyjasnením alebo redukciami pozadia, alebo stupňom prežitia ošetrovaných kultúr. Cytotoxicita látky sa môže meniť v prítomnosti systémov metabolickej aktivácie. Nerozpustnosť by sa mala určiť ako vyzrážanie v konečnej zmesi za skutočných podmienok testu a musí byť viditeľná voľným okom.

Odporúčaná maximálna testovacia koncentrácia rozpustných necytotoxických látok je 5 mg/miska alebo 5 µl/miska. V prípade necytotoxických látok, ktoré nie sú rozpustné pri 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, má byť v konečnej zmesi nerozpustná jedna alebo viac testovaných koncentrácií. Testované látky, ktoré sú cytotoxické už pod 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, sa majú testovať až po cytotoxickú koncentráciu. Zrazenina by nemala prekážať vyhodnoteniu.

Malo by sa použiť aspoň päť rôznych analyzovateľných koncentrácií testovanej látky s intervalmi približne pol log (t. j. $\sqrt{10}$) medzi testovanými miestami v počiatočnom experimente. Menšie intervaly môžu byť vhodné vtedy, ak sa skúma vzťah koncentrácia/reakcia. Možno zvážiť testovanie nad koncentráciu 5 mg/miska alebo 5 μ l/miska, ak sa vyhodnocujú látky obsahujúce významné množstvá potenciálne mutagénnych nečistôt.

1.5.2.3. Negatívne a pozitívne kontroly

Pri každej skúške sa zahrnú súbežne podľa kmeňa špecifické pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontrolné kultúry, a to s metabolickou aktiváciou i bez nej. Koncentrácie pri pozitívnych kontrolných kultúrach sa volia tak, aby pri každej skúške vykazovali efektívny výkon.

Pri pokusoch s použitím systému metabolickej aktivácie sa referenčné látky pozitívnej kontrolnej kultúry vyberajú na báze použitého typu bakteriálnych kmeňov.

Nasledujúce látky sú príkladmi látok vhodných pre pozitívne kontrolné kultúry pri pokusoch s metabolickou aktiváciou.

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetylantracén
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetylbenz[a]anthracén
50-32-8	200-028-5	benzo[a]pyrén
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracén
50-18-0		cyklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	cyklofosfamid monohydrát

Nasledujúca látka je vhodná pre pozitívne kontrolné kultúry pri metóde redukčnej metabolickej aktivácie:

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
573-58-0	209-358-4	Congo Red (červen Congo)

2-aminoantracén by nemal byť jediným indikátorom efektívnosti zmesi S9. Ak sa používa 2-aminoantracén, každá dávka S9 by tiež mala byť charakterizovaná mutagénom, ktorý vyžaduje metabolickú aktiváciu mikrozomálnymi enzýmami, napríklad benzo[a]pyrén, dimetylbenzantracén.

Nasledujúce látky sú príkladmi pozitívnych kontrolných kultúr podľa kmeňov pre skúšky bez exogénneho systému metabolickej aktivácie:

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka	Kmeň
26628-22-8	247-852-1	azid sodný	TA 1535 a TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluorén	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridín	TA 1537, TA 97 a TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 a TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumén hydroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomycín C	WP2 uvrA a TA 102

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka	Kmeň
70-25-7	200-730-1	N-etyl-N-nitro-N-nitrozguanidín	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrochinolín-1-oxid	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furylfuramid (AF2)	kmene obsahujúce plazmid

Pre pozitívne kontrolné kultúry sa môžu použiť aj ďalšie vhodné referenčné látky. Podľa dostupnosti sa zväzi použitie chemikálií príbuzných triede chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu.

Použijú sa tiež negatívne kontrolné vzorky pozostávajúce len z rozpúšťadla alebo nosiča, bez testovacej látky a inak ošetrované rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny. Používajú sa aj neošetrené kontrolné vzorky, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne škodlivé alebo mutagénne účinky.

1.5.3. Postup

Pri metóde s použitím misiek (1) (2) (3) (4) bez metabolickej aktivácie sa zvyčajne zmieša 0,05 ml alebo 0,1 ml testovacích roztokov, 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry (obsahujúcej približne 10^8 životaschopných buniek) a 0,5 ml sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Pri skúške s metabolickou aktiváciou sa zvyčajne zmieša 0,5 ml roztoku metabolickej aktivácie obsahujúceho vhodné množstvo postmitochondriálnej frakcie (v rozmedzí od 5 % do 30 % v/v v roztoku na metabolickú aktiváciu) s krycím agarom (2,0 ml), s baktériami a testovacou látkou/testovacím roztokom. Obsah oboch skúmaviek sa zmieša a vyleje sa na povrch veľmi malej agarovej misky. Krycí agar sa pred inkubáciou nechá vytvrdnúť.

Pri predinkubačnej metóde (2) (3) (5) (6) sa testovacia látka/testovací roztok predinkubuje s testovacím kmeňom (obsahujúcim približne 10^8 životaschopných buniek) a sterilným tlmiacim roztokom alebo systémom metabolickej aktivácie (0,5 ml) zvyčajne na 20 minút alebo viac pri teplote 30 °C – 37 °C pred zmiešaním s krycím agarom a vyliatím na povrch veľmi malej agarovej misky. Zvyčajne sa mieša 0,05 alebo 0,1 ml testovacej látky/testovacieho roztoku, 0,1 ml baktérií a 0,5 ml zmesi S9 alebo sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Skúmanky sa počas predinkubácie vetrajú použitím miešadla.

Pri každej úrovni dávok sa kvôli primeranému odhadu variácie používajú tri misky. Použitie dvoch misiek je prijateľné s vedeckým zdôvodnením. Občasná strata misky pokus neznehodnocuje.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú vhodnými metódami, ako napríklad vo vzduchotesne uzatvorených nádobách (12) (14) (15) (16).

1.5.4. Inkubácia

V danom pokuse sa misky inkubujú pri teplote 37 °C počas 48 – 72 hodín. Po uplynutí inkubačnej doby sa zráta počet revertantných kolónií na misku.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa uvádzajú ako počet revertantných kolónií na misku. Udáva sa tiež počet revertantných kolónií pri negatívnych (kontrola rozpúšťadlom a bez ošetrovania, ak sa použili) a pozitívnych kontrolných kultúrach. Jednotlivé počty na miskách, stredná hodnota revertantných kolónií na misku a štandardná odchýlka sa uvádzajú pre testovaciu látku aj pre pozitívne a negatívne kontrolné kultúry (bez ošetrovania a/alebo s rozpúšťadlom).

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasných pozitívnych reakcií. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok. Negatívne výsledky sa musia potvrdiť od prípadu k prípadu. V prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, sa poskytnú

zdôvodnenie. Modifikácia parametrov štúdie na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa posudzuje pri následných pokusoch. Parametre štúdie, ktoré sa dajú modifikovať, zahŕňajú rozsahy koncentrácií, metódu aplikácie látky (použitie misky alebo kvapalná predinkubácia) a podmienky metabolickej aktivácie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast oproti testovanému rozsahu spojený s koncentráciou a/alebo reprodukovateľný nárast pri jednej alebo viacerých koncentráciách počtu revertantných kolónií na miskú najmenej v jednom kmeni so systémom metabolickej aktivácie alebo bez systému metabolickej aktivácie (23). Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (24). Štatistická významnosť však nie je jediným určujúcim faktorom pozitívnej reakcie.

Testovacia látka, pre ktorú nespĺňajú výsledky vyššie uvedené kritériá, sa pre tento test považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky bakteriálneho testu reverzných mutácií naznačujú, že určitá látka vyvoláva bodové mutácie prostredníctvom základných substitúcií alebo konštrukčných posunov genómu *Salmonella typhimurium* a/alebo *Escherichia coli*. Negatívne výsledky naznačujú, že testovacia látka nie je v testovacích podmienkach pre testované druhy mutagénna.

3. PODÁVANIE SPRÁV

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie výberu nosiča,
- rozpustnosť a stálosť testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Kmene:

- použité kmene,
- počet buniek v kultúre,
- charakteristiky kmeňa.

Podmienky testov:

- množstvo testovacej látky na miskú (mg/miska alebo µl/miska) so zdôvodnením voľby dávky a počtu misiek na koncentráciu,
- použité médiá,
- typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,
- postupy dávkovania.

Výsledky:

- známky toxicity,
- známky zrážania,
- počty na jednotlivých miskách,
- stredná hodnota revertantných kolónií na miskú a štandardná odchýlka,
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,
- štatistické analýzy, ak sa uskutočnili,
- súbežné údaje o negatívnych (rozpušťač/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,
- historické údaje o negatívnych (rozpušťač/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami.

Rozbor výsledkov.

Záver.

4. ODKAZY

- (1) Ames, B. N., McCann, J. a Yamasaki, E. (1975) Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, s. 347 – 364.
- (2) Maron, D. M. a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, s. 173 – 215.
- (3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. a Zeiger, E. (1994) Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, s. 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. a Ray, V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, s. 69 – 240.
- (5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. a Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer letters* 1, s. 91 – 96.
- (6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. a Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Test, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Norpeth, K. H. a Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273 – 285.
- (7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. a Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, s. 13 – 61.
- (8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. a Porchet, L. (1987), Liquid Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, s. 167 – 177.
- (9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. a Bridges, B. A. (1976), Use of a Simplified Fluctuation Test to Detect Low Levels of Mutagens, *Mutation Res.*, 38, s. 33 – 42.

- (10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. a Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2. vydanie, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. a Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141 – 161.
- (11) Thomson, E. D. a Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, Environmental Mutagenesis, 3, s. 453 – 465.
- (12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. a Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, s. 335 – 344.
- (13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D a Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, s. 33 – 47.
- (14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. a Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals (Testy mutagénnosti samonelly, výsledky testovania 311 chemikálií), Environ. Mol. Mutagen., 19, s. 2 – 141.
- (15) Simmon, V., Kauhanen, K. a Tardiff, R. G (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in: Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges a F. Soebels (eds), Elsevier, Amsterdam, s. 249 – 258.
- (16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. a Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, s. 421 – 441.
- (17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. a Sugimura, T. (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cyasin and Synthetic Metylazoxo Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, Cancer Res., 39, s. 3780 – 3782.
- (18) Tamura, G, Gold, C, Ferro-Luzzi, A. a Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, s. 4961 – 4965.
- (19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J., a Gatehouse, D. G (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia Coli* WP2 Tester Strains, Mutagenesis, 5, s. 285 – 291.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis testing, de Serres a kol. (eds), Elsevier, North Holland, s. 85 – 88.
- (21) Elliot, B. M., Combes, R D. Elcombe, C. R, Gatehouse, D. G, Gibson, G. G, Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 175 – 177.
- (22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. a Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, Mutation Res., 88, s. 343 – 350.
- (23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K, Nestmann, E. a Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, s. 83 – 91.
- (24) Mahon, G A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. a Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part II, Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, Cambridge, s. 28 – 65.

**B.15. TESTOVANIE MUTAGÉNNOSTI A SKRÍNING KARCINOGENNOSTI – SKÚŠKA NA GÉNOVÚ
MUTÁCIU U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Na zisťovanie vzniku génových mutácií indukovaných chemickými agensmi sa používa množstvo haploidných a diploidných kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* buď s metabolickou aktiváciou, alebo bez nej.

Môže sa použiť systém priamych mutácií v haploidných kmeňoch (*ade-1* alebo *ade-2*), ktoré sú červené a ďalšou mutáciou sa menia na dvojité biele mutanty, alebo selektívny systém, ako je indukcia rezistencie na kanavanín a cykloheximid.

Prevažne sa však používa overený systém reverzných mutácií s haploidným kmeňom XV 185-14C, ktorý nesie „ochre nonsense“ mutácie *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* a *trp 5-48*. Tieto mutácie sú reverzibilné bázovou substitúciou s použitím mutagénov, ktoré indukujú „site“ špecifické mutácie alebo „ochre“ supresorové mutácie. XV 185-14C nesie tiež *his 1-7* marker. Je to „missens“ mutácia, ktorá je väčšinou reverzibilná druhou „site“ mutáciou. Takisto nesie ďalší marker *hom 3-10*, ktorý je reverzibilný „frameshift“ mutagénmi.

Z diploidných kmeňov *S. cerevisiae* sa prevažne používa kmeň D₇, ktorý je homozygotný v *ilv 1-92*.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Roztoky testovaných chemikálií a kontroly by sa mali pripravovať tesne pred testovaním s použitím vhodných rozpúšťadiel. V prípade organických zlúčenín, ktoré nie sú rozpustné vo vode, malo by sa použiť organické rozpúšťadlo ako etanol, acetón alebo dimetylsulfoxid (DMSO), najviac 2 % roztok v/v. Výsledná koncentrácia rozpúšťadla by nemala výrazne ovplyvňovať životaschopnosť buniek a rastové parametre.

Metabolická aktivácia

Bunky by mali byť ovplyvnené testovanou látkou bez prítomnosti a s prítomnosťou vhodného exogénneho metabolického aktivačného systému.

Najbežnejšie používaný systém je postmitochondriálna frakcia z pečene hlodavcov doplnená kofaktormi, vopred ovplyvnená látkami indukujúcimi enzýmy. Na metabolickú aktiváciu môže byť vhodné použitie aj iných druhov, tkanív, postmitochondriálnych frakcií alebo iných postupov.

Podmienky testovania

Testovacie kmene

Pre testy génových mutácií je najpoužívanejší haploidný kmeň XV 185-14C a diploidný kmeň D₇. Vhodné môžu byť aj iné kmene.

Médiá

Pre stanovenie prežívania a počtu mutantov sa používajú vhodné kultivačné médiá.

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Súbežne by sa mali použiť pozitívne kontroly, neovplyvnené kontroly a kontroly s rozpúšťadlom. Pre každý špecifický typ mutácií by sa mala použiť vhodná chemikália ako pozitívna kontrola.

Koncentrácie vystavenia

Malo by sa použiť aspoň päť primerane odstupňovaných koncentrácií testovanej látky. Pri toxických látkach by nemala najvyššia testovaná koncentrácia znižovať prežívanie pod 5 % až 10 %. Látky relatívne nerozpustné vo vode by sa mali testovať až do hranice ich rozpustnosti s použitím vhodných metód. Pri netoxických látkach voľne rozpustných vo vode by sa mala najvyššia použitá koncentrácia stanoviť z prípadu na prípad.

Inkubačné podmienky

Platne sú inkubované štyri až sedem dní pri 28 °C a 30 °C v tme.

Frekvencia spontánnych mutácií

Mali by sa použiť monokultúry s frekvenciou spontánnych mutácií v prijateľnom rozsahu.

Počet opakovaní

Pri testovaní vzniku prototrofov génovou mutáciou a pre stanovenie prežívania buniek by sa mali použiť najmenej tri opakovania pre každú koncentráciu. V prípade experimentov používajúcich markery ako *hom* 3-10 s nízkou mutačnou frekvenciou sa množstvo použitých platní má zvýšiť tak, aby poskytovalo štatisticky významné údaje.

Postupy

Ovplyvňovanie *S. cerevisiae* sa bežne robí v tekutom prostredí s použitím stacionárnych alebo rastúcich buniek. Začiatkové experimenty by sa mali robiť na rastúcich bunkách: bunky s koncentráciou $1 - 5 \times 10^7$ /ml sú ovplyvnené testovanou chemikáliou maximálne 18 hodín pri 28 °C až 37 °C pri neustálom prevzdušňovaní; ak je potrebné, pridá sa počas experimentu primerané množstvo metabolického aktivátora. Na konci ovplyvnenia sú bunky zcentrifugované, premyté a vysiate na vhodné kultivačné médium. Po inkubácii sa platne vyhodnotia na prežívanie a indukciu génových mutácií. Ak je prvý experiment negatívny, v druhom experimente by sa mali použiť bunky stacionárnej fázy. Ak je prvý experiment pozitívny, malo by sa to potvrdiť vo vhodnom nezávislom experimente.

2. ÚDAJE

Údaje by sa mali prezentovať v tabuľke a udávať počet kolónií, počet mutantov, prežívania a frekvenciu mutantov. Všetky výsledky by sa mali potvrdiť v nezávislom experimente. Výsledky by sa mali vyhodnotiť vhodnou štatistickou metódou.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať tieto informácie:

- použité kmene,
- podmienky pri teste: rastúce bunky alebo bunky stacionárnej fázy, zloženie médií, trvanie inkubácie a inkubačnú teplotu, metabolický aktivačný systém,
- podmienky vystavenia: použité koncentrácie, metódy a čas vystavenia a teplotu pri vystavení, pozitívne a negatívne kontroly,
- spočítaný počet kolónií, počet mutantov, prežívanie a frekvencia mutantov, vzťah dávka/odpoveď ak je to reálne, štatistické vyhodnotenie údajov,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.16. MITOTICKÁ REKOMBINÁCIA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Mitotická rekombinácia v *Saccharomyces cerevisiae* môže byť detekovaná medzi génmi (alebo všeobecnejšie medzi génom a jeho centromérou) a vnútri génov. Prvý dej sa nazýva mitotický crossing-over a vytvára recipročné produkty, zatiaľ čo druhý dej je najčastejšie nerecipročný a nazýva sa génová konverzia. V crossing-overe je všeobecne hodnotené množstvo recesívne homozygotných kolónií alebo sektorov vzniknutých v heterozygotnom kmeni, zatiaľ čo v génovej konverzii je hodnotené množstvo prototrofných revertantov vzniknutých v auxotrofnom heteroalelickom kmeni, ktorý nesie dve rozdielne defektné alely v tom istom géne. Najbežnejšie používané kmene pre detekciu mitotickej génovej konverzie sú D₄ (heteroalelický v *ade 2* a *trp 5*), D₇ (heteroalelický v *trp 5*), BZ₃₄ (heteroalelický v *arg 4*) a JD1 (heteroalelický v *his 4* a *trp 5*). Mitotický crossing-over vytvárajúci červené a ružové homozygotné sektory môže byť testovaný v D₅ alebo v D₇, (v ktorom môžeme takisto detekovať mitotickú génovú konverziu a reverzné mutácie v *ilv 1-92*), oba kmene sú heteroalelické pre komplementáciu alel *ade 2*.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Roztoky testovaných chemikálií a kontroly alebo referenčné zlúčeniny by mali byť pripravované tesne pred testovaním s použitím vhodných rozpúšťadiel. V prípade organických zlúčenín, ktoré nie sú rozpustné vo vode, by sa malo použiť organické rozpúšťadlo ako etanol, acetón alebo dimetylsulfoxid (DMSO) nie viac ako 2 % roztok v/v. Výsledná koncentrácia rozpúšťadla by nemala výrazne ovplyvňovať životaschopnosť buniek a rastové parametre.

Metabolická aktivácia

Bunky by mali byť ovplyvnené testovanou látkou bez prítomnosti a s prítomnosťou vhodného exogénneho metabolického aktivačného systému. Najbežnejšie používaný systém je post-mitochondriálna frakcia z pečene hlodavcov doplnená kofaktormi vopred ovplyvnená látkami indukujúcimi enzýmy. Na metabolickú aktiváciu môže byť vhodné použitie aj iných druhov, tkanív, post-mitochondriálnych frakcií alebo iných postupov.

*Testovacie podmienky**Testovacie kmene*

Najviac používanými kmeňmi sú diploidy D₄, D₅, D₇ a JD1. Môžu sa použiť aj iné kmene.

Médiá

Na stanovenie prežívania a frekvencie mitotickej rekombinácie sa používajú vhodné kultivačné médiá.

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Súbežne by mali byť použité pozitívne, neovplyvnené kontroly a kontroly s rozpúšťadlom. Pre každý špecifický typ mutácií by sa mala použiť vhodná chemikália ako pozitívna kontrola.

Koncentrácie vystavenia

Malo by sa použiť aspoň päť primerane odstupňovaných koncentrácií testovanej látky. Medzi faktormi, ktoré treba brať do úvahy, je cytotoxicita a rozpustnosť. Najnižšia koncentrácia nemá mať efekt na životaschopnosť buniek. Pri toxických chemikáliách by nemala najvyššia testovaná koncentrácia znižovať prežívanie pod 5 až 10 %. Látky relatívne nerozpustné vo vode by mali byť testované až do hranice ich rozpustnosti použitím vhodných metód. Pri netoxických látkach voľne rozpustných vo vode by sa mala najvyššia použitá koncentrácia stanoviť z prípadu na prípad.

Bunky môžu byť vystavené testovanej chemikálii buď v stacionárnej fáze, alebo v rastovej fáze maximálne 18 hodín. Pri dlhšom vystavení by sa malo v kultúrach sledovať formovanie spór, prítomnosť ktorých znehodnocuje test.

Inkubačné podmienky

Platne sú inkubované štyri až sedem dní pri 28 – 30 °C v tme. Platne použité pre testovanie červených a ružových homozygotných sektorov vzniknutých mitotickým crossing-overom by mali byť po skončení experimentu držané v chladničke (okolo 4 °C) ďalšie jeden až dva dni pred vyhodnotením, čo umožní vytvorenie hodnotiteľných pigmentovaných kolónií.

Frekvencia spontánnej mitotickej rekombinácie

Mali by byť použité monokultúry s frekvenciou spontánnej mitotickej rekombinácie v prijateľnom rozsahu.

Počet opakovaní

Pri testovaní vzniku prototrofov mitotickou génovou konverziou a pre stanovenie prežívania buniek by mali byť použité najmenej tri opakovania pre každú koncentráciu. V prípade testovania recesívnych homozygotov vzniknutých mitotickým crossing-overom sa množstvo použitých platní má zvýšiť tak, aby poskytovalo primerané množstvo kolónií.

Postupy

Ovplyvňovanie *S. cerevisiae* sa bežne robí v tekutom prostredí použitím stacionárnych alebo rastúcich buniek. Začiatkové experimenty by sa mali robiť na rastúcich bunkách: bunky s koncentráciou $1 - 5 \times 10^7$ /ml sú vystavené testovanej chemikálii maximálne 18 hodín pri 28 až 37 °C pri neustálom prevzdušňovaní; ak je potrebné, pridá sa počas experimentu primerané množstvo metabolického aktivátora.

Na konci ovplyvnenia sú bunky zcentrifugované, premyté a vysiate na vhodné kultivačné médium. Po inkubácii sú platne vyhodnotené na prežívanie a indukciu mitotickej rekombinácie.

Ak je prvý experiment negatívny, v druhom experimente by sa mali použiť bunky stacionárnej fázy. Ak je prvý experiment pozitívny, malo by sa to potvrdiť vo vhodnom nezávislom experimente.

2. ÚDAJE

Údaje by mali byť prezentované v tabuľke a udávať počet kolónií, počet rekombinantov, prežívanie a frekvenciu rekombinantov.

Výsledky by mali byť potvrdené v nezávislom experimente.

Údaje by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou.

3. **SPRÁVA**

3.1. **SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať tieto informácie:

- použité kmene,
- podmienky pri teste: bunky stacionárnej fázy alebo rastúce bunky, zloženie médií, inkubačná teplota a trvanie inkubácie, metabolický aktivačný systém,
- podmienky ovplyvňovania: použité koncentrácie, metódy a trvanie ovplyvnenia, teplota pri ovplyvnení, pozitívne a negatívne kontroly,
- spočítaný počet kolónií, počet rekombinantov, prežívanie a frekvencia rekombinantov, vzťah dávka/odpoveď ak je to reálne, štatistické vyhodnotenie údajov,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. **VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.17. **MUTAGÉNNOSŤ – IN VITRO TEST MUTÁCIÍ GÉNOV BUNIEK CICAVCOV**1. **METODA**

Táto metóda je obdobou OECD TG 476, *in vitro* test mutácií génov buniek cicavcov (1997).

1.1. **ÚVOD**

In vitro test mutácií génov buniek cicavcov sa používa na zistenie mutácií vyvolaných chemickými látkami. Vhodné bunkové línie zahŕňajú L5178Y lymfómové (*lymphoma*) bunky myší, CHO, CHO-AS52 a V79 línie buniek čínskych morčiat a TK6 lymfoblastoidné bunky ľudí (1). V týchto bunkových liniách najbežnejšie používané genetické merania merajú mutácie na timidínovej kináze (TK) a hypoxantino-guanínovej fosforibosilovej transferáze (HPRT) a transgén xantínovo-guanínovej fosforibosylovej transferáze (XPRT). Testy mutácií TK, HPRT a XPRT zisťujú rôzne spektrum genetických udalostí. Autozomálna poloha TK a XPRT môže umožňovať zistenie genetických udalostí (napríklad: veľké vymazania), nezistené v mieste HPRT na X chromozómoch (2)(3)(4)(5)(6).

V *in vitro* teste mutácií génov buniek cicavcov sa používajú kultúry ujatých bunkových línií alebo bunkových kmeňov. Použité bunky sa vyberajú na základe rastovej schopnosti kultúry a stability frekvencie spontánnych mutácií.

Testy vykonávané *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Tento systém metabolickej aktivácie nemôže úplne napodobniť podmienky *in vivo* cicavcov. Je potrebná opatrnosť pri vyhýbaní sa podmienkam, ktoré by viedli k pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť. Pozitívne výsledky, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť, môžu pochádzať zo zmien pH, osmolality alebo vysokých hladín cytotoxicity (7).

Tento test sa používa na zistenie možných mutagénov a karcinogénov u cicavcov. Mnohé zmesi, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú pre cicavcov karcinogénmi, avšak neexistuje dokonalá korelácia medzi týmto testom a karcinogénnosťou. Korelácia závisí od triedy chemikálie a je stále viac dôkazov, že existujú karcinogény, ktoré tento test neodhalí, pretože pravdepodobne účinkujú prostredníctvom odlišných negenotoxických mechanizmov alebo mechanizmov neprítomných v bunkách baktérií (6).

Pozri tiež všeobecný úvod, časť B.

1.2. **DEFINÍCIE**

Predná mutácia: génová mutácia z rodičovského typu mutantných foriem, ktorá umožňuje zmenu alebo stratu enzymatickej aktivity funkcie kódovaného proteínu.

Mutagény substituujúce bázoové páry: látky, ktoré spôsobujú substitúciu jedného alebo viacerých bázoových párov v DNA.

Konstruktívne mutagény: sú činiteľmi, ktoré v molekule DNA spôsobujú prídanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých základných párov.

Doba fenotypického prejavu: obdobie, počas ktorého sú nezmenené génové produkty vyčerpané z novomutovaných buniek.

Mutačná frekvencia: pozorovaný počet mutantných buniek delený počtom životaschopných buniek.

Relatívny celkový rast: zvýšenie počtu buniek v čase v porovnaní s kontrolnou populáciou buniek; vypočítava sa ako výsledok rastu suspenzie v pomere k času negatívnej kontrolnej kultúry krát klonovacia efektívnosť v pomere k negatívnej kontrolnej kultúre.

Relatívny suspenzný rast: zvýšenie počtu buniek v porovnaní s časom prejavu v pomere k negatívnej kontrolnej kultúre.

Životaschopnosť: klonovacia efektívnosť ošetrovaných buniek v čase umiestnenia na misky v selektívnych podmienkach po čase prejavu.

Prežitie: klonovacia efektívnosť ošetrovaných buniek pri umiestnení na misky na konci doby podávania; prežitie sa obvyčajne vyjadruje v pomere k prežitiu populácie kontrolných buniek.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Bunky s nedostatkom tymidínovej kinázy (TK) z dôvodu mutácie TK^{+/+} → TK^{-/-} sú odolné voči cytotoxickým účinkom pyrimidínovej obdoby trifluorotymidínu (TFT). Bunky s dostatkom tymidínovej kinázy sú citlivé na TFT, ktorý spôsobuje inhibíciu bunkového metabolismu a zastavuje ďalšie delenie buniek. Tieto mutantné bunky sú schopné rozširovať sa za prítomnosti TFT, zatiaľ čo normálne bunky, ktoré obsahujú tymidínovú kinázu, nie sú. Podobne aj bunky s nedostatkom HPRT alebo XPRT sa vyberajú podľa odolnosti voči 6-thioguanínu (TG) alebo 8-azaguanínu (AG). Vlastnosti testovacej látky je potrebné zvážiť v prípadoch, keď sa bazová obdoba alebo zlúčenina príbuzná so selektívnym činidlom testujú v akýchkoľvek testoch mutácií génov buniek cicavcov. Potrebné je napríklad preskúmať akúkoľvek predpokladanú selektívnu toxicitu testovacej látky pre mutantné a nemutantné bunky. Pri testovaní chemikálií štrukturálne príbuzných so selektívnym činidlom je preto nutné overiť výkon selektívneho systému/čidla (8).

Bunky v suspenzii alebo jednovrstvovej kultúre sa vystavia testovacej látke s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie na vhodnú dobu a subkultivujú sa na stanovenie cytotoxicity a na umožnenie fenotypického prejavu pred mutantnou selekciou (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxicita sa zvyčajne stanovuje meraním relatívnej klonovacej efektívnosti (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu kultúr po dobe podávania. Ošetrované kultúry sa vhodnú dobu, charakteristickú pre každý vybraný lokus a typ buniek, udržiavajú v rastovom médiu, čo umožní takmer optimálny fenotypický prejav indukovaných mutácií. Mutačná frekvencia sa stanovuje zasadením známeho počtu buniek do média obsahujúceho selektívne činidlo na zistenie mutantných buniek a do média bez selektívneho čidla na stanovenie klonovacej efektívnosti (životaschopnosti). Po vhodnej inkubačnej dobe sa kolónie zrátajú. Mutačná frekvencia sa odvodzuje od počtu mutantných kolónií v selektívnom médiu a počtu kolónií v neselektívnom médiu.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Bunky*

Pre použitie v tomto teste sú dostupné rôzne bunkové typy, vrátane subklonov buniek L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 alebo TK6. Typy buniek použité v tomto teste majú preukázanú citlivosť na chemické mutagény, vysokú klonovacuú efektívnosť a stabilnú frekvenciu spontánnych mutácií. Bunky sa kontrolujú na kontamináciu mykoplasmozou a pri jej zistení sa nepoužívajú.

Test by sa mal formulovať tak, aby mal vopred určenú citlivosť a silu. Počet použitých buniek, kultúr a koncentrácií testovacej látky odráža tieto definované parametre (14). Minimálny počet životaschopných buniek, ktoré prežijú podávanie a ktoré sa použijú v každom štádiu testu, je založený na frekvencii spontánnych mutácií. Všeobecným pravidlom je použiť počet buniek, ktorý je najmenej 10-krát taký veľký, ako prevrátená hodnota frekvencie spontánnych mutácií. Odporúča sa však použiť najmenej 10⁶ buniek. Na znázornenie konzistentného výkonu testu by mali byť dostupné historické údaje o používanom systéme buniek

1.4.1.2. *Médiá a podmienky kultúr*

Používajú sa príslušné médiá a inkubačné podmienky (nádoby, koncentrácia CO₂, teplota a vlhkosť). Médiá sa vyberajú podľa selektívnych systémov a typu buniek použitých počas testu. Osobitne dôležité je zvoliť podmienky kultúr tak, aby bol zabezpečený optimálny rast buniek počas obdobia prejavu a schopnosť formovania kolónií mutantných aj nemutantných buniek.

1.4.1.3. *Príprava kultúr*

Bunky sa odoberajú z kultúr vysadených v médiu a inkubovaných pri teplote 37 °C. Pred použitím v tomto teste sa kultúry podľa potreby prečistia od existujúcich mutantných buniek.

1.4.1.4. *Metabolická aktivácia*

Bunky sa vystavia testovacej látke za prítomnosti aj za neprítomnosti vhodného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9) pripravená z pečene hlodavcov a ošetrovaná prípravkami na indukciu enzýmov ako napríklad Aroclorom 1254 (15) (16) (17) (18) alebo kombinácia fenobarbitonu a beta-naftoflavónu(19)(20).

Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1 – 10 % v/v v konečnom testovacom médiu. Výber a stav systému metabolickej aktivácie závisí od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch je vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie.

Množstvo situácií, vrátane vytvorenia geneticky vypestovaných bunkových línií vyjadrujúcich špecifické aktivačné enzýmy, môže poskytnúť potenciál pre endogénnu aktiváciu. Výber použitých bunkových línií sa vedecky zdôvodňuje (napríklad: relevantnosťou cytochrómového P450 izoenzymu pre metabolizmus testovacej látky).

1.4.1.5. *Príprava testovacej látky*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a rozriedujú, ak je to potrebné pred ošetrovaním buniek. Kvapalné testovacie látky môžu byť pridané priamo do testovacích systémov a/alebo rozriedené pred ošetrovaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepokazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní látok vo vode nestálych by organické rozpúšťadlá nemali obsahovať vodu. Vodu je možné odstrániť pridaním molekulárneho sitka.

1.4.2.2. *Koncentrácie*

Medzi kritériá, ktoré treba zvážiť pri určovaní najvyššej koncentrácie, patria cytotoxicita, rozpustnosť v testovacom systéme a zmeny pH alebo osmolality.

Cytotoxicita sa stanovuje s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie pri hlavnom pokuse s použitím príslušného označenia integrity a rastu buniek, ako napríklad relatívnej klonovacej efektívnosti (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu. Užitočné je stanovenie cytotoxicity a rozpustnosti v predbežnom pokuse.

Používať by sa mali najmenej štyri analyzovateľné koncentrácie. Pri výskyte cytotoxicity tieto koncentrácie pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu; toto zvyčajne znamená, že koncentrácie sú oddelené nie viac ako jedným koeficientom medzi 2 a $\sqrt{10}$. Ak je najvyššia koncentrácia založená na cytotoxicite, jej výsledkom je približne 10 – 20 % (avšak nie menej ako 10 %) relatívneho prežitia (relatívna klonovacia efektívnosť) alebo relatívneho celkového rastu. Pre relatívne necytotoxické látky sú maximálne testovacie koncentrácie 5 mg/ml, 5 μ l/ml alebo 1,01 M, podľa toho, ktorá je najnižšia.

Relatívne nerozpustné látky sa testujú po limit rozpustnosti v podmienkach kultúry. V konečnom médiu, ktorému sú bunky vystavené, sa stanovujú dôkazy nerozpustnosti. Užitočné je odhadnúť rozpustnosť na začiatku a na konci podávania, keďže rozpustnosť sa môže zmeniť počas priebehu vystavenia v testovacom systéme kvôli prítomnosti buniek, séra S9 atď. Nerozpustnosť sa zisťuje voľným okom. Zrazenina hodnoteniu neprekáža.

1.4.2.3. *Kontrolné kultúry*

Pri každom pokuse sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadla alebo nosiča) kontrolné kultúry s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie. Pri použití metabolickej aktivácie by pozitívna kontrolná kultúra mala byť tá, pri ktorej sa na vznik mutagénnej reakcie vyžaduje aktivácia.

Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú kultúru:

Stav metabolickej aktivácie	Miesto	Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
nepriítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	HPRT	etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7
		etylnitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
	TK (malé a veľké kolónie)	metylmotánsulfonát	66-27-3	200-625-0
	XPRT	etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7
		etylnitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
prítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	HPRT	3 -metylcholanthrén	56-49-5	200-276-4
		N-nitrozodimetylamin	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimetylbenzanthracén	57-97-6	200-359-5
	TK (malé a veľké kolónie)	cyklofosamid	50-18-0	200-015-4
		monohydrát cyklofosfamidu	6055-19-2	
		benzo[a]pyrén	50-32-8	200-028-5
		3-metylcholanthrén	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrozodimetylamin (pre vysoké dávky S9)	62-75-9	200-549-8
		benzo[a]pyrén	50-32-8	200-028-5

Na pozitívnu kontrolnú kultúru sa môžu použiť aj iné vhodné látky, napríklad: ak laboratórium má historickú databázu o 5-bromo 2'-deoxyuridíne (CAS č. 59-14-3, EINECS č. 200-415-9), použije sa aj táto referenčná látka. Podľa dostupnosti sa tiež zväži použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v triede príbuzných chemikálií.

Použijú sa negatívne kontrolné kultúry, pozostávajúce iba zo samotného rozpúšťadla alebo nosiča v médiu, a ošetrované rovnakým spôsobom ako ošetrované kultúry. Použijú sa aj neošetrované kontrolné kultúry, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne škodlivé alebo mutagénne efekty.

1.4.3. Postup

1.4.3.1. Podávanie testovacej látky

Rozširujúce sa bunky sa exponujú testovacej látke s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie. Exponovanie trvá vhodnú dobu (efektívnych je zvyčajne 3-6 hodín). Doba expozície sa môže predĺžiť počas jedného alebo viacerých bunkových cyklov.

Pri každej testovanej koncentrácii sa môžu použiť duplicitné alebo jednotlivé ošetrované kultúry. Pri použití jednotlivých kultúr sa počet koncentrácií zvýši na zabezpečenie primeraného počtu kultúr na analýzu (napríklad: minimálne 8 analyzovateľných koncentrácií). Používajú sa duplicitné negatívne (s rozpúšťadlom) kontrolné kultúry.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú príslušnými metódami, ako napríklad vo vzduchotesne uzavretých nádobách (21),(22).

1.4.3.2. Meranie prežitia, životaschopnosti a mutačnej frekvencie

Na konci expozičného obdobia sa bunky očistia a kultivujú na stanovenie prežitia a na umožnenie prejavu mutantného fenotypu. Meranie cytotoxicity stanovením relatívnej klonovacej frekvencie (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu kultúr sa zvyčajne uskutoční po dobe podávania.

Každé miesto má definovanú požiadavku na minimálnu dobu na umožnenie takmer optimálneho fenotypického prejavu novoindukovaných mutantov (HPRT a XPRT vyžadujú najmenej 6 – 8 dní a TK najmenej 2 dni). Bunky rastú v médiu so selektívnym činidlom aj bez selektívneho činidla/činiteľov na stanovenie počtu mutantov a klonovacej efektívnosti. Meranie životaschopnosti (používa sa na výpočet mutačnej frekvencie) sa uskutočňuje na konci obdobia prejavu umiestnením na misky s neselektívnym médiom.

Ak je testovacia látka v L5178Y TK⁺ teste pozitívna, meranie veľkosti kolónie sa uskutoční minimálne na jednej testovanej kultúre (najvyššia pozitívna koncentrácia) a na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Ak je testovacia látka v L5178Y TK⁺ teste negatívna, meranie veľkosti kolónie sa uskutoční na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Meranie kolónií sa tiež môže uskutočniť pri štúdiách používajúcich TK6TK⁺.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje zahŕňajú stanovenie cytotoxicity a životaschopnosti, počet kolónií a mutačné frekvencie pre ošetrované a kontrolné kultúry. V prípade pozitívnej reakcie v teste L5178TK⁺ sa kolónie hodnotia použitím kritérií malých a veľkých kolónií na najmenej jednej koncentrácii testovacej látky (najvyššia pozitívna koncentrácia) a na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Podrobne bola preskúmaná molekulárna a cytogenetická povaha veľkých a malých kolónií mutácií (23), (24). V teste TK⁺ sa kolónie hodnotia použitím kritérií pre kolónie s normálnym rastom (veľké) a pomalým rastom (malé) (25). Mutantné bunky, ktoré utrpeli najväčšie genetické poškodenie, majú predĺžené časy delenia, a preto tvoria malé kolónie. Toto poškodenie je zvyčajne v rozsahu od straty celého génu po karyotypicky viditeľné chromozómové odchýlky. Vznik mutovaných malých kolónií sa spája s chemikáliami, ktoré indukujú veľké chromozómové odchýlky (26). Menej vážne ovplyvnené mutantné bunky rastú rýchlosťou podobnou ako rodičovské bunky a tvoria veľké kolónie.

Uvádza sa prežitie (relatívna klonovacia efektívnosť) alebo relatívny celkový rast. Mutačná frekvencia sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na počet prežitých buniek.

Uvádzajú sa údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa tiež sumarizujú v tabuľkovej forme.

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasnej pozitívnej reakcie. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním najmä využitím modifikácie pokusných podmienok. Negatívne výsledky sa musia potvrdiť z prípadu na prípad. V prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, poskytnú sa zdôvodnenie. Modifikácia parametrov štúdie na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa posudzuje pri následných pokusoch, a to buď pri nejasných alebo negatívnych výsledkoch. Parametre štúdie, ktoré sa môžu modifikovať, zahŕňajú koncentráciu a podmienky metabolickej aktivity.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast spojený s koncentráciou alebo reprodukovateľný nárast mutačnej frekvencie. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy. Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu.

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybiteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu. Pozitívne výsledky *in vitro* testu mutácií génov buniek cicavcov naznačujú, že testovacia látka vyvoláva génové mutácie v použitých kultúrach buniek cicavcov. Najdôležitejšou je reprodukovateľná pozitívna reakcia na koncentráciu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje génové mutácie v použitých kultúrach buniek cicavcov.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie voľby nosiča,
- rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

- typ a zdroj buniek,
- počet bunkových kultúr,
- počet bunkových prechodov, ak je to vhodné,
- metódy udržiavania bunkovej kultúry, ak je to vhodné,
- neprítomnosť mykoplazmy.

Podmienky testov:

- zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,
- skladba média, koncentrácia CO₂,
- koncentrácia testovacej látky,
- objem nosiča a pridanej testovacej látky,
- inkubačná teplota,
- inkubačná doba,
- trvanie podávania,
- hustota buniek pri vysádzaní,
- typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,
- pozitívne a negatívne kontrolné kultúry,
- dĺžka obdobia prejavu (vrátane počtu vysadených buniek, subkultúr a harmonogramov kŕmenia, ak je to vhodné),
- selektívne činidle,
- kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné,

- metódy použité na stanovenie počtu životaschopných a mutantných buniek,
- definícia kolónií, hodnotí sa veľkosť a typ (vrátane kritérií na „malé“ a „veľké“, ak je to vhodné).

Výsledky:

- známky toxicity,
- známky zrážania,
- údaje o pH a osmolalite počas vystavenia testovacej látke, ak sú stanovené,
- veľkosť kolónie, ak sa hodnotí, prinajmenšom pre negatívne a pozitívne kontrolné kultúry,
- primeranosť laboratória na zistenie malých mutantných kolónií so systémom L5178TK^{+/−}, ak je to vhodné,
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť,
- štatistické analýzy, ak existujú,
- súčasné údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre,
- historické údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre, s rozsahmi, modulusmi a štandardnými odchýlkami,
- mutačná frekvencia.

Rozbor výsledkov

Záver

4. LITERATÚRA

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E.H.Y. and 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, 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, 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, 394 – 403.
- (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, 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, 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, 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, 225 – 251.
- (9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, I.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 Protection Agency Gene – Tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17 – 36.
- (10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, L.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, 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, 9 – 17.
- (12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191 – Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191 – Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133 – 147.
- (13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK⁺/– TK⁺/– Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239 – 268.
- (14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66 – 101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6 – Thioguanine – Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse – Liver Microsome – Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 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, 347 – 364.
- (17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK⁺/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61 – 108.
- (18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 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, 175 – 177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North – Holland, pp. 85 – 88.
- (21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91 – 103.
- (22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation

Assay. Environmental Mutagenesis, 5, 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, 51 – 55.
- (24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine – Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK^{+/+} Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 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, 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, 609 – 614.

B. 18. **POŠKODENIE A OPRAVA DNA – NEPROGRAMOVANÁ SYNTÉZA DNA – BUNKY CICAFCOV IN VITRO**

1. **METÓDA**

1.1. **ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **DEFINÍCIA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. **REFERENČNÉ LÁTKY**

Žiadne.

1.4. **PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY**

Test neprogramovanej syntézy DNA (UDS) meria reparačnú syntézu DNA po vyštípení a odstránení úseku DNA, ktorý obsahuje oblasť poškodenia vyvolaného chemickými a fyzikálnymi agensmi. Test je založený na inkorporácii tymidínu značeného tri ciom (^3H -TdR) do DNA buniek cicavcov, ktoré sa nenachádzajú v S fáze bunkového cyklu. Príjem ^3H -TdR sa môže determinovať autorádiografiou alebo meraním DNA z ovplyvnených buniek v scintilačnej kvapaline (LSC). Cicavčie bunky v kultúre, pokiaľ sa nepoužívajú primárne hepatocyty potkanov, sa ovplyvňujú testovaným agensom v prítomnosti, ako aj neprítomnosti exogénneho metabolického aktivačného systému. UDS sa tiež môže merať v *in vivo* systémoch.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Žiadne.

1.6. **OPIS TESTOVACEJ METÓDY**

Príprava

Testované chemikálie a kontrolné alebo odporúčané látky by sa mali pripraviť v rastovom médiu alebo rozpustiť, alebo rozsuspendovať vo vhodnom nosiči, a potom ďalej rozriediť v rastovom médiu na použitie v skúšobnom teste. Konečná koncentrácia nosiča by nemala ovplyvňovať životaschopnosť buniek.

V skúšobnom teste sa môžu použiť primárne kultúry potkaních hepatocytov, ľudských lymfocytov alebo stabilných bunkových línií (napr. ľudských diploidných fibroblastov).

Bunky sa vystavujú pôsobeniu testovanej chemikálie tak v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému.

Testovacie podmienky

Počet kultúr

Pre každý krok experimentu sa používajú minimálne dve bunkové línie na autorádiografiu a šesť kultúr (alebo menej, ak je to vedecky overené) na stanovenie UDS pomocou LSC.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Ku každému experimentu sa pripájajú súbežné pozitívne a negatívne (neovplyvnené vzorky a/alebo vzorka s nosičom) kontroly s alebo bez metabolickej aktivácie.

Príklady pozitívnych kontrol pre test potkaních hepatocytov zahŕňajú 7,12-dimetylbenzantracén (7,12-DMBA) alebo 2-acetylaminofluorén (2-AAF). V prípade stabilných bunkových línií je príkladom pozitívnej kontroly 4-nitrochinolín-N-oxid (4-NQO) ako pre autorádiografický, tak aj pre LSC test vykonaný bez metabolickej aktivácie; N-dimetylnitrozamín je príkladom pozitívnej kontrolnej zlúčeniny, ak sa používa metabolický aktivačný systém.

Koncentrácie vystavenia

Používajú sa mnohonásobné koncentrácie testovanej látky v rozsahu primeranom na definovanie odpovede. Najvyššia koncentrácia by mala vyvolať určité cytotoxické účinky. Vo vode ťažko rozpustné zlúčeniny by sa mali testovať až do hranice rozpustnosti. V prípade vo ľahko vode rozpustných netoxických chemikálií sa horná koncentrácia testovanej chemikálie určuje od prípadu k prípadu.

Bunky

Na udržiavanie kultúr musia byť použité vhodné rastové médiá, koncentrácia CO₂, teplota a vlhkosť. Stabilné bunkové línie sa periodicky kontrolujú na kontamináciu mykoplazmou.

Metabolická aktivácia

Metabolický aktivačný systém sa nepoužíva v kultúrach primárnych hepatocytov. Stabilné bunkové línie a lymfocyty sa vystavia testovanej látke tak v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému.

Postup

Príprava kultúr

Stabilné bunkové línie sa získajú zo zásobnej kultúry (napr. trypsinizáciou alebo pretrepávaním), naočkujú do kultivačných nádob v primeranej hustote a inkubujú pri 37 °C.

Krátkodobé kultúry potkaních hepatocytov sa získajú tak, že čerstvo disociovaným hepatocytom sa umožní vo vhodnom médiu pripevniť sa na rastový povrch.

Kultúry ľudských lymfocytov sa zakladajú s použitím primeranej techniky.

Vystavenie kultúr testovanej látke

Primárne potkanie hepatocyty

Čerstvo izolované hepatocyty potkanov sa vystavia testovanej látke v médiu obsahujúcom ³H-TdR počas primeraného časového intervalu. Na konci obdobia vystavenia sa bunky zbavia média, potom premyjú, fixujú a vysušia. Sklíčka sa ponoria do autorádiografickej emulzie (prípadne sa môže použiť „stripping“ film), exponujú, vyvolajú, farbía a spočítajú.

Stabilné bunkové línie a lymfocyty

Autorádiografické techniky: Bunkové kultúry sa ovplyvňujú testovanou látkou na primeraný čas, po ktorom nasleduje ovplyvnenie s ³H-TdR. Časy ovplyvnenia sa určia povahou látky, aktivitou metabolických systémov a typom buniek. Na určenie vrcholu UDS sa pridáva ³H-TdR buď súčasne s testovanou látkou, alebo počas niekoľkých minút po vystavení testovanej látke. Výber medzi týmito dvoma postupmi bude ovplyvnený možnými interakciami medzi testovanou látkou a ³H-TdR. Na odlíšenie UDS od semikonzervatívnej replikácie DNA sa môže táto inhibovať, napríklad použitím arginín-deficitného média, nízkeho obsahu séra alebo pomocou hydroxyurei v kultivačnom médiu.

LSC meranie UDS: Pred ovplyvnením testovanou látkou sa vyššie opísaným spôsobom blokuje vstup buniek do S fázy; bunky sa potom vystavia testovanej chemikálii spôsobom opísaným pri autorádiografii. Na konci inkubačnej doby sa z buniek izoluje DNA a stanoví sa celkový obsah DNA a množstvo inkorporovaného ³H-TdR.

Je potrebné pripomenúť, že pri použití ľudských lymfocytov vo vyššie opísanej technike sa nevyžaduje potlačenie semikonzervatívnej replikácie DNA v nestimulovaných bunkách.

*Analýza**Autorádiografické stanovenia*

Pri stanovení UDS v bunkách kultúry sa nezapočítavajú jadrá v S fáze. Počíta sa minimálne 50 buniek na koncentráciu. Sklíčka sa musia pre počítanie označiť. Na každom sklíčku je potrebné počítať niekoľko ďaleko od seba uložených, samostatných náhodných polí. Úroveň začlenenia ^3H -TdR v cytoplazme by sa mala určiť zrátaním oblastí trojnásobnej veľkosti jadra v cytoplazme každej rátanej bunky.

Stanovenie LSC

Pri stanovení UDS pomocou LSC sa používa primeraný počet kultúr pre každú koncentráciu a v kontrolách.

Všetky výsledky je potrebné potvrdiť v nezávislom experimente.

2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek.

2.1. AUTORÁDIOGRAFICKÉ STANOVENIA

Rozsah inkorporácie ^3H -TdR do cytoplazmy a množstvo zŕn nájdených v bunkovom jadre sa zaznamenávajú osobitne.

Priemer, medián a modus sa môžu použiť na opis distribúcie rozsahu inkorporácie ^3H -TdR do cytoplazmy a množstva granúl na jadro.

2.2. STANOVENIA LSC

Na stanovenie LSC sa inkorporácia ^3H -TdR udáva dpm/ μg DNA. Na opis rozdelenia inkorporácie sa môže použiť priemerná hodnota dpm/ μg DNA so štandardnou odchýlkou.

Dáta sa hodnotia pomocou vhodných štatistických metód.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

- použité bunky, hustota a číslo pasážovania v čase vystavenia, počet bunkových kultúr,
- metódy používané na udržiavanie bunkových kultúr zahŕňajúce živnú pôdu, teplotu a koncentráciu CO_2 ,
- testovanú látku, nosič, koncentrácie a podklady pre výber použitých koncentrácií v teste,
- podrobnosti o metabolických aktivačných systémoch,
- rozvrh ovplyvnenia,
- pozitívne a negatívne kontroly,
- použité autorádiografické metódy,

- postupy použité na zablokovanie vstupu buniek do S fázy,
- postupy na extrakciu DNA a stanovenie celkového obsahu DNA pri určení LSC,
- ak je to možné, vzťah dávka/efekt,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.19. TEST VÝMENY SESTERSKÝCH CHROMATÍD *IN VITRO*

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test výmeny sesterských chromatíd (SCE) je krátkodobý test na určenie recipročnej výmeny DNA medzi dvomi sesterskými chromatídami duplikovaných chromozómov. SCE predstavuje výmenu produktov DNA replikácie v zdanlivo homo logických lokusoch. Proces výmeny pravdepodobne zahŕňa zlom DNA a znovuspojenie, hoci o jeho molekulárnom mechanizme existuje málo poznatkov. Stanovenie SCE vyžaduje niektoré techniky odlišne značených sesterských chromatíd, čo sa dá dosiahnuť inkorporáciou brómdeoxyuridínu (BrdU) do chromozomálnej DNA počas dvoch bunkových cyklov.

Ak je to vhodné, cicavčie bunky sa *in vitro* vystavia testovanej chemikálii tak v prítomnosti ako aj v neprítomnosti cicavčieho exogénneho metabolického aktivačného systému a inkubujú sa počas dvoch kôl replikácie v médiu obsahujúcom BrdU. Po ovplyvnení inhibítorom deliaceho vretienka (napr. kolchicínom), s cieľom nahromadenia buniek v štádiu podobnom metafáze mitózy (c-metáfaza), sa bunky zozbierajú a vykoná sa izolácia chromozómov.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

- Primárne kultúry (ľudské lymfocyty) alebo stabilné bunkové línie (napr. bunky vaječníkov čínskeho škrečka) sa používajú v teste. Bunkové línie sa musia kontrolovať na kontamináciu mykoplazmou.
- Používajú sa vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky (napr. teplota, kultivačné nádoby, koncentrácia CO₂ a vlhkosť).
- Pred vystavením buniek môžu byť testované látky pripravené v kultivačnom médiu alebo rozpustené, alebo rozsuspendované vo vhodnom nosiči. Konečná koncentrácia nosiča v kultivačnom systéme by nemala významne ovplyvňovať životaschopnosť buniek alebo rýchlosť rastu a vplyvy na frekvenciu SCE sa musia monitorovať kontrolou s rozpúšťadlom.
- Bunky sa vystavujú testovanej látke ako v prítomnosti, tak i v neprítomnosti exogénneho cicavčieho metabolického aktivačného systému. Ak sa eventuálne používajú typy buniek s endogénnou metabolickou aktivitou, miera a podstata aktivity by mala byť primeraná testovanej triede chemikálií.

1.6.2. *Testovacie podmienky*

Počet kultúr

Pre každý bod experimentu sa musia použiť minimálne zdvojené kultúry.

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Do každého experimentu by sa mali zahrnúť pozitívne kontroly využívajúce priamo pôsobiace zlúčeniny, ako aj zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu; tiež sa musí použiť nosičová kontrola.

Nasledujú príklady látok, ktoré sa môžu použiť ako pozitívna kontrola:

- priamo pôsobiaca zlúčenina,
 - etylmetánsulfonát,
- nepriamo pôsobiaca zlúčenina,
 - cyklofosamid.

V prípade, že je to vhodné, môže sa zahrnúť ďalšia pozitívna kontrola rovnakej chemickej triedy ako testovaná chemikália.

Expozičné koncentrácie

Mali by sa použiť minimálne tri zodpovedajúce rozložené koncentrácie testovanej látky. Najvyššia koncentrácia by mala vyvolať významný toxický účinok, ale napriek tomu musí umožniť uskutočnenie bunkového delenia. Vo vode ťažko rozpustné látky by sa mali testovať až do hranice rozpustnosti použitím vhodných procedúr. Pre ľahko rozpustné netoxické látky by horná koncentrácia testovanej látky mala byť určená od prípadu k prípadu.

1.6.3. Postup

Príprava kultúr

Stabilné bunkové línie sa získajú zo zásobnej kultúry (napr. trypsinizáciou alebo pretrepávaním), naočkujú do kultivačnej nádoby v primeranej hustote a inkubujú pri 37 °C. Pri monovrstvových kultúrach sa počet buniek v kultivačnej nádobe prispôbi tak, aby kultúry v období zberania neboli splynuté na viac ako 50 %. Bunky sa prípadne môžu použiť v suspenznej kultúre. Kultúry ľudských lymfocytov sa zakladajú z heparinizovanej krvi pri použití primeraných techník a inkubujú pri 37 °C.

Vystavenie

Bunky v exponenciálnej fáze rastu sa vystavia testovanej látke na vhodnú dobu; vo väčšine prípadov môžu byť účinné jednu až dve hodiny, ale v niektorých prípadoch sa môže čas vystavenia predĺžiť až na dva úplné bunkové cykly. Bunky bez dostatočnej endogénnej metabolickej aktivity by sa mali vystaviť testovanej chemikálii v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Na konci fázy vystavenia sa bunky premyjú a zbavia testovanej látky a kultivujú na dve kolá replikácie v prítomnosti BrdU. Ako alternatívny postup môžeme bunky vystaviť súčasne testovanej látke a BrdU na celý kultivačný čas dvoch cyklov.

Kultúry ľudských lymfocytov sa vystavia, pokiaľ sa nachádzajú v semisynchrónnych podmienkach.

Bunky sa analyzujú počas ich druhého delenia po vystavení tak, aby sa zaručilo, že väčšina citlivých fáz bunkového cyklu bola vystavená chemikálii. Všetky kultúry, ku ktorým je pridaný BrdU, sa musia spracovávať až do zberania buniek v tme alebo pri tlmenom osvetlení zo žiarivkových lúčov tak, aby sa minimalizovala fotolýza DNA obsahujúcej BrdU.

Zberanie buniek

Bunkové kultúry sa vystavia inhibítorom deliaceho vretienka (napr. kolchicínom) na jednu až štyri hodiny pred zberom. Každá kultúra sa samostatne zozbiera a spracuje na izoláciu chromozómov.

Izolácia chromozómov a farbenie

Izolácia chromozómov sa vykoná štandardnými cytogenetickými postupmi. Farbenie sklíčok na dôkaz SCE sa môže vykonať niekoľkými postupmi (napr. fluorescencia plus Giemsova metóda).

Analýza

Počet analyzovaných buniek by sa mal zakladať na spontánnej kontrolnej frekvencii SCE. Zvyčajne sa na výskyt SCE analyzuje minimálne 25 dobre rozprestrených metafáz na kultúru. Sklídka sa pred analýzou označia. V ľudských lymfocytoch sa analyzujú iba metafázy obsahujúce 46 centromér. V stabilných bunkových líniiach sa analyzujú iba metafázy obsahujúce ± 2 centroméry zvyčajného počtu. Je potrebné stanoviť, či je, alebo nie je zarátaná zmena farieb v oblasti centromér ako SCE. Výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek. Počet SCE pre každú metafázu a počet SCE pre chromozóm každej metafázy sa uvedie osobitne pre všetky ovplyvnené a kontrolné kultúry.

Údaje by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

- použité bunky, metódy na udržiavanie bunkových kultúr,
- testovacie podmienky: zloženie živných pôd, koncentrácia CO₂, koncentrácia testovanej látky, použitý nosič, inkubačná teplota, čas ovplyvnenia, použitý inhibítor deliaceho vretienka, jeho koncentrácia a trvanie ovplyvnenia, typ použitého cicavčieho aktivačného systému, pozitívnu a negatívnu kontrolu,
- počet bunkových kultúr na každý krok experimentu,
- podrobnosti o technikách použitých na preparáciu sklíčok,
- počet analyzovaných metafáz (údaje dané samostatne pre každú kultúru),
- priemerný počet SCE na bunku a na chromozóm (údaje dané samostatne pre každú kultúru),
- kritéria pre určovanie SCE,
- podklady pre výber dávok,
- ak je možné, vzťah dávka/efekt,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.20. **TEST NA ZACHYTENIE RECESÍVNYCH LETÁLNYCH MUTÁCIÍ VIAZANÝCH NA POHLAVIE PRI *DROSOPHILA MELANOGASTER***

1. **METÓDA**

1.1. **ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **DEFINÍCIA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. **REFERENČNÉ LÁTKY**

Žiadne.

1.4. **PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY**

Test na zachytenie recesívnych letálnych mutácií viazaných na pohlavie (SLRL) využívajúci *Drosophila melanogaster* zisťuje výskyt mutácií, bodových mutácií aj malých delécií v zárodočných líniiach tohto hmyzu. Tento test je testom na priame mutácie, ktorý umožňuje skrining mutácií v približne 800 lokusoch na X-chromozóme; toto reprezentuje okolo 80 % všetkých lokusov X-chromozómu. X-chromozóm predstavuje približne jednu pätinu celého haploidného genómu.

Mutácie na X-chromozóme *Drosophila melanogaster* sa fenotypovo exprimujú u samčích nosičov mutantného génu. Ak je letálna mutácia v hemizygotných podmienkach, jej prítomnosť sa vyvodzuje z neprítomnosti jednej triedy z dvoch tried samčích potomkov, ktoré sa normálne vytvárajú z heterozygotnej samičky. SLRL test využíva výhody tohto faktu prostredníctvom špeciálne označených a upravených chromozómov.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Žiadne.

1.6. **OPIS TESTOVACEJ METÓDY**

Príprava

Línie

Používajú sa samce dobre charakterizovanej štandardnej línie a samičky línie Muller-5. Použiť sa môžu aj iné vhodne označené samičie línie s mnohonásobne invertovanými X-chromozómami.

Testovaná látka

Testované látky sa musia rozpustiť vo vode. Látky, ktoré nie sú rozpustné vo vode, sa môžu rozpustiť alebo rozsuspenderovať vo vhodnom nosiči (napr. zmesi etanolu a Tween-60 alebo 80) a pred podávaním rozriediť vo vode alebo v roztoku soli. Ako nosič by sa nemal použiť dimetylsulfoxid (DMSO).

Počet zvierat

Test by sa mal zostaviť s vopred určenou citlivosťou a silou. Na počet ovplyvnených chromozómov, ktorý sa musí analyzovať, bude výrazne vplývať spontánna mutačná frekvencia pozorovaná vo vhodnej kontrole.

Spôsob podávania

Vystavenie sa môže uskutočniť orálne, injekciou alebo prostredníctvom vystavenia plynom alebo parám. Podávanie testovanej látky kŕmením sa môže uskutočniť pridaním látky do cukrového roztoku. Ak je to nutné, látky sa môžu rozpustiť v 0,7 % NaCl roztoku a injekciou vpraviť do hrude alebo do bruška.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Do testu by sa mala zahrnúť negatívna (nosič) a pozitívna kontrola. Ak sú však dostupné vhodné laboratórne údaje o kontrolách z minulosti, nie je potrebná žiadna súbežná kontrola.

Hodnoty vystavenia

Použiť by sa mali tri expozičné hodnoty. Na predbežné stanovenie sa môže použiť jedna expozičná hodnota testovanej látky. Vtedy expozičná hodnota je buď maximálna tolerovaná hodnota, alebo taká, ktorá má za následok určitý náznak toxicity. Pre netoxické látky by sa mala použiť expozícia na maximálnu používanú koncentráciu.

Postup

Samce štandardného fenotypu (starí tri až päť dní) sa ovplyvňujú testovanými látkami a jednotlivci sa pária s množstvom panenských samičiek z línie Muller-5 alebo z inej vhodne označenej línie (s mnohonásobne invertovanými X-chromozómami). Každé dva až tri dni sa samičky nahradia novými panenskými samičkami s cieľom pokryť celý zárodočný bunkový cyklus. Potomstvo týchto samičiek sa vyhodnotí vzhľadom na letálne vplyvy zodpovedajúce vplyvom na zrelú spermiu, stredným alebo neskorým stavom spermatid, skorým spermatidám, spermatocytom a spermatogóniam v čase ovplyvňovania.

Heterozygotným F_1 samičkám z vyššie uvedených krížení sa umožňuje páriť sa jednotlivci (t. j. jedna samička na nádobku) s ich bratmi. V F_2 generácii sa každá kultúra je vyhodnotí vzhľadom na neprítomnosť štandardných samčích typov. Ak sa zdá, že kultúra vyrástla z F_1 samičky nesúcej letálnu mutáciu v rodičovskom X-chromozóme (t. j. nepozorujú sa žiadne samce s ovplyvneným chromozómom), dcéry tejto samičky s rovnakým genotypom sa musia testovať, aby sme zistili, či sa letalita opakuje v nasledujúcej generácii.

2. ÚDAJE

Údaje sa znázorňujú do tabuľky s cieľom ukázať počet testovaných X-chromozómov, počet neplodných samcov, počet letálnych chromozómov v každej expozičnej koncentrácii a pre každú periódu párenia na každého skúmaného samca. Dokumentovať sa musí počet zhukov rozdielnych veľkostí vzhľadom na jedného samca. Tieto výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

Pri vyhodnocovaní testov na pohlavie viazanú recesívnu letalitu by sa mali použiť vhodné štatistické metódy. Zhukovanie recesívnych letálnych mutácií pochádzajúcich z jedného samca sa skúma a vyhodnocuje vhodným štatistickým spôsobom.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

- zásobná línia: použité línie *Drosophila* alebo kmene, vek hmyzu, počet ovplyvnených samcov, počet sterilných samcov, počet stabilných F_2 kultúr, počet F_2 kultúr bez potomstva, počet chromozómov nesúcich letálnu mutáciu, ktoré sú zistené v každom zárodočnom bunkovom štádiu,
- kritériá pre vytvorenie veľkosti ovplyvňovaných skupín,
- testovacie podmienky: podrobný opis ovplyvňovania a odberu náhodných vzoriek, expozičné koncentrácie, údaje o toxicite, prípadne negatívne (rozpúšťadlo) a pozitívne kontroly,
- kritériá vyhodnocovania letálnych mutácií,
- vzťah expozícia/efekt tam, kde je to možné,
- zhodnotenie dát,

- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.21. TESTY BUNKOVEJ TRANSFORMÁCIE CICAČÍCH BUNIEK IN VITRO**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Systémy kultúr cicavčích buniek sa používajú na určenie fenotypových zmien indukovaných *in vitro* chemickými látkami, ktoré súvisia s malígnou transformáciou *in vivo*. Medzi často používané bunky patria C3H10T_{1/2}, 3T3, SHE, Fischer bunky potkanov. Testy sa zakladajú na zmenách bunkovej morfológie, vytváraní ohnísk alebo zmenách v schopnosti prilnúť na polopevnom agare. Existujú aj menej používané systémy, ktoré detekujú iné fyziologické a morfológické zmeny v bunkách, vznikajúce ako dôsledok vystavenia karcinogénnym chemikáliám. Žiadny zo záverov *in vitro* testov nepreukázal mechanické spojenie s rakovinou. Niektoré z testovacích systémov majú schopnosť odhaľovať nádorové promótor. Cytotoxicita sa môže určiť meraním vplyvu testovaného materiálu na schopnosti tvorby kolónií (klonovacia účinnosť) alebo meraním rýchlosti rastu kultúr. Meranie cytotoxicity má za cieľ preukázať, že vystavenie testovanej chemikálii bolo toxikologicky závažné, ale nemôže sa použiť na výpočet frekvencie transformácií vo všetkých testoch, keďže niektoré môžu vyžadovať predĺženú inkubáciu a/alebo opätovné naočkovanie.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**Príprava****Bunky**

Dostupné sú rozmanité bunkové línie alebo primárne bunky a to v závislosti od použitého transformačného testu. Výskumník musí zaručiť, aby bunky v uskutočňovanom teste vykazovali vhodnú zmenu fenotypu po vystavení známym karcinogénom a aby test v laboratóriu výskumníka bol dokázateľne platný, spoľahlivý a zdokumentovaný.

Médium

Používajú sa médiá a experimentálne podmienky, ktoré zodpovedajú používanému transformačnému testu.

Testovaná látka

Testované látky sa môžu pripraviť v kultivačnom médiu alebo rozpustiť, alebo rozsuspendovať vo vhodnom nosiči predtým, ako dôjde k ovplyvneniu buniek. Konečná koncentrácia nosiča v kultivačnom systéme by nemala ovplyvňovať životaschopnosť bunky, rýchlosť rastu alebo výskyt transformácií.

Metabolická aktivácia

Bunky majú byť vystavené testovanej látke tak v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. V eventuálnom prípade, keď sa používajú typy buniek s endogénnou metabolickou aktivitou, by malo byť známe, že povaha aktivity je vhodná pre testované chemické triedy.

*Testovacie podmienky***Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol**

Pozitívne kontroly, ktoré využívajú priamo pôsobiace zlúčeniny a zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu, majú byť súčasťou každého experimentu; negatívnu kontrolu (nosič) je taktiež potrebné použiť.

Nasledujú príklady látok, ktoré môžu byť použité ako pozitívna kontrola:

- priamo pôsobiace chemikálie:
 - etylmetánsulfonát,
 - β -propiolaktón,
- zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu:
 - 2-acetylaminofluorén,
 - 4-dimetylaminoazobenzén,
 - 7,12-dimetylbenzantracén.

V prípade, že je to primerané, mala by sa zahrnúť ďalšia pozitívna kontrola rovnakej chemickej triedy, ako je testovaná látka.

Koncentrácie vystavenia

Používa sa niekoľko koncentrácií testovanej látky. Tieto koncentrácie majú poskytovať toxický efekt spôsobený koncentráciou, najvyššia koncentrácia spôsobujúca nízku úroveň prežívania a prežívanie pri najnižšej koncentrácii by malo byť približne rovnaké ako pri negatívnej kontrole. Vo vode ťažko rozpustné látky sa majú testovať až do úrovne rozpustnosti s použitím vhodných postupov. Pre voľne rozpustné netoxické látky sa horná koncentrácia testovanej látky určuje od prípadu k prípadu.

Postup

Na základe použitého testovacieho systému sa bunky ovplyvňujú počas primeraného časového intervalu a ak je vystavenie predĺžené, môže zahŕňať opätovné vystavenie sprevádzané výmenou živnej pôdy (a ak je nevyhnutné, čerstvou zmesou metabolického aktivátora). Bunky bez dostatočnej endogénnej metabolickej aktivity sa vystavujú testovanej látke ako v prítomnosti tak aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Na konci doby vystavenia sa bunky premyjú, zbavia testovanej látky a kultivujú za podmienok vhodných na monitorovanie transformovaného fenotypu a stanoví sa rozsah zistených transformácií. Všetky výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek v rôznych formách v závislosti na uskutočnenom teste, napr. zhodnotenie platní, pozitívne platne alebo počet transformovaných buniek. V prípadoch, kde je to možné, prežívanie sa má vyjadriť ako percento úrovne hodnôt kontrolných vzoriek a frekvencia transformácie sa má vyjadriť ako počet transformantov na počet prežívajúcich buniek. Údaje sa vyhodnocujú pomocou vhodných štatistických metód.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje nasledujúce informácie:

- použitý typ buniek, počet bunkových kultúr, metódy na udržiavanie bunkových kultúr,

- testovacie podmienky, koncentrácia testovanej látky, použitý nosič, inkubačný čas, trvanie a frekvenciu ovplyvňovania, hustotu buniek počas ovplyvňovania, typ použitého exogénneho metabolického aktivačného systému, pozitívne a negatívne kontroly, špecifikáciu sledovaného fenotypu, použitý selekčný systém (ak je potrebný), odôvodnenie výberu dávok,
- použité metódy na výpočet počtu životaschopných a transformovaných buniek,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.22. DOMINANTNÝ LETÁLNY TEST U HLODAVCOV

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Dominantné letálne vplyvy spôsobujú smrť embrya alebo plodu. Vyvolanie dominantných letálnych mutácií ovplyvnením chemickou látkou naznačuje, že látka ovplyvnila zárodočné tkanivá testovaného druhu. Všeobecne sa usudzuje, že dominantné letálne mutácie majú pôvod v poškodení chromozómov (štrukturálnych a numerických anomáliách). Smrť embrya ovplyvnených samičiek môže byť tiež výsledkom toxických vplyvov.

Vo všeobecnosti sa samčí jedinci vystavia testovanej zlúčenine a pária sa s neovplyvnenými panenskými samičkami. Samostatne sa môžu testovať rozličné štádiá zárodočných buniek s využitím postupných intervalov kríženia. Zvýšenie počtu mŕtvych implantátov na samičku v ovplyvnenej skupine v porovnaní s počtom mŕtvych implantátov na samičku v kontrolnej skupine odráža postimplantačné straty. Predimplantačné straty sa môžu stanoviť na základe počítania žltých teliesok (*corpora lutea*) alebo porovnaním všetkých implantátov na samičku vo vystavenej a v kontrolnej skupine. Celkový dominantný letálny vplyv je súčet pred a postimplantačných strát. Výpočet celkového dominantného letálneho vplyvu je založený na porovnaní počtu živých implantátov na samičku v testovanej skupine k počtu živých implantátov na samičku v kontrolnej skupine. Zníženie počtu implantátov v určitých obdobiach môže byť výsledkom usmrtenia buniek (napr. spermatocytov a/alebo spermatogónií).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

V prípade, že je to možné, sa testované látky rozpustia alebo rozsuspendujú vo fyziologickom roztoku. Chemikálie vo vode nerozpustné sa rozpustia alebo rozsuspendujú vo vhodných nosičoch. Použitý nosič nesmie ovplyvňovať testovanú chemikáliu, ani spôsobovať toxické účinky. Vykonaná musí byť čerstvá príprava testovanej chemikálie.

*Podmienky testu**Spôsob podávania*

Vo všeobecnosti sa testovaná látka podáva iba raz. Na základe toxikologických informácií možno použiť opakovaný harmonogram vystavenia. Zvyčajný spôsob podávania je orálna intubácia alebo intraperitoneálna injekcia. Vhodnými môžu byť aj iné spôsoby podávania.

Experimentálne zvieratá

Ako testovacie druhy sa preferujú potkany alebo myši. Zdravé a pohlavne zrelé zvieratá sa náhodne roztriedia do skupiny na vystavenie a do kontrolnej skupiny.

Počet a pohlavie

Mal by sa použiť primeraný počet vystavených samcov, berúc pritom do úvahy spontánnu zmenu hodnoteného biologického druhu. Zvolený počet by mal vychádzať z vopred určenej citlivosti detekcie a sile významnosti. V typickom teste napríklad by mal počet samcov v skupine každej dávky stačiť na dosiahnutie 30 až 50 gravidných samíc v danom intervale kríženia.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Do každého experimentu sa zahŕňajú súbežné pozitívne a negatívne kontroly. Ak sú k dispozícii akceptovateľné výsledky pozitívnej kontroly z nedávno uskutočnených experimentov v rovnakom laboratóriu, je možné použiť tieto výsledky miesto súbežnej pozitívnej kontroly. Na preukázanie citlivosti testu sa používajú látky pozitívnej kontroly v prijateľne nízkej dávke (napr. MMS, intraperitoneálne, 10 mg/kilogram).

Úrovne dávok

Zvyčajne sa používajú tri rôzne dávky. Vysoká dávka by mala poskytovať dôkazy o toxicite alebo redukovanej plodnosti ovplyvnených zvierat. V niektorých prípadoch postačuje jediná vysoká dávka.

Hraničný test

Pri jednorazovom podaní sa netoxické látky testujú pri 5 g/kilogram alebo pri opakovanom podávaní pri 1 g/kilogram/deň.

Postup

Existuje niekoľko harmonogramov vystavenia. Jednorazové podanie testovanej látky je najrozšírenejšie. Môžu sa použiť aj iné harmonogramy ovplyvňovania.

Jednotlivé samce sa postupne pária s jednou alebo dvoma neovplyvnenými panenskými samicami vo vhodných časových obdobiach po ovplyvnení. Samice sa musia ponechať so samcami po dobu trvania aspoň jedného ovulačného cyklu alebo pokým nedôjde k páreniu, toto sa stanoví na základe prítomnosti spermií vo vagíne alebo prítomnosťou vaginálnej zátky.

Počet párení po ovplyvnení je daný harmonogramom ovplyvnenia a musí zabezpečovať, že sa po ovplyvnení zachytia všetky štádiá zárodočných buniek.

Samice sa usmrtia v druhej polovici gravidity a vyšetrí sa obsah maternice tak, aby sa stanovil počet mŕtvych a živých implantátov. Vaječníky sa môžu vyšetriť na stanovenie počtu žltých teliesok.

2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek, ktoré ukazujú počet samcov, počet gravidných samíc a počet negravidných samíc. Výsledky každého kríženia zahŕňajúce pôvod každého samca a samice by sa mali zachytiť samostatne. U každej samice je potrebné opísať týždeň párenia, dávku, ktorou bol ovplyvnený samec, frekvenciu živých implantátov a frekvenciu mŕtvych implantátov.

Výpočet celkového dominantného letálneho vplyvu je založený na porovnaní počtu živých implantátov na samicu v testovanej skupine k počtu živých implantátov v kontrolnej skupine. Na stanovenie postimplantačných strát sa analyzuje pomer mŕtvych a živých implantátov z ovplyvnenej skupiny porovnaný s rovnakým pomerom z kontrolnej skupiny.

V prípade, že sú údaje zaznamenané ako skorá a neskorá smrť, musí sa na to poukázať v tabuľkách. Je potrebné uviesť, či sú odhadnuté predimplantačné straty. Predimplantačné straty sa vypočítajú ako rozdiel medzi počtom žltých teliesok a počtom implantátov alebo ako zníženie priemerného počtu implantátov na maternicu v porovnaní s kontrolnými páreniami.

Údaje sú vyhodnocované pomocou vhodných štatistických metód.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

- druh, kmeň, vek a hmotnosť použitých zvierat, počet zvierat každého pohlavia v experimentálnej a kontrolnej skupine,
- testovaná látka, nosič, testované dávky a podklady pre výber dávok, negatívna a pozitívna kontrola, údaje o toxicite,
- spôsob podávania a harmonogram ovplyvňovania,
- harmonogram párenia,
- metódy použité na dôkaz, že sa uskutočnilo párenie,
- čas usmrtenia,
- kritériá na stanovenie dominantných letálnych mutácií,
- ak je to možné, vzťah dávka/efekt,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusia o výsledkoch,
- interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.23. TEST SPERMATOGONÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV**1. METÓDA**

Táto metóda je obdobou OECD TG 483, testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky u cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

Účelom testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky u cicavcov je identifikovať látky, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómove odchýlky v spermatogonálnych bunkách cicavcov (1) (2) (3) (4)(5). Štrukturálne chromozómove odchýlky sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómove alebo chromatidové. Väčšina chemických mutagénov indukuje odchýlky chromatidového typu, vyskytujú sa však aj odchýlky chromozómoveho typu. Táto metóda nie je určená na meranie numerických odchýlok a na tento účel sa bežne nepoužíva. Chromozómove mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb.

Tento test meria chromozómove udalosti v spermatogonálnych zárodočných bunkách, a preto sa predpokladá, že predpovedá vznik dedičných mutácií v zárodočných bunkách.

Pri tomto teste sa zvyčajne používajú hlodavce. Tento *in vivo* cytogenetický test zisťuje chromozómove odchýlky v spermatogonálnych mitózach. Iné cieľové bunky tomuto testu nepodliehajú.

Na zistenie odchýlok chromatidového typu v spermatogonálnych bunkách sa skúma prvé delenie mitotických buniek po podaní ešte predtým, ako sa tieto lézie stratia v následných deleniach buniek. Dodatočné informácie z ošetrovaných spermatogonálnych kmeňových buniek sa získavajú analýzou meiotických chromozómov na odchýlky chromozómoveho typu pri diakinetickej metafáze I, keď sa ošetrované bunky stanú spermatocytmi.

Tento *in vivo* test skúma, či mutagény somatických buniek sú tiež aktívne v zárodočných bunkách. Spermatogonálny test je ďalej relevantný pre hodnotenie mutagénneho rizika tým, že umožňuje posúdenie faktorov *in vivo* metabolismu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA. V semenníkoch je prítomné množstvo generácií spermatogónií so spektrom citlivosti na chemické látky.

Zistené odchýlky preto predstavujú celkovú reakciu vystavených populácií spermatogonálnych buniek s prevládajúcimi početnejšími diferencovanými spermatogonálnymi bunkami. Rôzne generácie spermatogónií sú alebo nie sú exponované všeobecnou cirkuláciou v závislosti od ich pozície v semenníkoch, kvôli fyzickej a fyziologickej bariére Sertoliho buniek a bariére krvi v semenníkoch.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómove poškodenie prejavujúce sa ako prerušenie jednotlivých chromatidov alebo prerušenie a opätovné spojenie medzi chromatidmi.

Odchýlka chromozómoveho typu: štrukturálne chromozómove poškodenie prejavujúce sa ako prerušenie alebo prerušenie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Trhlina: achromatická lézia menšia ako šírka jedného chromatidu s minimálnym posunutím chromatidov.

Numerická odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou numerickou charakteristikou použitých buniek.

Polyploidia: násobok haploidného chromozómoveho čísla n) odlišného od diploidného čísla (t. j. $3n$, $4n$ atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako delenia a fragmenty, intrazmeny alebo interzmeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú exponované príslušným spôsobom testovacou látkou a utratené vo vhodnom čase po podaní látky. Pred utratením sa zvieratá ošetrí prostriedkom zastavujúcim metafázu (napr Colcemidom® alebo colchicinom). Následne sa zo zárodočných buniek urobí chromozómové prípravky, zafarbí sa a metafázové bunky sa analyzujú na chromozómové odchýlky.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Najbežnejšie sa používajú samce čínskych morčiat a myši. Použiť sa dajú samce iného vhodného druhu cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne rody mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť $\pm 20\%$ strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou vlhkosti je 50 % až 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé mladé dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klieťky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klieťok. Zvieratá sa jednotlivito označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriedujú pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky na používaných úrovniach dávok. Nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, ak je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívna kontrolná skupina vytvára štrukturálne odchýlky *in vivo* v spermatogonálnych bunkách pri podaní na úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí.

Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby boli účinky zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám boli látky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich boli odoberané iba raz. Ak sú dostupné, môže sa zvoliť použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu príbuzných v triede chemikálií. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu:

Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
Cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyklohexamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomerický akrylamid	79-06-1	201-173-7
Trietylénmelamín	51-18-3	200-083-5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú vzorky aj z negatívnych kontrolných skupín, iba s rozpúšťadlom alebo nosičom, a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne efekty.

1.5. POSTUP

1.5.1. Počet zvierat

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat.

1.5.2. Harmonogram ošetrovania

Testovacie látky sa podávajú jeden alebo dvakrát (t. j. ako jedno podanie alebo dve podania). Testovacie látky môžu byť podávané aj v dvoch dávkach, t. j. dve podania v jeden deň po niekoľkých hodinách po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky. Iné dávkovacie režimy sa vedecky zdôvodnia.

V skupine s najvyššou dávkou sa uskutočnia dva odbery vzoriek. Keďže kinetika bunkového cyklu môže byť ovplyvnená testovacou látkou, vzorky sa odoberajú v dvoch rôznych časoch po ošetrení, prvýkrát skôr a druhýkrát neskôr, približne 24 a 48 hodín po podaní. Pre dávky prekračujúce najvyššiu dávku sa odber uskutoční po 24 hodinách alebo pri 1,5 násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po podaní, pokiaľ nie je známe, že pre zistenie účinkov je vhodnejší iný čas (6).

Vzorky sa môžu ďalej odoberať v iných časoch. Napríklad v prípade chemikálií, ktoré môžu indukovať zaostávanie chromozómov alebo vyvolávať účinky nezávislé od S, sú vhodné skoršie časy odberu vzoriek (1).

Vhodnosť opakovaného harmonogramu podávania sa identifikuje z prípadu na prípad. Po opakovanom harmonograme podávania sa zvieratá utratia po 24 hodinách (1,5 násobok dĺžky bunkového cyklu) od posledného podania. Kde je to vhodné, môžu sa uskutočniť ďalšie odbery vzoriek.

Pred utratením sa zvieratám injekčne intraperitoneálne podáva vhodná dávka prostriedku zastavujúceho metafázu (napr Colcemid® alebo colchicin). Po vhodnom čase sa následne zo zvierat odoberajú vzorky. U myší je tento interval približne 3 – 5 hodín; u čínskych morčiat približne 4 – 5 hodín.

1.5.3. Úrovně dávok

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, kmeňa, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (7). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú, resp. žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známka toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávkovania založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť.

Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobí určité príznaky toxicity v spermatogonálnych bunkách (napríklad: zníženie pomeru spermatogonálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze; toto zníženie by nemalo presiahnuť 50 %).

1.5.4. Limitný test

Ak test pri jednom objeme dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch hladín dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššieho objemu dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. Podávanie dávok

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné cesty expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovacieho zvieratá. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie objemov vyšších ako tento sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. Príprava chromozómov

Ľhneď po utratení sa získavajú bunkové suspenzie z jedného alebo oboch testov, ktoré sa vystavia hypotonickému roztoku a fixujú sa. Bunky sa potom umiestnia na sklíčka a zafarbia.

1.5.7. Analýza

Od každého zvieratá sa analyzuje najmenej 100 dobre rozšírených metafáz (t. j. minimálne 500 metafáz na skupinu). Tento počet je možné znížiť pri pozorovaní vysokého počtu odchýlok. Všetky sklíčka, vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín, sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže postupy fixácie často ústia do pretrhnutia časti metafázy so stratou chromozómov, označené bunky by mali obsahovať počet centromér rovnajúci sa hodnote $2n \pm 2$.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa hodnotí počet buniek so štrukturálnymi chromozómovými odchýlkami a počet chromozómových odchýlok na bunku. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre pokusné a kontrolné skupiny. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa neudávajú pri celkovej frekvencii odchýlok.

Ak je pozorovaná mitóza i meióza, pomer spermatogonálnych mitóz k prvej a druhej meiotickej metafáze sa stanoví ako meranie cytotoxicity pre všetky pokusné a negatívne kontrolné zvieratá pri celkovej vzorke 100 deliacich sa buniek na jedno zviera na účely stanovenia možného cytotoxického účinku. Ak je pozorovaná len mitóza, mitotický index sa stanovuje pre najmenej 1 000 buniek na jedno zviera.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo zjavný nárast počtu buniek s odchýlkami pri jednej dávke pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (8). Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu. Nejednoznačné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Testovacia látka s výsledkami, ktoré nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vopred vylúčia jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybiteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vivo* testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky naznačujú, že určitá látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v zárodočných bunkách testovaného druhu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v zárodočných bunkách testovaného druhu.

Pravdepodobnosť, že testovacia látka alebo jej metabolity dosiahnu cieľové tkanivo, je predmetom diskusie.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie voľby nosiča,
- rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- počet a vek zvierat,
- zdroj, podmienky chovu, strava atď.,
- individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

- údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,
- zdôvodnenie voľby úrovne dávok,
- zdôvodnenie voľby spôsobu podávania,
- podrobnosti o príprave testovacej látky,
- podrobnosti o podávaní testovacej látky,
- zdôvodnenie času utratenia,
- konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,
- podrobnosti o kvalite stravy a vody,
- podrobný opis harmonogramu podávania a odberu vzoriek,

- metódy merania toxicity,
- identita látky zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie podávania,
- metódy prípravy sklíčok,
- kritériá pre hodnotenie odchýlok,
- počet analyzovaných buniek na jedno zviera,
- kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

- známky toxicity,
- mitotický index,
- pomer buniek spermatogónálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze,
- typ a počet odchýlok uvádzaný samostatne na každé zviera,
- celkový počet odchýlok na skupinu,
- počet buniek s odchýlkami na skupinu,
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,
- štatistické analýzy, ak boli použité,
- súčasné údaje o negatívnych kontrolných skupinách,
- historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách, s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,
- súčasné údaje o pozitívnych kontrolných skupinách,
- zmeny ploidie, ak boli pozorované.

Rozbor výsledkov

Závery

4. LITERATÚRA

- (1) Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477 – 484.
- (2) Adler, I.D., (1984). 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 Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289 – 294.

-
- (4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I 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, 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, 313 – 318.
 - (7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R, Botham, P.A., Doe, I, 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, 313 – 319.
 - (8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R, Amphlett, G.E., Clare, G, Ferguson, R, Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.RK. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D. J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184 – 232.

B.24. SPOT TEST U MYŠÍ

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť E.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť E.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Predkladaný test je *in vivo* test u myší, pri ktorom sa vyvíjajúce embryo vystaví chemikáliám. Cieľovými bunkami vo vyvíjajúcom sa embryu sú melanoblasty a cieľovými génmi sú také gény, ktoré podmieňujú pigmentáciu srsti. Vyvíjajúce sa embryá sú heterozygotné pre mnohé gény podmieňujúce sfarbenie srsti. Mutácia alebo strata (následkom rôznych genetických udalostí) dominantnej alely takéhoto génu v melanoblaste spôsobuje expresiu recesívneho fenotypu v bunkách potomstva, vytvárajúc tak škvrny zmenenej farby na srsti vzniknutej myši. Spočíta sa počet potomkov s týmito škvrnami, mutáciami a porovná sa ich frekvencia medzi potomstvom vzniknutým z embryí ovplyvnených iba rozpúšťadlom. Spot test u myší určuje predpokladané somatické mutácie vo fetálnych bunkách.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Ak je to možné, testované látky sa rozpustia alebo rozsuspendujú vo fyziologickom roztoku. Chemikálie nerozpustné vo vode sa rozpustia alebo rozsuspendujú vo vhodnom nosiči. Použitý nosič nesmie reagovať s testovanou látkou ani spôsobovať toxické účinky. Používa sa čerstvo pripravený roztok testovanej chemikálie.

Pokusné zvieratá

Myši kmeňa T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c^{hp}/c^{hp} ; brown, b/b, dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) sú párované buď s kmeňom HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl, pe/pe), alebo s kmeňom C57BL (nonagouti, a/a). Ďalšie vhodné kríženia, akým je kríženie medzi kmeňom NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) a kmeňom DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) sa môžu použiť v prípade, že ich výsledkom je nonagouti potomstvo.

Počet a pohlavie

Dostatočný počet gravidných samíc sa ovplyvňuje tak, aby sa získal primeraný počet potomkov pre každú použitú dávku. Vhodná veľkosť vzorky je daná počtom škvŕn pozorovaných u vystavených myší a rozsahom kontrolných dát. Negatívny výsledok je prijateľný iba v tom prípade, ak bolo hodnotených minimálne 300 potomkov samíc ovplyvnených najvyššou dávkou.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

K dispozícii by mali byť súbežné kontrolné údaje z myší vystavených len nosičom (negatívna kontrola). Pridať sa môžu historické kontrolné údaje z rovnakého laboratória tak, aby sa zvýšila citlivosť testu pod podmienkou, že sú homogénne. V prípade, že nie je zistený žiadny mutagénny účinok testovanej chemikálie, mali by byť dostupné údaje pozitívnej kontroly z vystavenia chemikálii, u ktorej bol dokázaný mutagénny účinok v tomto teste, nedávno získané v rovnakom laboratóriu.

Spôsob podávania

Zvyčajné spôsoby podávania sú orálna intubácia alebo peritoneálna injekcia gravidných samíc. Ak je to vhodné, používa sa ovplyvnenie inhaláciou alebo iné spôsoby podávania.

Úrovne dávok

Používajú sa aspoň dve úrovne dávok, z ktorých jedna vykazuje známky toxicity alebo zmenšenej veľkosti vrhu. Pre netoxické chemikálie by sa malo použiť vystavenie až do maximálnej dosiahnuteľnej dávky.

Postup

Jednorazové ovplyvnenie sa zvyčajne podáva na 8., 9. alebo 10. deň gravidity, pričom ako deň 1 sa uvažuje deň, keď je prvýkrát pozorovaná vaginálna zátka. Tieto dni zodpovedajú 7,25, 8,25 a 9,25 dňom po počatí. Počas týchto dní sa môžu použiť po sebe idúce ovplyvnenia.

Analýza

Potomstvo je označené a spočítané sú škvrny v čase medzi tretím a štvrtým týždňom po narodení. Rozlišujú sa tri triedy škvŕn:

- a) biele škvrny do 5 mm od strednej ventrálnej línie, o ktorých sa predpokladá, že sú výsledkom odumierania buniek (WMVS);
- b) žlté, aguti podobné, škvrny v oblastiach bradaviek, genitálií, v krčných, podpazušných a trieslových oblastiach a na strede čela, o ktorých sa predpokladá, že sú výsledkom chybného diferenciacie (MDS), a
- c) pigmentované a biele škvrny náhodne distribuované na srsti, o ktorých sa predpokladá, že sú výsledkom somatických mutácií (RS).

Všetky tri triedy sa vyhodnotia, ale iba posledná, RS, je geneticky významná. Problémy v rozlíšení medzi MDS a RS sa môžu vyriešiť fluorescenčnou mikroskopiou vzoriek chlupov.

Mali by sa zaznamenať zjavné hrubé morfológické abnormality potomstva.

2. ÚDAJE

Údaje sa predkladajú ako celkový počet hodnotených potomkov a počet tých, ktorí majú jednu alebo viacero predpokladaných somatických mutačných škvŕn. Ovpľyňovanie a negatívna kontrola sa porovnávajú pomocou vhodných metód. Údaje sa uvádzajú podľa vrhov.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu bude obsahovať tieto informácie:

- kmene použité pri krížení,
- počet gravidných samíc v experimentálnej skupine a v kontrole,
- priemerná veľkosť vrhu v experimentálnej a v kontrolnej skupine pri narodení a po odstavení,
- úroveň (úrovne) dávky testovanej chemikálie,
- použité rozpúšťadlo,
- deň gravidity, v ktorom bolo prevedené ovplyvnenie,

- spôsob ovplyvnenia,
- celkové množstvo hodnoteného potomstva a počet tých jedincov v experimentálnej a kontrolnej skupine, ktoré majú WMVS, MDS a RS,
- hrubé morfológické abnormality,
- v prípade, že je to možné, vzťah dávka/efekt pri RS,
- štatistické vyhodnotenie,
- diskusia o výsledkoch,
- interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.25. DEDIČNÁ TRANSLOKÁCIA U MYŠÍ

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test dedičnej translokácie u myší zisťuje štrukturálne a numerické chromozómové zmeny v cicavčích zárodočných bunkách po objavení sa v prvej generácii potomkov. Zistené typy chromozómových zmien sú recipročné translokácie a chromozómové straty v prípade, že je obsiahnuté samičie potomstvo. Nosiči translokácie a XO-samice vykazujú zníženú plodnosť, ktorá sa používa na selekciu F₁ potomstva pre cytogenetickú analýzu. Úplná neplodnosť je spôsobená istými typmi translokácií (X-autozóm, a c-t typ). Translokácie sa cytogeneticky pozorujú v meiotických bunkách v diakinéze metafázy I samčích jedincov, a to buď F₁ samcov, alebo samčieho potomstva F₁ samíc. XO-samice sa cytogeneticky identifikujú prostredníctvom prítomnosti iba 39 chromozómov v mitózach kostnej drene.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Testované chemikálie sa rozpustia v fyziologickom roztoku. Ak sú nerozpustné, rozpúšťajú sa alebo rozsuspéndujú vo vhodnom nosiči. Využívajú sa čerstvo pripravené roztoky testovanej zlúčeniny. Ak je na uľahčenie dávkovania použitý nosič, nesmie vzájomne reagovať s testovanou zlúčeninou alebo spôsobovať toxické efekty.

Spôsob podávania

Orálna intubácia alebo intraperitoneálna injekcia sú zvyčajnými spôsobmi podávania. Vhodné sú aj iné spôsoby podávania.

Pokusné zvieratá

Pre prípad rozmnožovania a cytologického overovania sa pokusy vykonávajú s myšou. Nevyžaduje sa žiaden špecifický kmeň. Priemerná veľkosť vrhu kmeňa by však mala byť väčšia ako osem a mala by byť relatívne stála.

Používajú sa zdravé a pohlavne zrelé zvieratá.

Počet zvierat

Nevyhnutný počet zvierat závisí od frekvencie spontánnych translokácií a na získanie pozitívnych výsledkov sa vyžaduje minimálna rýchlosť indukcie.

Test sa zvyčajne vykonáva analýzou samčieho F₁ potomstva. Pre jednu dávkovú skupinu by sa malo testovať aspoň 500 samčích F₁ potomkov, 300 samcov a 300 samičiek sa požaduje v prípade, že sa zahŕňa samičie F₁ potomstvo.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Dostupné by mali byť zodpovedajúce kontrolné dáta odvodené zo súbežnej a historickej kontroly. V prípade, že na základe súčasných pokusov prevedených v tom istom laboratóriu sú k dispozícii prijateľné výsledky pozitívnej kontroly, tieto výsledky sa môžu použiť miesto súbežnej pozitívnej kontroly.

Úrovne dávok

Testuje sa jedna úroveň dávky, zvyčajne najvyššia dávka spojená s produkciou minimálnych toxických efektov, ale bez vplyvu na reprodukčné správanie alebo prežívanie. Na zabezpečenie vzťahu dávky/efekt sa požadujú ďalšie dve nižšie dávky. Pre netoxické chemikálie by sa malo použiť vystavenie maximálnej dosiahnuteľnej dávke.

Postup

Ovplyvňovanie a párenie

K dispozícii sú dva harmonogramy ovplyvňovania. Jednorazové podávanie testovanej látky sa používa najčastejšie. Taktiež sa môže použiť podávanie testovanej látky v siedmy deň každého týždňa počas 35 dní. Počet párení nasledujúcich po ovplyvnení sa riadi harmonogramom ovplyvňovania a mal by zabezpečiť, že sa zachytia všetky štádiá zárodočných buniek. Na konci obdobia párenia sa samičky jednotlivo umiestnia do kliebok. Keď samičky vrhnú, zaznamenaná sa dátum, veľkosť vrhu a pohlavie potomstva. Všetko samčie potomstvo sa odstaví a všetky samičie potomstvá sa odstránia, pokiaľ sa nepoužijú v pokuse.

Testovanie translokačnej heterozygoty

Používa sa jedna z dvoch možných metód:

- testovanie plodnosti F_1 potomstva a následné overenie možných nosičov translokácií pomocou cytogenetickej analýzy,
 - cytogenetická analýza všetkých samčích F_1 potomkov bez predchádzajúcej selekcie testom plodnosti.
- a) Testovanie plodnosti

Znížená plodnosť F_1 jedince sa môže stanoviť pozorovaním veľkosti vrhu a/alebo analýzou obsahov maternice samičích krížencov.

Pre každý myš kmeň sa musia stanoviť kritériá pre určovanie normálnej a zníženej plodnosti.

Pozorovanie veľkosti vrhu: testované F_1 samce sa umiestnia jednotlivo do kliebok so samičkami z toho istého pokusu alebo kolónie. Kliebky sa prezerajú denne počnúc po 18. dňoch od párenia. Veľkosť vrhu a pohlavie F_2 potomstva sa zaznamená pri narodení a vrhy sú následne zničené. Ak sa testujú samičie F_1 potomstvá, F_2 potomstvá malých vrhov sa ponechajú pre ďalšie testovanie. Nosiči samičích translokácií sa overia cytogenetickou analýzou translokácie pre ich každého samčieho potomka. XO-samičky sa rozpoznávajú prostredníctvom zmeny v pohlavnom pomere spomedzi ich potomstva od hodnoty 1: 1 na 1: 2 samcov vs. samíc. V nasledujúcom kroku postupu sa F_1 zvieratá vylúčia z ďalšieho testovania v prípade, že prvý F_2 vrh dosiahne alebo prekročí predurčenú normálnu hodnotu. Inak sa pozoruje druhý alebo tretí F_2 vrh.

F_1 zvieratá, ktoré sa po pozorovaní až do tretieho vrhu nemôžu klasifikovať ako normálne, sa buď ďalej testujú analýzou obsahu maternice samičích krížencov, alebo sú priamo podrobené cytogenetickej analýze.

Analýza maternicového obsahu: Zníženie veľkosti vrhu nosičov translokácií je spôsobené odumretím embryí, takže vysoký počet mŕtvych implantátov naznačuje prítomnosť translokácií u testovaného zvieratá. Každý testovaný samec F_1 sa pári s dvomi alebo tromi samicami. Počatie sa stanovuje denne ranným vyšetrením vaginálnej zátky. Samice sa usmrťia po uplynutí 14 až 16 dní a zaznamenajú sa žijúce a mŕtve implantáty, ktoré sa nachádzajú v ich maternici.

- b) Cytogenetická analýza

Preparáty semenníkov sa vytvoria pomocou techniky sušenia na vzduchu. Nosiči translokácií sa určia pomocou prítomnosti multivalentných konfigurácií počas diakinézy metafázy I v primárnych spermatocytoch. Pozorovania aspoň dvoch buniek s multivalentnými vzťahmi sú základom požadovaného dôkazu, že testované zviera je nosičom translokácie.

Ak sa nevykonala selekcia vrhu, všetky samce F_1 sa vyšetrí cytogeneticky. Mikroskopicky sa musí vyhodnotiť minimálne 25 buniek v štádiu diakinézy metafázy I na jedného samca. Pri samčkách F_1 s malými semenníkmi a prerušením meiózy pred diakinézou alebo pri samičkách F_1 s podozrením na XO sa vyžaduje vyšetrenie mitotických metafáz v spermatogóniách alebo kostnej dreni. Prítomnosť nezvyčajne dlhého a/alebo krátkeho chromozómu v každej z 10 buniek je dôkazom určitej translokácie samčej sterility (c-t typ). Niektoré translokácie X-autozómu, ktoré spôsobujú samčiu sterilitu, sa dajú identifikovať iba prúžkovacou analýzou mitotických chromozómov. Prítomnosť 39 chromozómov vo všetkých 10 mitózach je dôkazom pre XO stav samice.

2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek.

Pre každé obdobie párenia sa zaznamená priemerná veľkosť vrhu a pomer pohlaví z krížení rodičov pri narodení a pri odstavení.

Na potvrdenie plodnosti zvierat F_1 generácie sa uvádza priemerná veľkosť vrhu všetkých normálnych párení a veľkosť každého jednotlivého vrhu nosičov translokácie F_1 . Na analýzu obsahu maternice sa uvádza priemerný počet žijúcich a mŕtvych implantátov pri normálnych páreniach a jednotlivé počty žijúcich a mŕtvych implantátov pri každom párení nosičov F_1 translokácie.

Na cytogenetickú analýzu diakinézy metafázy I sa pre každého nosiča translokácie uvádza počet typov multivalentných konfigurácií a celkový počet buniek.

Pre sterilných F_1 jedincov sa uvádza celkový počet párení a trvanie obdobia párenia. Uvedená je hmotnosť semenníkov a podrobnosti cytogenetickej analýzy.

Pre XO samice je uvedená priemerná veľkosť vrhu, pomer pohlaví v F_1 potomstve a výsledky cytogenetickej analýzy.

Ak je to možné, nosiči F_1 translokácií sa vopred selektujú testmi plodnosti. Tabuľky musia zahŕňať informácie o tom, pri koľkých z nich sa potvrdila translokačná heterozygota.

Uvádzané sú údaje z experimentov s negatívnou a pozitívnou kontrolou.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

- kmeň myší, vek zvierat, hmotnosť ovplyvnených zvierat,
- počet rodičovských zvierat každého pohlavia v experimentálnej a kontrolnej skupine,
- podmienky testu, podrobný opis ovplyvnenia, úrovne dávok, rozpúšťadlá, harmonogram párenia,
- počet a pohlavie potomkov na samicu, počet a pohlavie potomkov zohraných na analýzu translokácie,
- čas a kritériá analýzy translokácie,
- ak je to možné, počet a podrobný opis nosičov translokácie zahŕňajúci údaje o chove a údaje o obsahu maternice,
- cytogenetické metódy a podrobnosti o mikroskopickej analýze, pokiaľ možno s obrázkami,
- štatistické vyhodnotenie,

- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.26. **TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY
U HLODAVCOV/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda subchronickej toxicity je kópia OECD TG 408 (1998).

1.1. **ÚVOD**

Stanovenie a vyhodnotenie charakteristík toxicity danej chemickej látky, zistenie subchronickej orálnej toxicity metódou opakovaných dávok sa dá vykonať až po získaní východiskových informácií o toxicite z krátkodobých alebo 28-dňových testov. Táto 90-dňová štúdia poskytuje informácie o možných rizikách ohrozenia zdravia, ktoré pravdepodobne vznikajú vplyvom opakovaného pôsobenia počas dlhšieho časového obdobia, ktoré zahŕňa post-dojčacie, dospievanie a vývoj až do dospelosti. Štúdia poskytuje informácie o závažných toxických účinkoch, indikuje zasiahnuté orgány a možnosti akumulácie a umožňuje odhadnúť stupeň pôsobenia nezistených škodlivých účinkov, ktorý sa dá následne využiť pri výbere objemu dávok na dlhodobé štúdie a pri stanovení bezpečnostných kritérií ohľadom ich pôsobenia na človeka.

Táto metóda kladie dodatočný dôraz na neurologické koncové body a ponúka indikáciu imunologických a reprodukčných účinkov. Taktiež sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií. Táto štúdia umožňuje, aby sa pri identifikácii chemických látok bral do úvahy aj ich potenciál vplývať na orgány neurotoxickými, imunologickými účinkami a taktiež účinkami na reprodukciu, z čoho vyplýva následné hlbkové skúmanie.

Pozri Všeobecný úvod častí B.

1.2. **DEFINÍCIE**

Dávka: množstvo podávanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky na jednotkovú hmotnosť testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo konštantné dietetické koncentrácie (ppm).

Dávkovanie: všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie.

NOAEL: skratka pre stupeň nezistených škodlivých účinkov, je najvyššou možnou dávkou, pri ktorej sa neobjavili žiadne škodlivé nálezy v súvislosti s liečbou.

1.3. **PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY**

Testovaná látka sa podáva denne niekoľkým skupinám pokusných zvierat vo zvýšených dávkach, každá skupina zvierat dostáva určitú dávku počas 90 dní. V priebehu tohto obdobia sa na zvieratách dôkladne skúmajú príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas testu uhynú, sú následne pitvané a taktiež zvieratá, ktoré prežijú, sú na záver testu usmrtené a podrobené pitve.

1.4. **OPIS TESTOVACEJ METÓDY**

1.4.1. **Príprava zvierat**

Na test sa použijú zdravé zvieratá, ktoré sa aspoň päť dní aklimatizovali na laboratórne podmienky a ktoré neboli predtým podrobené žiadnym pokusom. Druh, rod, pôvod, pohlavie, váhu a/alebo vek zvierat sú presne stanovené. Do skupín budú zvieratá zadelené náhodným výberom a na takomto princípe sa budú vyberať aj na kontrolu. Kletky sa umiestnia v takom poradí, aby sa možné účinky vzhľadom na umiestnenie kletky minimalizovali. Každému zvieraťu sa pridelí identifikačné číslo.

1.4.2. **Príprava dávok**

Testovaná látka sa podáva cez trubicu priamo do žalúdka alebo v potrave alebo v pitnej vode. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky.

Látka sa podáva buď rozpustená alebo rozptýlená vo vhodnom materiáli. Odporúča sa, ak je to potrebné, uvažovať o použití vodných roztokov/suspenzií ako prvých v poradí, následne o roztokoch/emulziách v oleji (napr. kukuričnom) a až potom o roztokoch v iných materiáloch. Pri iných materiáloch ako voda je vhodné zistiť ich toxickú charakteristiku. Počas podávania testovanej látky je nevyhnutné zaistiť jej stálosť.

1.4.3. Podmienky testu

1.4.3.1. Pokusné zvieratá

Najvhodnejším zvieratom je potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Bežne sa používajú laboratórne druhy mladých zdravých dospelých zvierat. Samičky musia byť neplodné a neoplodnené. Dávkovanie musí začať čo najskôr po odstavení mláďat a skôr než zvieratá dovŕšia deväť týždňov. Na začiatku štúdie váhové odchýlky u zvierat sú minimálne a neprevyšujú $\pm 20\%$ priemernej váhy oboch pohlaví. Ak sa táto štúdia uskutočňuje ako predbežná k dlhodobej štúdii chronickej toxicity, v oboch štúdiách by sa mali použiť zvieratá toho istého druhu.

1.4.3.2. Množstvo a pohlavie

Na každej úrovni podávania dávok by sa malo použiť aspoň 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov). Ak sa medzitým naplánuje usmrtenie nejakých zvierat, mal by sa pred ukončením štúdie počet o tieto doplniť do pôvodného množstva pred usmrtením zvierat. Na základe doposiaľ získaných znalostí o danej chemickej látke alebo inej príbuznej látke sa odporúča po uplynutí testovaného obdobia venovať pozornosť, vrátane ďalšej satelitnej skupiny 10 zvierat (po piatich z každého pohlavia), kontrole a pozorovaniu skupiny s najvyššími dávkami, vratnosti a trvácnosti akýchkoľvek toxických účinkov. Trvanie tohto obdobia sa presne stanoví po uplynutí expozície s ohľadom na spozorované účinky.

1.4.3.3. Úroveň dávkovania

Bolo by vhodné absolvovať tento test aspoň na troch úrovniach so súbežnou kontrolou, okrem prípadov, v ktorých prebieha limitný test (pozri 1.4.3.4). Výšky dávkovania sa môžu zakladať na výsledkoch opakovaného dávkovania alebo mnohých zisťovacích štúdií a je potrebné prihliadať aj na jestvujúce toxikologické a toxikokinetické údaje, ktoré sú o testovanej látke alebo príbuzných látkach k dispozícii. Ak to nie je obmedzené fyzikálno-chemickou podstatou alebo biologickými účinkami testovanej látky, najvyššia hladina dávky by sa mala vybrať s cieľom vyvolať toxicitu, ale nie smrteľné alebo kruté utrpenie. Potom by sa malo prejsť na zostupnú postupnosť objemu dávkovania so zámerom preukázať, že každá dávka má za následok účinkov a že nebol spozorovaný škodlivý účinok pri najnižšej úrovni dávkovania (NOAEL). Na stanovenie zostupného dávkovania sú optimálne dvoj- až trojnásobné intervaly a pri štvrtej testovanej skupine sa odporúča dodržať veľmi veľké intervaly (napr. viac ako faktor 6-10) medzi dávkami.

Kontrolná skupina by mala byť neexponovaná skupina alebo skupina na kontrolu nosiča, ak sa nosič používa pri podávaní testovanej látky. Bez ohľadu na aplikovanie testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s tými, ktoré sú v testovanej skupine. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane tento v čo najväčšom množstve. Ak sa testovaná látka podáva v potrave a spôsobuje redukciu príjmu potravy, potom je vhodné použiť dve súčasne kŕmené kontrolné skupiny na odlíšenie redukcie zapríčinené nechutenstvom alebo toxikologickými zmenami testovanej vzorky.

Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: účinky na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retencia testovanej látky; účinky na chemické vlastnosti testovanej látky, ktoré môžu pozmeniť jej toxické vlastnosti a vplyvy na spotrebu krmiva a vody alebo na stav výživy zvierat.

1.4.3.4. Limitný test

Ak sa počas testu pri jednej úrovni dávkovania, s dávkami aspoň 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň a pri dodržaní postupov opísaných v tejto štúdii, nezískajú žiadne údaje o škodlivých účinkoch a ak toxicita nedosiahne očakávanú úroveň na základe údajov na štruktúrne príbuzné látky, potom vôbec nie je potrebné uvažovať o komplexnej štúdii s tromi úrovňami. Limitný test sa nepoužíva v prípadoch, ak pôsobenie látky na človeka indikuje potrebu vyššej úrovne dávkovania.

1.5. POSTUP

1.5.1. Podávaná dávka

Zvieratám sa podáva dávka s testovanou látkou denne počas siedmich dní v týždni po obdobie 90 dní. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, musí byť opodstatnené. Ak je testovaná látka podávaná trubicou, musí sa toto vykonať v jednej dávke pre zviera, s použitím žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubáčnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý môže byť naraz podaný, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Objem nesmie presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, s výnimkou prípadu vodných roztokov, kde sa môže použiť dávkovanie 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Variabilita testovaných objemov sa

zminimalizuje nastavením/adjustáciou/koncentrácií s cieľom zaistenia konštantných objemov vo všetkých úrovniach dávkovania. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré za normálnych okolností preukazujú zhoršujúci sa účinok vo vysokých koncentráciách, variabilita/odlišnosti/testovaných objemov sa minimalizuje určením koncentrácií tak, aby sa zaistil konštantný objem na všetky hladiny dávkovania.

Pre látky, ktoré sú podávané spolu s potravou alebo pitnou vodou, je dôležité zabezpečiť, aby množstvo obsiahnutých testovaných látok neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná látka podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia, (ppm) alebo konštantná úroveň dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvierat; alternatívne používanie je potrebné špecifikovať. Dávka látok podávaných cez trubicu sa musí podávať každý deň v rovnakom čase a musí sa regulovať tak, aby sa udržiavala konštantná úroveň dávkovania so zreteľom na telesnú hmotnosť zvierat. Ak sa uplatňuje 90-dňová štúdia ako predbežná k dlhodobej štúdii chemickej toxicity, je potrebné použiť rovnakú potravu v oboch štúdiách.

1.5.2. Pozorovania

Doba pozorovania by mala trvať aspoň 90 dní. Zvieratá v satelitných skupinách, určené podľa plánu na kontrolné pozorovania, by na určitý čas nemali byť vystavené pôsobeniu testovanej látky, aby sa detegovala stálosť alebo aby sa zotavili z toxických účinkov.

Všeobecné klinické pozorovania by sa mali vykonávať najmenej raz denne, najmä v rovnakom čase každý deň, berúc do úvahy vrchol doby predvídaných účinkov po dávkovaní. Klinické podmienky zvierat musia byť zaznamenané. Všetky zvieratá sa podrobia kontrole patologických zmien a mortality najmenej dvakrát denne, obvykle na začiatku a konci každého dňa.

Detailné klinické pozorovania na všetkých zvieratách vykonáme najmenej raz pred prvou expozíciou (aby sa umožnilo porovnanie v rámci subjektov) a raz za týždeň po expozícií. Tieto pozorovania sa vykonávajú mimo domu, kletky, radšej v štandardnej aréne a v podobnom čase pri každej príležitosti. Musia byť pozorne zaznamenané, s použitím hodnotiaceho systému explicitne definovaného testovacím laboratóriom. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaní. Pozorované znaky zahŕňajú, ale nie sú limitované, zmeny na koži, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie a vylučovania autonómnej aktivity (ako napr. slzenie, piloerкция, veľkosť zreníc, neobvyklé dýchanie). Zmeny v chôdzi, držaní tela a odozve na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť kónických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. opakované točenie sa), prílišné ošetrovanie sa alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie) musia byť tiež zaznamenané.

Oftalmologické vyšetrenia, pri ktorých sa používajú oftalmoskopy alebo iné ekvivalentné vhodné zariadenia, sa vykonávajú pred podaním testovanej látky a po ukončení štúdie najlepšie na všetkých zvieratách, ale najmenej v skupine s vysokou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa zistia zmeny na očiach, musia byť všetky zvieratá otestované.

Ku koncu expozičnej periódy a v žiadnom prípade nie skôr ako v jedenástom týždni sa skontroluje senzorická reaktivita na stimuláciu rôznych typov (1), napr. zvuková, vizuálna a propioceptívna stimulácia (2), (3), (4), odhadnutie intenzity zovretia (5) a odhad motorickej aktivity (6). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú dané v uvedenej použitej literatúre. Je možné použiť aj iné alternatívne postupy k tomu, čo tu bolo doposiaľ napísané.

Pozorovanie funkčných porúch vykonávané ku koncu štúdie možno vynechať, ak sú údaje o pozorovaní funkčných porúch dostupné z iných štúdií a ak denné klinické pozorovanie neprekáža žiadnej funkčnej poruche.

Výnimočne je možné vynechať funkčné pozorovania pre skupiny s inými znakmi stupňa toxicity, značne interferujú s funkčným testom na účinnosť.

1.5.2.1. Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí najmenej raz za týždeň. Ak sa testovaná látka podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa musí merať raz za týždeň. Spotreba má tiež význam pre dietetické štúdie alebo štúdie s použitím trubice, počas ktorých sa môže meniť.

1.5.2.2. Hematológia a klinická biochémia

Krvné vzorky sa odoberajú z označených miest a uložia sa za vhodných podmienok. Na konci testovacej periódy sa vzorky zozbierajú práve pred utratením alebo ako časť procedúry utratenia zvierat.

Nasledujúce hematologické vyšetrenia sa vykonávajú na konci testovacej doby, ak sú všetky predbežné vzorky zozbierané: hematorit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový diferenciálny počet leukocytov, počet krvných doštičiek, meranie zrážanlivosti krvi/potenciál.

Klinické biochemické stanovenia vyšetrujúce hlavné toxické účinky v tkanive a špecifický vplyv na obličky a pečeň sa vykonávajú na krvných vzorkách získaných od každého zvieraťa práve pred utratením alebo ako súčasť procedúry utratenia zvierat (okrem zistených ako umierajúcich a/alebo zabitých). V podobných metódach hematologických vyšetrení sa môže vykonať predložené vzorkovanie na klinické biochemické testy. Odporúča sa, aby sa zvieratá pred odobratím vzoriek krvi cez noc postili⁽¹⁾. Zisťovanie v plazme alebo sére zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, dusík z močoviny v krvi, kreatín, celkové bielkoviny a albumín a viac ako dva indikujúce hepatocelulárne (účinky na pečenevé bunky) účinky ako napr. alanín, aminotransferázy, aspartát aminotransferázy, alkalická fosfatáza, gama glutamyl transpeptidáza a sorbitol dehydrogenáza. Za istých okolností sem môžeme zahrnúť aj merania ďalších enzýmov (hepatické alebo iného pôvodu) a žlčových kyselín, ktoré môžu poskytnúť užitočné informácie.

Podľa potreby sa nasledujúce zistenia v analýzach moču môžu vykonať počas posledného týždňa štúdie a použije sa časový zber objemu moču: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, bielkoviny, glukóza a krv/krvné bunky.

Okrem toho by sa mali brať do úvahy aj štúdie na vyšetrenie sérových markerov v základných poškodených tkanivách. Ostatné zisťovanie je možné uskutočniť, ak poznáme vlastnosti, ktoré môžu alebo sa o nich predpokladá, že vplývajú na príbuzné metabolické profily zahrňujúce vápnik, fosfor urýchľovacie triglyceridy, špecifické hormóny, methemoglobín a cholinesterázu. Preto je ich nutné identifikovať ako chemické látky v určitých triedach alebo ako individuálne v závislosti od prípadu.

Celkove je potrebný flexibilný prístup, ktorý závisí od druhov a pozorovaných a/alebo očakávaných účinkov danej látky.

Ak sú historické základné údaje neprimerané, je treba zvážiť, či premenné hematologické a premenné klinické biochémie je potrebné stanoviť pred začatím dávkovania, nie je všeobecne odporúčené, aby tieto údaje boli zisťované pred liečbou.

1.5.2.3. Všeobecná pitva

Všetky zvieratá v štúdií budú predmetom úplnej detailnej pitvy, ktorá zahŕňa podrobné vyšetrenie externého povrchu tela a všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny. Pečeň, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, maternica, vaječníky, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, ktoré chradnú a/alebo zvierat, ktoré boli predtým utratené) by sa mali pitvať na nejakej príľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie zistiť ich mokrú hmotnosť skôr, ako pri pitve vyschnú.

Nasledujúce tkanivá by mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na následné histopatologické skúšky: všetky závažné poškodenia, mozog/reprezentatívne oblasti, zahrňujúce veľký mozog, mozoček, Varolov most/, miecha (v troch úrovniach: krčná, hrudná, bedrová), hypofýza, štítna žľaza, prištítna žľaza, týmus, pažerák, slinné žľazy, žalúdok, tenké a hrubé črevo, Peyerove žľazy, pečeň, obličky, pankreas, nadobličky, slezina, srdce, priedušnica a pľúcne laloky (ochránené nafúknutím, fixáciou a potom ponorením), aorta, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, samičie mliečne žľazy, prostata, močový mechúr, žlčník, lymfatické uzliny (uprednostňujúc jednu lymfatickú uzlinu pokrývajúcu cestu šírenia a druhú, vzdialenú od tejto cesty šírenia na pokrytie systémového vplyvu), periférne nervy (sedacie alebo holenné) najlepšie v tesnej blízkosti svalov, časť kostnej drene (a/alebo získať čerstvú kostnú dreň), koža a oči (ak boli zistené zmeny počas oftalmologických vyšetrení). Z klinických a iných nálezov môže vyplývať potreba vyšetrenia ďalších dodatočných tkanív. Takisto by mali ostať zachované orgány považované za cieľové orgány, založené na známych vlastnostiach testovanej látky.

1.5.2.4. Histopatológia

Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozširujú o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.

⁽¹⁾ Pri množstve meraní v sére a plazme, najvýznamnejšie na meranie glukózy, sa preferuje nechať zvierat cez noc bez potravy. Hlavný dôvod tohto uprednostňovania je, že zvýšená variabilita, ktorá je nutným následkom pri podávaní stravy/nepostení sa/, môže mať tendenciu zakryť nepatrné účinky, a tým sťažiť následné vyhodnotenie. Na druhej strane, hoci celonočný pôst môže interferovať s obecným metabolizmom zvierat a predovšetkým v štúdiách o kŕmení, denné pôsobenie testovanej látky sa týmto môže narušiť. Ak sa pristúpi na celonočný pôst, klinické biochemické stanovenia sa vykonávajú po kontrole funkčných pozorovaní štúdie.

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

1.5.2.5. *Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.*

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

2. **ÚDAJE A HLÁSENIE**

2.1. **ÚDAJE**

Po získaní jednotlivých údajov sa všetky tieto následne zosumarizujú v tabuľkovej forme, vykazujúcej na každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet nájdených mŕtvych zvierat počas testu alebo usmrtených z humanitných dôvodov a čas smrti alebo čas usmrtenia z humanitných dôvodov, počet vykázaných znakov toxicity, opis zistených znakov toxicity, zahrňujúcich čas vzniku, trvanie sily toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich lézie (poškodenia), typ lézií a percento zvierat vykazujúcich každý typ lézie.

Ak je to možné, numerické výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré sa podrobia analýze, sa vyberú počas prípravy koncepcie štúdie.

2.2. **SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. **Testovaná látka:**

- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné údaje,
- nosič (ak je to vhodné): opodstatnenosť výberu nosiča, ak je iný ako voda.

2.2.2. **Testovaný druh:**

- druhy a rody používaných zvierat,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky uskladňovania, potrava atď.,
- individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

2.2.3. **Podmienky testu:**

- odôvodnenie na výber úrovne hladiny dávky,
- podrobnosti formulácie testovanej látky/príprav a potravy, dosiahnutá koncentrácia, stabilita a homogenita prípravy,
- podrobnosti o podávaní testovanej látky,
- aktuálne dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) a faktov konverzie z potravy/pitnej vody, testovanej látky, koncentrácia na aktuálnu dávku,
- detaily o kvalite potravy a vody.

2.2.4. **Výsledky:**

- telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

- spotreba potravy a spotreba vody, ak je to možné,
- údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky, zahrňujúce známky toxicity,
- charakter, prudkosť a trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),
- výsledky oftalmologických vyšetrení,
- odhad senzorickej aktivity, intenzity stlačenia, zovretia a motorickej aktivity (ak sú informácie k dispozícii),
- hematologické testy s významnými základnými hodnotami,
- klinické biochemické vyšetrenia s príslušnými výstupnými normálnymi hodnotami,
- konečná telesná hmotnosť, hmotnosť orgánov a pomer hmotnosti orgánov k telesnej hmotnosti,
- pitevné nálezy,
- detailné opisy všetkých histopatologických nálezov,
- absorpčné údaje, ak sú dostupné,
- štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Diskusia o výsledkoch

Záver

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

- (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, 999 – 1003.
- (3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, 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, 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. Toxicol.*, 1, 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, 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, 198 – 201.

B.27. **TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U NEHLODAVCOV**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda subchronickej orálnej toxicity je kópiou OECD TG 409 (1998).

1.1. **ÚVOD**

Stanovenie a vyhodnotenie toxických charakteristík toxicity chemikálie, stanovenie subchronickej orálnej toxicity metódou opakovaných dávok, môže byť vykonané až po získaní východiskových informácií o toxicite z krátkodobých alebo 28-dňových testov metódou opakovaných dávok. 90-dňová štúdia poskytuje informácie o možných rizikách ohrozenia zdravia, ktoré môžu vzniknúť pri opakovanom vystavení sa počas obdobia rýchleho rastu a do mladej dospelosti. Štúdia poskytuje informácie o hlavných toxických účinkoch, určuje cieľové orgány a možnosti akumulácie. Ďalej umožňuje odhad úrovne nezistených nepriaznivých účinkov pôsobenia látky, ktoré je možné použiť pri výbere úrovne dávok na dlhodobé štúdie a na ustanovenie bezpečnostných kritérií s ohľadom na ich vplyv na človeka.

Testovacia metóda umožňuje identifikáciu nepriaznivých účinkov pôsobenia na druhy nehlodavcov a používa sa iba:

- ak účinky zistené inými štúdiami indikujú potrebu vyjasnenia/charakterizácie v druhom druhu nehlodavcov alebo
- ak toxiko-kinetická štúdia indikuje, že použitie špecifických nehlodavcových druhov je najdôležitejším výberom laboratórnych zvierat, alebo
- ak iné špecifické dôvody zdôvodňujú použité nehlodavcové druhy.

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **DEFINÍCIE**

Dávka: množstvo podávanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky per jednotkovú hmotnosť testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo konštantné dietetické koncentrácie (ppm).

Dávkovanie: všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie.

NOAEL: skratka pre stupeň nezistených škodlivých účinkov a je najvyššou možnou dávkou, pri ktorej sa neobjavili žiadne škodlivé nálezy v súvislosti s liečbou.

1.3. **PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY**

Testovaná látka je podávaná denne, orálne, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám testovaných zvierat, jedna úroveň dávky na skupinu počas 90-tich dní. Počas tohto obdobia sú na zvieratách dôkladne pozorované prípadné znaky toxicity látok. Zvieratá, ktoré uhynú alebo sú usmrtené počas testu, sú pitvané a na záver testu sú usmrtené a pitvané aj zvieratá, ktoré prežili.

1.4. **OPIS TESTOVACEJ METÓDY**

1.4.1. **Výber druhov zvierat**

Obvykle používaný druh nehlodavcov je pes, ktorý by mal mať definované plemeno, často je používaný druh malého stavača. Môžeme tiež použiť aj iné druhy ako napr. ošípané, mini-prasiatka. Primáty sa neodporúčajú a ich použitie musí byť odôvodnené. Používajú sa mladé zdravé zvieratá a v prípade psov dávkovanie začína v 4 – 6. mesiaci a nie neskôr ako v 9. mesiaci veku psa. Ak je štúdia usmerňovaná ako predbežná dlhodobá štúdia chronickej toxicity, musia sa použiť v oboch štúdiách rovnaké plemená/druhy.

1.4.2. Príprava zvierat

Môžu sa použiť mladé zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali v laboratórnych podmienkach a neboli predmetom predchádzajúcich experimentálnych postupov. Dĺžka aklimatizácie závisí od vybraných testovaných druhov a ich zdrojov. Odporúča sa najmä 5 dní pre psov alebo účelovo chované ošípané s rezidentských kolónií a najmenej dva týždne pre tie zvieratá, ktoré sú z vonkajších zdrojov. Testované zvieratá majú byť charakterizované podľa druhu, rodu, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Zvieratá by mali byť postupne zadelené do kontrolných a liečebných skupín. Klieťky by mali byť umiestnené takým spôsobom, aby sa minimalizoval vplyv vzhľadom na ich rozmiestnenie. Každé zviera by malo byť označené svojim identifikačným číslom.

1.4.3. Príprava dávok

Testovaná dávka sa podáva v potrave alebo v pitnej vode cez trubicu priamo do žalúdka alebo v kapsulách. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálno-chemických vlastností testovaného materiálu.

V prípade potreby sa testovaná látka rozpustí alebo vytvorí suspenziu vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, ak je to možné, uvažovalo o použití vodných roztokov/suspenzií ako prvých v poradí, nasledovaných začlenením roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a až potom o možných roztokoch v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Stanoví sa stabilita testovanej látky za podmienok podávania.

1.5. POSTUP**1.5.1. Počet a pohlavie zvierat**

Pre každú úroveň dávky sa použije aspoň 8 zvierat (štyri samice a štyri samce). Ak sa plánujú predbežné usmrtenia, počet zvierat by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené pred kompletizáciou štúdie. Počet zvierat, ktoré ukončia štúdiu, musí byť primeraný na zmysuplné vyhodnotenie toxických účinkov. Na základe predošlých znalostí o látke alebo jej blízkych analógoch dôraz sa kladie na zahrnutie doplnkových satelitných skupín s ôsmimi zvieratami (štyri na každé pohlavie) v kontrolnej skupine a v skupine s najvyšším dávkovaním na pozorovanie reverzibility po období, ak boli podrobené vplyvu nejakých toxických účinkov. Trvanie tohto obdobia po vystavení účinkom sa stanoví s ohľadom na zistené vplyvy.

1.5.2. Dávkovanie

Tento test je vhodné vykonať najmenej v troch hladinách dávky a súbežne kontrolovať, s výnimkou testov, v ktorých sa prevádza limitný test (pozri 1.5.3). Úroveň dávky sa môže zakladať na výsledkoch štúdií opakovaného dávkovania alebo štúdií rozsahu nálezov a malo by sa prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné na testovanú zlúčeninu alebo príbuzné materiály. Ak to nie je limitované fyzikálno-chemickou podstatou alebo biologickými účinkami testovanej látky, najvyššia dávka by sa mala vybrať s cieľom vyvolať toxicitu, ale nie úhyn alebo kruté utrpenie. Potom prejdeme na klesajúcu postupnosť úrovní hladín dávkovania so zámerom preukázať, že každá dávka má za následok reakciu, odozvu a že nebol pozorovaný škodlivý účinok pri najnižšej hladine dávkovania (NOAEL). Dvoj- až štvornásobné intervaly sú často optimálne pri stanovení zostupných hladín dávkovania a pre dodatočnú štvrtú testovanú skupinu sa často dodržiavajú veľmi veľké odstupny (napr. viac ako faktor 6-10) medzi dávkami.

Kontrolná skupina je skupina, ktorá nebola podrobená účinkom testovaných materiálov, alebo skupina kontroly nosiča, ak bol nosič používaný pri podávaní testovanej látky. Bez ohľadu na aplikovanie testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine zaobchádzame rovnakým spôsobom ako s tými, ktoré sú v testovanej skupine. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina ho dostane v čo najväčšom množstve. Ak sa testovaná látka podáva v potrave a spôsobuje redukciu príjmu potravy, potom je vhodné použiť dve súčasne kŕmené skupiny na rozlíšenie zníženia príjmu potravy kvôli nechutenstvu alebo toxikologickým zmenám v testovacom modeli.

Je potrebné venovať náležitú pozornosť nasledujúcim vlastnostiam nosiča a iných aditív: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej látky, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej látky, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat.

1.5.3. Limitný test

Ak test pri jednej hladine dávkovania ekvivalentnej najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň, ktorý využíva postupy opísané v tejto štúdií, neposkytne údaje o zistených škodlivých účinkoch a ak ich toxicita nebola na očakávanej úrovni na základe z údajov pre látku s príbuznou štruktúrou, potom nie je potrebné uvažovať o úplnej štúdií, ktorá využíva tri hladiny dávkovania. Limitný test sa uplatňuje, ak pôsobenie na človeka poukazuje potrebu použitia vyššej hladiny dávkovania.

1.5.4. Podávanie dávok

Zvierať sa aplikuje dávka s testovacou látkou denne počas siedmich dní v týždni v období 90-tich dní. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. 5 dní v týždni, musí byť opodstatnené. Ak je testovaná látka podávaná cez trubicu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera za použitia žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubáčnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý môže byť naraz podaný, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Obvykle je objem čo najmenší. S výnimkou dráždivých alebo korozívnych látok, ktoré bežne preukazujú zhoršujúci sa účinok vo vysokých koncentráciách, variabilita testovaných objemov sa minimalizuje nastavením koncentrácií tak, aby sa zaistil konštantný objem pre všetky hladiny dávkovania.

Pre látky, ktoré sú podávané ako súčasť potravy alebo pitnej vody, je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej látky neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná látka podávaná v potrave, je možné použiť buď konštantnú dietetickú koncentráciu (ppm), alebo konštantnú hladinu dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Látky podávané cez trubicu alebo v kapsuliach podávame každý deň v rovnakom čase a nastavíme ich dávkovanie tak, aby sa dodržalo konštantné dávkovanie vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Ak sa 90-dňová štúdia použije ako predbežná štúdia na dlhodobú štúdiu chronickej toxicity, podávame podobnú potravu v oboch štúdiách.

1.5.5. Pozorovania

Doba pozorovania má byť najmenej 90 dní. Zvieratá v satelitných skupinách, naplánované na nasledujúce pozorovania, budú určitú dobu bez vystavenia účinkom testov s cieľom detegovať stálosť alebo zotavenie sa z toxických účinkov.

Všeobecné klinické pozorovania sa budú vykonávať najmenej raz denne, najlepšie každý deň v rovnakom čase, s ohľadom na vrchol doby očakávaných účinkov po dávkovaní. Klinické podmienky zvierat musia byť zaznamenané najmenej dvakrát denne, obvykle na začiatku a konci dňa sú zvieratá podrobené kontrole patologických zmien a úmrtnosti.

Detailné klinické pozorovania na všetkých zvieratách sa vykonávajú najmenej jedenkrát pred prvou expozíciou (aby sa umožnilo v rámci subjektov porovnanie), raz za týždeň po expozícií. Tieto pozorovania sa vykonávajú v domovskej kletke v štandardnej arene a najlepšie v rovnakom čase pri každej príležitosti. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaním. Znamky toxicity musia byť podrobne zaznamenané, musia zahŕňať čas nasadenia, stupeň a trvanie. Ak nie sú pozorovania limitované, musia obsahovať zmeny na pokožke, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a vylučovanie a automatické činnosti (napr. lakrimácia, pilo-erekcia, veľkosť zreníc, neobvyklé dýchanie). Zaznamenané budú: zmeny v chôdzi, držaní tela, v reakcii na manipuláciu, ako aj prítomnosť klonických alebo napätých pohybov, stereotypy (napr. točenie, nadmerné čistenie) alebo iné zvláštne správanie.

Oftalmologické vyšetrenia, pri ktorých sa používajú oftalmoskopy a iné ekvivalentné vhodné zariadenia, sa vykonávajú pred podávaním testovanej látky a po ukončení štúdie, najlepšie na všetkých zvieratách, ale najmenej v skupine s vysokými dávkami a v kontrolnej skupine. Ak sa po vystavení zvierat účinkom látky zistia zmeny na očiach, musia byť vyšetrené všetky zvieratá.

1.5.5.1. Telesná hmotnosť, spotreba vody a potravy

Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí týždenne. Ak sa testovaná látka podáva vo vode na pitie, spotrebu vody je tiež potrebné merať raz za týždeň. Spotreba vody môže byť tiež významná na dietetické štúdie alebo štúdie s použitím trubice, počas ktorých je možné túto meniť.

1.5.5.2. Hematológia a klinická biochémia

Krvné vzorky sa odoberajú z označených miest a uložia sa za vhodných podmienok. Na konci testovacej periódy sa vzorky zozbierajú práve pred alebo ako súčasť procedúry utratenia zvierat.

Hematológia vrátane hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocyto, počet krvných doštičiek a meranie potenciálu zrážanlivosti, ako napríklad doba zrážanlivosti, doba protrombínu alebo tromboplastov, sa vyšetruje na začiatku štúdie, potom v mesačných intervaloch alebo v polovici testovacej periódy a na konci testovacej periódy.

Klinické biochemické vyšetrenia, ktoré skúmajú hlavne toxické vplyvy na tkanivá a špecifický účinok na pečeň alebo obličky, sa vykonávajú na krvných vzorkách, získaných od zvierat na začiatku, potom v mesačných intervaloch alebo v polovici testovacej periódy a na konci testovacej periódy. Pozornosť sa upriami najmä na tieto testované parametre: rovnováha elektrolytov, metabolizmus karbohydrátov, funkcia pečene a obličiek. Výber špecifických testov ovplyvňuje pozorovania druhov reakcií na testovanú látku. Zvieratá by sa mali poistiť pred odberom krvných vzoriek, počas obdobia vhodného na daný druh. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú

stanovenie vápnika, fosforu, chloridov, sodíka, draslíka, glukózy, alanínaminotransferázy, aspartátu aminotransferázy, ornithínu, dekarboxylázy, gama-glutamyl, transpeptidázy, močovínového dusíka, albumínu, krvného kreatínu, celkového bilirubínu a celkový protein v sére.

Výšetrenia moču sa vykonávajú najmenej na začiatku, potom v strede a na konci štúdie, pri ktorej sa využíva časový zber objemu moču. Výšetrenia zahŕňajú vzhľad, objem, osmolalitu alebo špecifickú hmotnosť, pH, bielkovinu, glukózu a krv alebo krvné bunky. Dodatočné parametre môžu byť vyšetrované, ak je potrebné rozšíriť vyšetrovanie získaných účinkov.

Okrem toho sa zvažuje vykonanie štúdie vyšetrujúcej markery základných poškodených tkanív. Iné stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na primerané toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú analýzu lipidov, hormónov, acido/bazickú rovnováhu, methemoglobín a inhibíciu cholinesterázy. Dodatočne sa môže uskutočniť aj ďalšia klinická biochémia, ak je potrebné rozšíriť vyšetrenie zistených účinkov. Je ich potrebné identifikovať pre chemické látky v určitých skupinách alebo posúdiť prípad po prípade.

Celkovo sa požaduje flexibilný prístup, ktorý závisí od druhu zvierat a pozorovaných a/alebo očakávaných účinkov danej látky.

1.5.5.3. *Všeobecná, celková pitva*

Všetky zvieratá v štúdií budú predmetom úplnej detailnej všeobecnej pitvy, ktorá zahŕňa pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej, brušnej dutiny a ich obsahu. Pečeň, žľazník, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, vaječníky, maternica, štítna žľaza spolu s prístítnou žľazou, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, u ktorých sa zistilo chradnutie alebo predchádzajúce utratenie) by mali byť upravené na nejakej príľnavej tkanine a ich mokrá hmotnosť sa zistí čo najskôr, kým orgány pri pitve nevyschnú.

Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické skúšky: všetky závažné poškodenia, mozog (reprezentatívne oblasti zahrňujúce veľký mozog, mozoček, Varolov most, miecha (v troch úrovniach: krčná, hrudná, bedrová), hypofýza, štítna žľaza, prístítna žľaza, týmus, pažerák, slinné žľazy, žalúdok, tenké a hrubé črevo, Peyerove žľazy, pečeň, pankreas, obličky, nadobličky, slezina, srdce, priedušnica a pľúcne laloky (ochránené nafúknutím, fixáciou a potom ponorením), aorta, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, samičie mliečne žľazy, prostata, močový mechúr, žľazník, lymfatické uzliny (uprednostňujúc jednu lymfatickú uzlinu pokrývajúcu cestu šírenia a druhú, vzdialenú od tejto cesty, šírenia pokrytia systematických účinkov), periférne nervy (sedacie alebo holenné), najlepšie v tesnej blízkosti svalov, časť kostnej drene (a/alebo získať čerstvú kostnú dreň), koža a oči (ak boli zistené zmeny počas oftalmologických vyšetrení). Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších následných tkanív. Takisto by sa mali zachovať orgány považované za cieľové orgány, založené na známych vlastnostiach testovanej látky.

1.5.5.4. *Histopatológia*

Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozšíria o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

Všetky závažné poškodenia budú preskúmané.

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

2. ÚDAJE A SPRÁVA

2.1. ÚDAJE

Po získaní jednotlivých údajov sa tieto zosumarizujú v tabuľkovej forme, vykazujúcej pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet nájdených mŕtvych zvierat počas testu alebo usmrtených z humanitných dôvodov a čas smrti alebo čas usmrtenia z humanitných dôvodov, počet vykázaných znakov toxicity, opis zistených znakov toxicity, zahrňujúcich čas vzniku, trvanie sily toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich lézie (poškodenia), typ lézií a percento zvierat vykazujúcich každý typ lézie.

Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodne a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, budú vybrané počas tvorby dizajnu štúdie.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. Testovaná látka:

- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné údaje,
- nosič (ak je to vhodné): opodstatnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

2.2.2. Testovaný druh:

- druhy a rody používaných zvierat,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky uskladnenia, potrava atď.,
- individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

2.2.3. Podmienky skúšky (testu):

- odôvodnenie na výber hladiny dávky,
- detaily o testovanej látke, formulácia/príprava potravy, dosiahnuté koncentrácie, stabilita a homogenita prípravy,
- detaily o podávaní testovanej látky,
- aktuálne dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej látky v (ppm), ak je to možné,
- detaily o kvalite potravy a vody.

2.2.4. Výsledky:

- telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,
- spotreba potravy a spotreba vody, ak je to možné,
- údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky, zahŕňujúce známky toxicity,
- charakter, trvanie a trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),
- výsledky oftalmologických vyšetrení,
- hematologické testy s významnými základnými hodnotami,
- odkazy senzorickej aktivity, intenzity stlačenia, zovretia a motorickej aktivity (ak sú dostupné),
- konečná telesná hmotnosť, hmotnosť orgánov a pomer hmotnosti orgánov k telesnej hmotnosti,
- pitevné nálezy,

- detailné opisy všetkých histopatologických nálezov,
- absorpčné údaje, ak sú dostupné,
- štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Diskusia o výsledkoch

Záver

B.28. **ŠTÚDIA SUBCHRONICKEJ DERMÁLNEJ TOXICITY PO 90-DŇOVEJ OPAKOVANEJ KOŽNEJ APLIKÁCII U HLODAVCOV**

1. **METÓDA**

1.1. **ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **DEFINÍCIA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. **REFERENČNÉ LÁTKY**

Žiadne.

1.4. **PODSTATA SKÚŠOBNEJ METÓDY**

Testovaná látka sa denne nanáša na kožu, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, každej skupine jedna úroveň dávky 90 dní. V priebehu obdobia podávania sa zvieratá každý deň pozorujú, aby sa zistili príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas skúšky uhynuli, a aj zvieratá, ktoré do konca skúšky prežili, sa pítvú.

1.5. **KRITÉRIÁ KVALITY**

Neustanovené.

1.6. **OPIS TESTOVACEJ METÓDY**

Príprava

Najmenej päť dní pred testom si zvieratá zvykajú na chovateľské a výživové podmienky, v ktorých budú počas experimentu. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradia sa k pokusným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa zvieratám ostrihá srst' na chrbte. Vyholenie srsti je tiež prípustné, malo by sa však uskutočniť asi 24 hodín pred testom. Ostrihanie alebo oholenie je zvyčajne potrebné opakovať približne v týždenných intervaloch. Pri strihaní alebo holení srsti je potrebné dať pozor na to, aby sa neporanila koža. Pre aplikáciu testovanej látky sa pripraví najmenej 10 % povrchu tela. Pri rozhodovaní o veľkosti pripravovanej plochy kože, ktorá má byť zbavená srsti a o veľkosti krycieho obväzu treba vziať do úvahy hmotnosť zvierat. Pri testoch pevných látok, ktoré môžu byť v prípade potreby rozdrvené na prach, sa testovaná látka dostatočne navlhčí vodou, poprípade vhodnou pomocnou látkou, aby bol zaistený dostatočný styk s kožou. Kvapalné testované látky sa spravidla aplikujú neriedené. Aplikácia sa uskutočňuje päť až sedem dní v týždni.

Podmienky testovania

Pokusné zvieratá

Je možné použiť potkana, králiku alebo morča. Je možné použiť aj iné živočíšne druhy, ale ich použitie musí byť zdôvodnené. Na začiatku testu by nemali byť odchýlky hmotnosti použitých zvierat viac ako $\pm 20\%$ od prispôbenej strednej priemernej hodnoty. Ak sa uprednostňuje subchronická dermálna štúdia ako predbežná štúdia pred dlhodobou štúdiou, mal by byť v oboch štúdiách použitý rovnaký druh zvierat a rovnaký kmeň.

Počet a pohlavie

Pre každú pokusnú skupinu by sa malo použiť minimálne 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov) so zdravou kožou. Samičky nesmú byť ani po vrhu a ani nesmú byť gravidné. Ak majú byť počas testu usmrtené zvieratá, zvýši sa celkový počet zvierat o počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže vystaviť aj dodatočná skupina (satelitná skupina) s 20 zvieratami (10 samičiek a 10 samčekov) počas 90 dní najvyššej dávky, aby sa počas 28 dní po vystavení mohla sledovať reverzibilita, pretrvávajúce alebo oneskorené prejavy toxických účinkov.

Expozičné koncentrácie

Potrebné sú minimálne tri koncentrácie a jedna kontrolná skupina. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky sa zvieratá v kontrolnej skupine musia vystaviť rovnako ako pokusné zvieratá. Ak sa pre uľahčenie dávkovania používa pomocná látka, podáva sa kontrolnej skupine rovnakým spôsobom ako pokusným zvieratám, a to v rovnakom množstve, aké prijme skupina, ktorej sa aplikuje najvyššia dávka. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne. Testovaná látka by sa mala aplikovať každý deň približne v rovnakom čase a dávkovanie by malo byť pravidelne (týždenne alebo každých štrnásť dní) prispôbené, aby bolo konštantné vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieratá. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade došlo k toxickému účinku, ale aby zvieratá nehynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia koncentrácia by nemala spôsobovať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o úrovni vystavenia u človeka, najnižšia dávka by mala túto hodnotu prekročiť. V ideálnom prípade by mala stredná dávka spôsobiť len nízke toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, musia sa voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou, ako aj v kontrolných skupinách, by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa umožnilo výrazne vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky smeruje k závažnému podráždeniu kože, je potrebné znížiť dávku, čo u vysokej koncentrácie môže viesť k obmedzeniu alebo eliminácii iných toxických účinkov. Ak už došlo k závažnému poškodeniu kože, je potrebné test ukončiť a uskutočniť ho znova s nižšími koncentraciami.

Limitný test

Ak predbežná štúdia pri koncentrácii 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň alebo pri vyššej koncentrácii zodpovedajúcej prispôbenej vystaveniu u človeka, ak je táto známa, nevyvolá žiadne toxické účinky, nie je ďalšie testovanie nutné.

Doba pozorovania

Zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, včítane času úmrtia a času, v ktorom sa objavili a znova odznali toxické účinky.

Postup

Zvieratá sa chovajú jednotlivo v klietkach. Testovaná látka sa v ideálnom prípade zvieratám podáva sedem dní v týždni po dobu 90 dní.

Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by nemali byť ďalších 28 dní vystavené, aby sa dala zistiť reverzibilita toxických účinkov alebo pretrvávanie toxických účinkov. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanesie rovnomerne na plochu, ktorá sa rovná asi 10 % celkového povrchu tela. V prípade vysokotoxických látok môže byť táto plocha menšia, no mala by sa však pokryť čo najväčšou časťou tejto plochy čo najslabšou a najrovnomernejšou vrstvou.

Počas vystavenia sa testovaná látka udržiava v styku s kožou pomocou porézneho mulového obväzu a nedráždivej náplasti. Testovaná plocha sa ďalej vhodným spôsobom prekryje, aby sa mulový obväz a testovaná látka fixovali a aby zvieratá testovanú látku nepožili. K zamedzeniu požitia látky je možné použiť aj prostriedky pre obmedzenie voľnosti pohybu, celkové znehybnenie sa však neodporúča.

Po uplynutí doby vystavenia sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ možno vodou alebo iným vhodným spôsobom očistenia kože.

Všetky zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, vrátane času nástupu, závažnosti a trvania. Pozorovanie v klietke zahŕňa zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchacieho systému a krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotoriky a správania. Meranie spotreby potravy a hmotnosti zvierat sa uskutočňuje týždenne. Je nutné zaistiť pravidelnú kontrolu zvierat, aby pokiaľ možno počas testu nedochádzalo k stratám zvierat, napr. v dôsledku kanibalizmu, autolýzy tkanív alebo chybou pri premiestňovaní zvierat. Po ukončení fázy vystavenia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou zvierat satelitnej skupiny, pitvú. Zvieratá, ktoré sú pred smrťou, by sa mali vytriediť, humánne usmrtiť a pitvať.

U všetkých zvierat, včítane kontrolných, sa zvyčajne uskutočňujú nasledujúce vyšetrenia:

- Oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopom alebo rovnakého vhodného prístroja by sa malo vykonať pred vystavením testovanej látky a na konci štúdie, najlepšie u všetkých zvierat, aspoň však v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa na konci testu zistia zmeny na očiach, vyšetria sa všetky zvieratá.

- b) Na konci testu sa musia vykonať hematologické vyšetrenia, ktoré majú zahŕňať hodnotu hematokrytu, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, leukocytov, diferenciálny obraz, hemokoagulačné parametre ako testy zrážania krvi, zmeria sa napríklad čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas alebo počet trombocytov.
- c) Na konci testu by sa mali vykonať biochemické analýzy krvi. Pre tieto štúdie je vhodné analyzovať koncentráciu elektrolytov, metabolizmus glycidov, funkciu pečene a ľadvín. Výber špecifických testov bude odvodený z pozorovania spôsobu účinku látky. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápniku, fosforu, chloridov, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (s pôstnou periodou určenou pre druh zvierat a), hladiny sérovej glutamát-pyruvát transaminázy ⁽¹⁾, glutamát-oxalacetáttransaminázy ⁽²⁾, ornitín-dekarboxylázy, gama-glutamyltranspeptidázy, dusíku močoviny, albumínu, kreatinínu, celkového bilirubínu a celkových sérových bielkovín. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť nevyhnutné pre správne toxikologické hodnotenie, patrí stanovenie lipidov, hormónov, rovnováhy kyselín a zásad, methemoglobínu a aktivity cholinesterázy. Dodatočné biochemické analýzy môžu byť použité, ak je nevyhnutné prehĺbenie vyšetrenia pozorovaných toxických účinkov.
- d) Analýza moču nie je spravidla potrebná, potrebná je vtedy, ak sa očakáva alebo pozoruje toxický účinok.

Ak údaje z predošlých testov boli nepreukázané, mal by sa brať ohľad na hematologické a biochemické parametre ešte pred začiatkom testu.

Autopsia

U všetkých zvierat zúčastňujúcich sa na teste sa musí vykonať kompletná autopsia skladajúca sa z vonkajšej prehliadky povrchu tela, všetkých telesných otvorov, lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny, včítane ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa musia čo najskôr po sekcii odvážiť vlhké, aby sa predišlo vysušeniu. Nasledujúce orgány a tkanivá je nutné uchovať vo vhodnom médiu pre prípadné neskoršie histopatologické vyšetrenia: všetky orgány s makroskopickými zmenami, mozog – vrátane medulla/pons, kôry malého a veľkého mozgu, hypofýza, štítna žľaza/prištítna žľaza, všetky týmusové tkanivá, (priedušnice), pľúca, srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica, akcesórne pohlavné orgány, žĺčník (ak je prítomný), ezofagus, žalúdok, dvanásnik, jejunum, ileum, caecum, kolon, rektum, močový mechúr, reprezentatívne lymfatické uzliny, (samičie prsné žľazy), (svalstvo stehna), nervy periférneho systému, (oči), (hrudná kosť s kostnou dreňou), (femur včítane povrchu kĺbu), (miecha v troch úrovniach – oblasť krku, toraxu a bedier) a (extraorbitálna slzná žľaza). Tkanivá uvedené v zátvorkách sa vyšetrujú iba v prípade, ak je možné na ich postihnutie usudzovať na základe príznakov toxicity alebo pokiaľ súvisia s cieľovým orgánom.

Histopatologické vyšetrenie

- a) Kompletné histopatologické vyšetrenie normálnej a exponovanej kože, orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat kontrolnej skupiny a u zvierat skupiny, ktorým bola aplikovaná najvyššia dávka.
- b) Vyšetria sa všetky orgány s makroskopickými zmenami.
- c) Vyšetria sa cieľové orgány zvierat ostatných dávkových skupín.
- d) Ak sa použijú potkany, pľúca zvierat v skupinách s nízkou a strednou koncentráciou sa histopatologicky vyšetria k zisteniu príznakov infekcie, aby to umožnilo vhodné posúdenie zdravotného stavu zvierat. Uváži sa vhodnosť histopatologického vyšetrenia pečene a obličiek u zvierat týchto skupín. Ďalšie histopatologické vyšetrenie sa u zvierat týchto skupín nesmie uskutočňovať rutinne, musí sa však uskutočniť vždy na orgánoch, na ktorých boli zistené zmeny v skupine s najvyššou koncentráciou.
- e) U zvierat satelitnej skupiny sa musia histopatologicky vyšetriť tie tkanivá a orgány, ktoré vo vystavených skupinách reagujú na testovanú látku.

2. ÚDAJE

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky, pričom sa uvedie u každej pokusnej skupiny počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat so zmenami, druh zmien, ako aj percento zvierat pre každý druh zmeny. Výsledky sa vyhodnotia vhodným štatistickým postupom. Môže byť použitá akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

⁽¹⁾ V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.

⁽²⁾ V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu obsahuje, pokiaľ možno, tieto informácie:

- živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo,
- podmienky testu,
- expozičné koncentrácie (včítane pomocnej látky, ak je použitá) a koncentrácie,
- údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a dávky,
- koncentrácie bez účinku, pokiaľ je možné ju stanoviť,
- čas úmrtia počas experimentu, prípadne údaj o prežití zvierat do konca testu,
- opis toxických alebo iných účinkov,
- čas, keď boli pozorované jednotlivé abnormálne príznaky a ich ďalší vývoj,
- údaje o spotrebe potravy a o telesnej hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- uskutočnené hematologické vyšetrenia a ich výsledky,
- uskutočnené biochemické vyšetrenia a ich výsledky (včítane výsledkov prípadných analýz moču),
- sekčné nálezy,
- podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
- štatistické vyhodnotenie výsledkov tam, kde je to možné,
- diskusia k výsledkom,
- vyhodnotenie výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.29. TEST TOXICITY SUBCHRONICKEJ INHALÁCIE 90-DŇOVÝ TEST OPAKOVANÉHO INHALAČNÉHO VYSTAVENIA NA HLODAVCOCH**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Niekoľko skupín experimentálnych zvierat sa ovplyvňuje denne počas určeného časového intervalu odstupňovanými koncentráciami testovanej látky, jedna koncentrácia je použitá pre jednu skupinu počas obdobia 90 dní. Ak je pri vytvorení príslušnej koncentrácie testovanej látky v prostredí použitý nosič, mala by byť použitá kontrola s nosičom. Počas obdobia podávania danej látky sa zvieratá denne sledujú kvôli detekcii príznakov toxicity. Zvieratá, ktoré uhynú, sa pitvú počas testovania a na záver testovania sa pitvú zvieratá, ktoré prežili.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.6.1. Príprava**

Zvieratá by mali byť prispôbované v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a ovplyvňovaných skupín a označia. Ak je to nevyhnutné, do testovanej látky môže byť pridaný vhodný nosič pre vytvorenie príslušnej koncentrácie látky v prostredí. Ak sú použité pri dávkovaní nosiče alebo ďalšie pomocné látky, nemali by mať toxický účinok. Môžu sa použiť údaje z literárnych zdrojov.

1.6.2. Podmienky testovania**1.6.2.1. Pokusné zvieratá**

Pokiaľ nie sú známe vedľajšie účinky, odporúča sa druh potkan. Mali by sa používať mladé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Na začiatku testu by variabilita hmotnosti zvierat nemala presahovať $\pm 20\%$ primeranej priemernej hodnoty. Ak je testovanie subchronickej inhalácie určené ako predbežné pre dlhodobé testovanie, mali by sa použiť v oboch testoch rovnaké druhy aj kmene.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pre každú koncentráciu by malo byť použitých aspoň 20 zvierat (10 samíc a 10 samcov). Samice by mali byť virginne, negravidné. Ak sa plánuje utratiť zvieratá aj počas testu, počet zvierat by mal byť zvýšený o množstvo zvierat, ktoré sú plánované na utratenie pred ukončením testu. Navyše u doplňujúcej skupiny 20 zvierat (10 z každého pohlavia), ktorá môže byť ovplyvňovaná vysokou koncentráciou látky 90 dní, sa môže sledovať reverzibilita (návrat stavu), pretrvávajúce alebo oddialený prejav toxického účinku 28 dní po skončení expozície.

1.6.2.3. Koncentrácie vystavenia

Potrebné sú aspoň 3 koncentrácie a kontrola alebo kontrola s nosičom (zodpovedajúca najvyššej použitej koncentrácii nosiča), ak je použitý. Okrem použitia testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine by malo byť zaobchádzané identicky ako s testovanými subjektami. Najvyššia koncentrácia by mala mať toxický účinok, ale nie smrteľný. Ak je odhadnutá koncentrácia pre vystavenie ľudí, najnižšia použitá koncentrácia by mala byť vyššia. Za ideálnych podmienok by po ovplyvnení strednou koncentráciou malo byť pozorované minimálne množstvo toxických príznakov. Ak je použitých viac stredných koncentrácií, mali by byť tak odstupňované, aby postupne zvyšovali množstvo toxických príznakov. V skupinách s najnižšou, strednou koncentráciou a aj v kontrole by mal byť výskyt úmrtí nízky, aby bolo možné zmysluplné vyhodnotenie výsledkov.

1.6.2.4. Expozičná doba

Dĺžka denného vystavenia by mala byť 6 hodín po vyrovnaní koncentrácie v testovacej komore. Iné časové intervaly môžu byť použité podľa špecifických požiadaviek.

1.6.2.5. Vybavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačnom zariadení vytvorenom pre udržanie aktívneho prúdu vzduchu s výmenou 12-krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Ak je použitá testovacia komora, jej tvar by mal minimalizovať tiesnenie sa testovaných zvierat a umožniť maximálne ovplyvnenie inhaláciou testovanej látky. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory. Môžu sa použiť aj individuálne komory pre ústa a nos, len pre hlavu alebo pre celé telo, prvé dve minimalizujú prijatie látky iným spôsobom.

1.6.2.6. Doba pozorovania

U experimentálnych zvierat by mali byť denne sledované toxické príznaky počas celého ovplyvnenia aj počas zotavovacieho obdobia. Mal by byť zaznamenaný čas smrti a čas, keď sa objavia aj zmiznú toxické príznaky.

1.6.3. Postup

Zvieratá sú vystavené testovanej látke denne, 5 – 7 dní v týždni počas 90 dní. Zvieratá v každej doplňujúcej skupine, určené pre ďalšie pozorovanie, by mali byť sledované ďalších 28 dní bez ovplyvnenia kvôli detekcii zotavovacieho obdobia alebo pretrvávania toxického účinku. Teplota pri testovaní by mala byť udržiavaná okolo 22 ± 3 °C. Za ideálnych podmienok by mala byť udržiavaná relatívna vlhkosť medzi 30 až 70 %, ale v určitých prípadoch (napríklad testovanie aerosólov) to nemusí byť použiteľné. Voda a potrava by sa nemali podávať počas vystavenia.

Mal by sa použiť dynamický inhalačný systém s kontrolou koncentrácie. Pre stanovenie vhodných koncentrácií pre ovplyvnenie je odporúčaný skúšobný test. Prietok vzduchu by mal byť nastavený tak, aby boli zaistené homogénne podmienky v testovacej komore počas celého vystavenia. Systém by mal zaisťovať, aby stabilné podmienky ovplyvnenia boli dosiahnuté čo najrýchlejšie.

Merané alebo monitorované by mali byť:

- a) miera prietoku vzduchu (nepretržite);
- b) aktuálna koncentrácia testovanej látky meraná v dýchacej zóne. Počas každodenného času vystavenia by koncentrácia sa nemala meniť viac ako ± 15 % od priemernej hodnoty. V prípade prachu a aerosólov nie je táto úroveň kontroly dosiahnuteľná a môže byť akceptovaný aj širší rozsah. Počas trvania celého experimentu by rozdiel v koncentrácii medzi jednotlivými dňami mal byť čo najmenší, ako je možné prakticky dosiahnuť. Počas zostavovania systému by mala byť prevedená analýza veľkosti častíc potrebná na stanovenie stability aerosólovej koncentrácie. Počas vystavenia by sa mali analýzy vykonávať tak často, ako je potrebné na určenie hustoty distribúcie častíc;
- c) teplota a vlhkosť;
- d) počas expozície a po nej sa systematicky zaznamenávajú pozorovania; mali by byť zachované individuálne údaje o každom zvierati. Všetky zvieratá by mali byť sledované denne a mali by byť zaznamenávané príznaky toxicity, vrátane času objavenia, stupňa príznakov a trvania. Pozorovania v klietkach by mali zahŕňať; zmeny na koži a srsti, očiach, slizniciach, dýchacích, obehových, autonómny a centrálny nervový systém, somatomotorickú aktivitu a model správania. Merania spotreby potravy a hmotnosti zvierat by mali byť vykonané každý týždeň. Pravidelné sledovanie zvierat je nevyhnutné pre istotu, že zvieratá v teste nestratíme kvôli prípadom, ako je kanibalizmus, autolýza tkanív alebo

nesprávne premiestňovanie zvierat. Na konci expozičného obdobia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, vypitvajú. Ak sa objavia umierajúce zvieratá, mali by byť utratené a vypitvané.

Na všetkých zvieratách, vrátane kontroly, sú obvykle robené nasledujúce vyšetrenia:

- a) oftalmologické vyšetrenie použitím oftalmoskopu alebo podobného vhodného zariadenia by malo byť urobené pred vystavením testovanej látke a po skončení testu najlepšie u všetkých zvierat, ale aspoň pri najvyššej koncentrácii a v kontrolnej skupine. Ak sa zistia zmeny na očiach, mali by byť vyšetrené všetky zvieratá;
- b) hematológia zahŕňajúca hematokrit, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový počet leukocytov a počet diferencovaných leukocytov (leukogram), meranie potenciálu zrážanlivosti, ako je čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas, počet trombocytov, by mala byť vyšetrená na konci testovacieho obdobia;
- c) klinická biochemická skúška krvi by sa mala vykonať na konci testovacieho obdobia. Rozsah vyšetrení, ktoré sa považujú za vhodné pre všetky testy, zahŕňa elektrolytickú rovnováhu, metabolizmus uhľovodíkov, funkcie pečene a obličiek. Výber špecifických vyšetrení je ovplyvnený sledovaním spôsobu účinku látky. Predpokladané sú stanovenia vápnika, fosforu, chloridov, sodíka, draslíka, glukóza na lačno (s časom hladovania primeraným druhu), sérovej glutamát-piruvát transaminázy ⁽¹⁾, sérovej glutamát-oxalacetát transaminázy ⁽²⁾, ornitín dekarboxylázy, gama glutamyl transpeptidázy, močoviny, albumínu, krvného kreatinínu, celkového bilirubínu a celkového množstva proteínov v sére. Iné stanovenia, ktoré by mohli byť potrebné pre adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahŕňujú analýzy lipidov, hormónov, pH rovnováhy, methemoglobínu a cholín esterázovej aktivity. Ak je potrebné rozšíriť vyšetrenia zistených príznakov, môžu sa pridať ďalšie klinické biochemické stanovenia;
- d) analýza moču nie je bežne potrebná, len ak na ňu existujú dôvody na základe očakávanej alebo zistenej toxicity.

Ak neexistujú adekvátne staršie literárne údaje, mali by byť tieto okolnosti brané do úvahy pri stanovení parametrov hematológie a klinickej biochémie pred začatím dávkovania.

Celková pitva

Všetky zvieratá by mali byť podrobené celkovej pitve, ktorá zahŕňa vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých otvorov, lebečných, hrudných a brušných dutín a ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky a semenníky by sa mali odvážiť čo najskôr po rozrezaní, aby sa predišlo vysychaniu. Nasledujúce orgány a tkanivá by sa mali uchovať vo vhodnom médiu pre možné budúce histopatologické vyšetrenia: všetky veľké poškodenia (lézie), pľúca – mali by byť odstránené v nepoškodenom stave, odvážené a uchované vo vhodnom fixačnom prostriedku kvôli zachovaniu štruktúry (perfúzia s fixačným prostriedkom je považovaná za účinnú metódu), nosohltanové tkanivá, mozog – vrátane predĺženej miechy/varolov most, mozočkovú a mozgovú kôru, hypofýzu, štítnu žľazu a prítušné telieska, každé tkanivo týmusu, priedušnicu, pľúca, srdce, aortu, slinné žľazy, pečeň, slezinu obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternicu (príslušné pohlavné orgány), (kožu), žľzník (ak je prítomný), pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, močový mechúr, reprezentatívnu lymfatickú uzlinu, (samičie mliečne žľazy), (stehenné svalstvo), periférne nervy, (oči), hrudnú kosť aj s kostnou dreňou, stehnovú kosť aj s povrchom kĺbu, miechu z troch častí – krčnej, strednohrudníkovej a bedrovej. Tkanivá v zátvorkách je potrebné vyšetriť, iba ak vykazujú známky toxicity alebo sú v zasiahnutom orgáne.

Histopatologické vyšetrenie

- a) Kompletné histopatologické vyšetrenie by malo byť vykonané na dýchacom trakte a ostatných orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a skupine ovplyvnenej najvyššou koncentráciou látky.
- b) Všetky veľké poškodenia (lézie) by mali byť vyšetrené.
- c) Cieľové orgány by mali byť vyšetrené aj v ostatných skupinách.
- d) Pľúca zvierat zo skupín s nízkou a strednou koncentráciou by mali byť tiež podrobené histopatologickému vyšetreniu, pretože môže poskytnúť základné vyhodnotenie zdravotného stavu zvierat. Ďalšie histopatologické vyšetrenia nie sú bežne potrebné na zvieratách v týchto skupinách, ale

⁽¹⁾ V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.

⁽²⁾ V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

musia byť vždy prevedené na orgánoch, ktoré vykazujú príznaky poškodenia v skupine ovplyvnenej najvyššou koncentráciou.

- e) Ak je použitá aj doplňujúca (satelitná) skupina, histopatológia by mala byť urobená na tkanivách a orgánoch, ktoré vykazovali príznaky v ostatných ovplyvnených skupinách.

2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté do tabuľky a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich poškodenia (lézie), typy poškodení a percento zvierat so všetkými typmi poškodení. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

- druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,
- podmienky pri teste:

Opis zariadenia na ovplyvňovanie: vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačného systému, odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zariadenie na meranie teploty, vlhkosti a, kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

Údaje o vystavení: mali by byť v tabuľkách, prezentované priemernou hodnotou a mierou variability (napr. smerodajná odchýlka) a mali by obsahovať:

- a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;
 - b) teplotu a vlhkosť vzduchu;
 - c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);
 - d) povahu nosiča, ak je použitý;
 - e) skutočnú koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;
 - f) priemernú veľkosť častíc (kde je to vhodné),
- údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a koncentráciu,
 - koncentrácie bez vyvolania príznakov, ak je to možné,
 - časy úmrtí počas testu alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,
 - opis toxických alebo iných príznakov,
 - čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,
 - údaje o výžive a hmotnosti,

- oftalmologické nálezy,
- použité hematologické testy a ich výsledky,
- použité klinické biochemické testy a ich výsledky (vrátane výsledkov každej analýzy moču),
- nálezy pitvy,
- detailný opis všetkých histopatologických nálezov,
- štatistické spracovanie výsledkov, ak je potrebné,
- diskusia o výsledkoch,
- interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.30. TEST CHRONICKEJ TOXICITY

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná vhodným spôsobom v niekoľkých skupinách pokusných zvierat počas väčšej dĺžky ich života, a to sedem dní v týždni, jedna dávka na jednu skupinu. Počas a po ovplyvnení testovanou látkou sú u experimentálnych zvierat denne sledované toxické príznaky.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

Zvieratá sú udržiavané v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a exponovaných skupín a označia.

1.6.2. *Podmienky testovania*

1.6.2.1. Pokusné zvieratá

Preferovaným druhom je potkan.

Na základe výsledkov predchádzajúcich testovaní iných zvierat (hlodavcov alebo nehlodavcov) môžu byť použité aj iné druhy. Mali by sa použiť bežné laboratórne kmene mladých zdravých zvierat a podávanie testovanej látky by sa malo začať čo naj skôr po odstavení od matky.

Na začiatku testu by variabilita hmotnosti zvierat nemala presahovať $\pm 20\%$ vhodnej priemernej hodnoty. Ak sa robí subchronický orálny test ako predbežný k dlhodobému testu, mali by byť použité v oboch testoch rovnaké druhy alebo línie.

1.6.2.2. Počet a pohlavie

Pri hlodavcoch by malo byť použitých aspoň 40 zvierat (20 samíc a 20 samcov) pre každú dávku aj súbežnú kontrolu. Samice by mali byť virginne, negravidné. Ak sa plánujú počas testu utratenia zvierat, počet zvierat by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením testu.

Pre nehlodavce je akceptovateľné menšie množstvo zvierat, ale aspoň štyri z jedného pohlavia pre každú skupinu.

1.6.2.3. Dávkovanie a frekvencia vystavení

Okrem súbežnej kontrolnej skupiny by mali byť použité aspoň tri rôzne dávky. Najvyššia dávka by mala vyvolať jednoznačné toxické príznaky, ale nespôsobiť príliš vysokú úmrtnosť.

Najnižšia dávka by nemala vyvolať viditeľné toxické príznaky.

Stredná dávka alebo dávky by mali byť stanovené v strede intervalu medzi najvyššou a najnižšou dávkou.

Výber dávok môže byť odhadnutý z údajov z predchádzajúcich sledovaní a testov toxicity.

Bežné je denné vystavenie. Ak je chemikália podávaná v pitnej vode alebo primiešaná do potravy, voda a potrava mali by byť k dispozícii nepretržite.

1.6.2.4. Kontroly

Mali by byť použité súbežné kontrolné skupiny, ktoré sú identické v každom ohľade s vytavenými skupinami, okrem podávanej testovanej látky.

Za špeciálnych okolností, ako je použitie aerosólov v inhalačných testoch alebo použitie emulgátorov s neurčenou biologickou aktivitou v orálnych testoch, by sa mala použiť súbežná negatívna kontrolná skupina. Negatívna kontrolná skupina je vystavená rovnakým spôsobom ako testované skupiny, okrem testovanej látky a nosiča (ak je použitý).

1.6.2.5. Spôsob podávania

Dva základné spôsoby podávania sú orálne a inhalácia. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej látky a je závislý na pravdepodobnom vystavení ľudí.

Použitie kožnej (dermálnej) aplikácie spôsobuje značné praktické problémy. Systematická chronická toxicita, ktorá je výsledkom kožnej absorpcie, môže byť bežne odvodená z výsledkov orálnych testov a poznatkov o rozsahu kožnej absorpcie, odvodených z predchádzajúcich testov toxicity.

1.6.2.6. Orálne testy

Ak je testovaná látka absorbovaná z gastrointestinálneho traktu a ak je prehltnutie jeden zo spôsobov, ako môže byť ovplyvnený človek, pokiaľ nie sú vedľajšie účinky, je odporúčaný orálny spôsob podávania. Zvieratá môžu prijímať testovanú látku v potrave, rozpustenú v pitnej vode alebo podávanú v kapsuliach. Ideálne by malo byť použité denné dávkovanie počas siedmich dní v týždni, pretože dávkovanie počas piatich dní v týždni by mohlo spôsobiť zotavenie alebo ústup toxických príznakov v čase nedávkovania, a to ovplyvní výsledok a ďalšie hodnotenie. Z praktického hľadiska je však prípustné aj dávkovanie päť dní v týždni.

1.6.2.7. Inhalačné testy

Pretože inhalačné testy predstavujú technický problém pre ich väčšiu komplikovanosť v porovnaní s inými spôsobmi podávania, je namieste detailnejší návod pre tento spôsob podávania testovanej látky. Je nutné poznamenať, že vnútropriedušnicová injekcia (infúzia) môže byť za špecifickej situácie opodstatnenou alternatívou.

Vzorom pre dlhodobé testy sú obvyčajne predpokladané vystavenia ľudí, čo znamená denné vystavenie zvierat šesť hodín po vyrovnaní koncentrácie v inhalačnej komore, päť dní v týždni (prerušované vystavenie) alebo pri pravdepodobnom vystavení z prostredia 22 až 24 hodinové vystavenie sedem dní v týždni (nepretržité vystavenie), pričom je plánovaná jedna hodina na kŕmenie a údržbu komory v rovnakom čase.

V oboch prípadoch sú zvieratá obvyčajne vystavené stálou koncentráciou testovanej látky. Podstatný rozdiel medzi prerušovaným a nepretržitým vystavením je, že pri prvom spôsobe je 17 až 18 hodinový interval, v ktorom sa môžu zvieratá zotaviť z príznakov denného vystavenia dokonca s ešte dlhším intervalom na zotavenie cez víkendy.

Výber prerušovaného alebo nepretržitého vystavenia závisí od cieľov testu a ľudského vystavenia, ktoré je simulované v testoch. Musia sa brať do úvahy aj určité technické problémy. Napríklad výhody nepretržitého

vystavenia pri simulácii podmienok prostredia sa negujú nevyhnutnosťou kŕmenia a napájania počas vystavenia a potrebou zložitejších (spolahlivých) aerosólov, vytvárania pary a tiež technikou monitorovania.

1.6.2.8. Komory pre vystavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačných komorách, ktoré umožňujú aktívny prúd vzduchu s výmenou 12-krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Kontrolné komory a komory pre vystavenie by mali mať rovnakú konštrukciu a tvar kvôli zaisteniu porovnateľných podmienok pre ovplyvnenie vo všetkých ohľadoch, okrem testovanej látky. Jemný podtlak vnútri komory je bežne udržiavaný pre zabránenie rozptýlu testovanej látky do okolitého prostredia. Komory by mali minimalizovať tiesnenie testovaných zvierat. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory.

Merané a monitorované by mali byť:

- i) prúd vzduchu: miera prietoku vzduchu cez komoru by mala byť, pokiaľ je možné, meraná nepretržite;
- ii) koncentrácia: počas každodenného času vystavenia by sa koncentrácia testovanej látky nemala odchyľovať viac ako $\pm 15 \%$ od priemernej hodnoty;
- iii) teplota a vlhkosť: pre hlodavce by mala byť udržiavaná teplota $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a vlhkosť v komore 30 až 70 % okrem prípadu, keď je použitá voda na rozptýlenie testovanej látky v atmosfére testovacej komory. Pokiaľ je možné, obe veličiny by mali byť monitorované nepretržite;
- iv) meranie veľkosti častíc: mala by byť určená veľkosť rozptýlených častíc v atmosfére komory, vrátane kvapalných alebo pevných aerosólov. Aerosólové častice by mali mať dýchatelnú veľkosť pre použité testované zvieratá. Vzorky atmosféry v testovacej komore by mali byť otestované v dýchacej zóne zvierat. Vzorka vzduchu by mala reprezentovať distribúciu častíc, ktorou sú zvieratá ovplyvňované a mala by byť gravimetricky stanovená pre všetky suspendované aerosóly, aj keď mnoho aerosólov nie je dýchatelných. Analýza veľkosti častíc by mala byť stanovovaná často počas zostavovania testovacieho systému kvôli zaisteniu stability aerosólov a potom tak často, ako je nevyhnutné počas ovplyvnenia stanoviť zhodnosť distribúcie častíc, ktorými sú ovplyvňované zvieratá.

1.6.2.9. Trvanie testu

Testovaná látka by sa mala podávať aspoň 12 mesiacov.

1.6.3. Postup

Pozorovania

Podrobné klinické vyšetrenia by mali byť robené aspoň raz denne. Ďalšie pozorovania by mali byť denne robené vhodnými spôsobmi, aby bolo minimum strát zvierat počas testu, napríklad pitva alebo uchovanie v chlade nájdených mŕtvych zvierat a izolácia alebo utratenie slabých alebo chradnúcich zvierat. Podrobné pozorovania by mali robiť na odhalenie nástupu a priebehu všetkých toxických príznakov, ako aj minimalizovanie straty v dôsledku chorôb, autolýzy alebo kanibalizmu.

Klinické príznaky, vrátane neurologických a očných zmien, rovnako ako aj mortalita by mali byť zaznamenané pre všetky zvieratá. Mal by byť zaznamenaný čas nástupu a priebehu toxických príznakov, vrátane podozrivých tumorov.

Hmotnosť zvierat by sa mala zaznamenávať individuálne pre všetky zvieratá raz za týždeň prvých 13 týždňov testovania a potom najmenej raz za štyri týždne. Príjem potravy by mal byť stanovovaný raz za týždeň počas prvých 13 týždňov testovania a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ to nie je nutné zmeniť kvôli zdravotnému stavu alebo zmene hmotnosti.

Hematologické vyšetrenie

Hematologické vyšetrenie (napr. obsah hemoglobínu, hematokrit, množstvo červených krviniek, množstvo bielych krviniek, krvných doštičiek a ďalšie merania zrážanlivosti) by sa malo robiť po treťom, po šiestom mesiaci a potom približne v šesťmesačných intervaloch a na konci na krvných vzorkách zozbieraných zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín. Mali by byť, ak je to možné, z tých istých potkanov v každom intervale. Navyše z nehlodavcov by mali byť vzorky zozbierané aj pred testom.

Ak z klinických vyšetrení vyplýva zhoršenie zdravotného stavu zvierat počas testu, mal by sa urobiť krvný obraz u postihnutých zvierat.

Krvný obraz sa robí na vzorkách zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole. Pre skupiny s nižšou dávkou sa robí iba, ak je veľký rozdiel medzi skupinou s najvyššou dávkou a kontrolou alebo ak sú zistené patologické nálezy.

Analýza moču

Zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín by mali byť zozbierané vzorky moču na analýzu, ak je to možné, v každom odbere z tých istých potkanov podobne ako pri hematologickom vyšetrení. Nasledujúce údaje by mali byť pri hlodavcoch robené individuálne pre každé zviera alebo na spojenej vzorke pre každé pohlavie a skupinu:

- vonkajšie hodnotenie: objem a hustota pre každé zviera,
- proteíny, glukóza, ketóny, krv alebo krvné farbivo (semikvantitatívne),
- mikroskopické vyšetrenie sedimentu (semikvantitatívne).

Biochemické vyšetrenia

Približne v šesťmesačných intervaloch a na konci testu sa odoberú vzorky krvi zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín na biochemické vyšetrenie, ak je to možné, v každom odbere z tých istých potkanov. Navyše z nehlodavcov by mali vzorky zozbierané aj pred testom. Zo vzoriek sa pripraví plazma a stanovia sa nasledujúce hodnoty:

- koncentrácia celkových proteínov,
- koncentrácia albumínu,
- pečenné testy (ako aktivita alkalickej fosfatázy, glutamát-piruvát transaminázy ⁽¹⁾, sérovej glutamát-oxalacetát transaminázy ⁽²⁾, gama glutamyl transpeptidázy, ornitín dekarboxylázy,
- metabolizmus uhľovodíkov ako glukóza na lačno,
- testy funkcie obličiek ako močovina v krvi.

Celková pitva

Všetky zvieratá by mali byť podrobené celkovej pitve, vrátane tých, ktoré uhynuli počas experimentu alebo boli utratené, lebo chradli. Pred utratením by sa mali odobrať vzorky krvi zo všetkých zvierat pre stanovenie krvného obrazu. Všetky výrazne viditeľné poškodenia (lézie), tumory alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť zafixované. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

Všetky orgány a tkanivá by sa mali zafixovať pre histopatologické vyšetrenie. Týka sa to zvyčajne nasledujúcich orgánov a tkanív: mozog ⁽³⁾ (predĺžená miecha/varolov most, mozočková a mozgová kôra), hypofýza, štítna žľaza (vrátane prítitných teliesok), týmus, pľúca (vrátane priedušnice), srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň ⁽³⁾, slezina, obličky ⁽³⁾, nadobličky ⁽³⁾, pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, maternica, močový mechúr, lymfatické uzliny, pankreas, gonády ⁽³⁾, (prídavné pohlavné orgány), samičie mliečne žľazy, kožu, svalstvo, periférne nervy, miecha (krčná, hrudná, bedrová), hrudná kosť aj s kostnou dreňou, stehnová kosť (vrátane kĺbu) a oči. Naplnenie pľúc a močového mechúra fixačným činidlom je optimálny spôsob zachovania týchto tkanív, naplnenie pľúc pri inhalačných testoch je nevyhnutné pre primerané histopatologické vyšetrenia. Pri špeciálnych testoch ako sú inhalačné testy, by mal byť preskúmaný dýchací trakt, vrátane nosa, hltana a hrtana.

⁽¹⁾ V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.

⁽²⁾ V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

⁽³⁾ Tieto orgány od desiatich zvierat z jedného pohlavia a skupiny hlodavcov a všetkých nehlodavcov by mali byť odvážené spolu so štítnou žľazou (s prítitnými telieskami) všetkých nehlodavcov.

Ak sa vykonávajú aj iné klinické vyšetrenia, mali by byť výsledky z nich dostupné pred mikroskopickým vyšetrením, pretože môžu poskytnúť dôležité informácie pre patológa.

Histopatológia

Všetky viditeľné zmeny, obzvlášť tumory a ostatné poškodenia (lézie), ktoré nastali v hociktorom orgáne, by mali byť mikroskopicky vyšetrené. Odporúčaný je nasledujúci postup:

- a) Mikroskopické vyšetrenie všetkých zafixovaných orgánov a tkanív s kompletným opisom všetkých poškodení nájdených:
 1. vo všetkých zvieratách, ktoré zahynuli alebo boli utratené počas testu;
 2. vo všetkých zvieratách v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole;
- b) Orgány a tkanivá vykazujúce abnormality spôsobené alebo pravdepodobne spôsobené testovanou látkou sa tiež vyšetrujú v skupinách s nižšími dávkami;
- c) Ak výsledky testu dokazujú značné zníženie dĺžky života zvierat alebo indukciu príznakov, ktoré môžu ovplyvniť toxickú odpoveď, mala by sa vyšetriť aj skupina s druhou najnižšou dávkou podľa predchádzajúceho opisu;
- d) Informácie o výskyte poškodení (lézií), bežne sa vyskytujúcich u použitých laboratórnych kmeňov zvierat v rovnakých laboratórnych podmienkach, t. j. kontrolné dáta z predchádzajúcich testov sú nevyhnutné pre správne posúdenie významnosti zmien sledovaných u testovaných zvierat.

2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich poškodenia (lézie) a percento zvierat so všetkými typmi poškodení. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu podľa možnosti obsahuje nasledujúce informácie:

- druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,
- podmienky pri teste:

Opis expozičného zariadenia:

Vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačného systému, spracovania odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, a kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

Údaje vystavenia:

Mali by byť v tabuľkách, s uvedením priemernej hodnoty a miery variability (napr. smerodajnej odchýlky) a mali by obsahovať:

- a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;

- b) teplotu a vlhkosť vzduchu;
 - c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);
 - d) povahu nosiča, ak je použitý;
 - e) aktuálnu koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;
 - f) strednú veľkosť častíc (kde je to vhodné),
- veľkosti dávok (vrátane nosiča, ak bol použitý) a koncentrácie,
 - údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a dávku,
 - dávku bez toxikkej reakcie, ak je to reálne,
 - časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,
 - opis toxických alebo iných príznakov,
 - čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,
 - údaje o výžive a hmotnosti,
 - oftalmologické nálezy,
 - použité hematologické testy a všetky ich výsledky,
 - použité klinické biochemické testy a všetky ich výsledky (vrátane výsledkov každej analýzy moču),
 - nálezy pitvy,
 - detailný opis všetkých histopatologických nálezov,
 - štatistické spracovanie výsledkov, ak je potrebné,
 - diskusiu o výsledkoch,
 - interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.31. ŠTÚDIA PRENATÁLNEJ VÝVOJOVEJ TOXICITY

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 414 (2001).

1.1. ÚVOD

Táto metóda na testovanie vývojovej toxicity je určená na poskytnutie všeobecnej informácie týkajúcej sa účinkov prenatálnej expozície na gravidné pokusné zviera a na vývoj organizmu v utero; sem môže patriť hodnotenie účinkov na matku, ako aj uhynutie, štrukturálne abnormality alebo poruchy rastu plodu. Funkčné poruchy, aj keď sú dôležitou časťou vývoja, nie sú integrálnou časťou tejto testovacej metódy. Môžu byť testované na tieto účinky v oddelenej štúdii alebo ako doplnok k tejto štúdii, s použitím testovacej metódy pre vývojovú neurotoxicitu. Informácie o testovaní funkčných porúch a iných postnatálnych účinkov sa dajú v prípade potreby získať z testovacej metódy pre dvojgeneračnú štúdiu reprodukčnej toxicity a štúdiu vývojovej neurotoxicity.

Táto testovacia metóda môže vyžadovať, aby sa jednotlivé testy osobitne upravili na základe konkrétnych poznatkov napr. o fyzikálno-chemických alebo toxikologických vlastnostiach testovanej látky. Takáto úprava je prípustná, ak na základe presvedčivého vedeckého dôkazu vyplýva, že úprava vedie k spoľahlivejšiemu testu. V takomto prípade sa tento vedecký dôkaz starostlivo zdokumentuje v správe zo štúdie.

1.2. DEFINÍCIE

Vývojová toxikológia: štúdia nepriaznivých účinkov na vyvíjajúci sa organizmus, ktoré môže zapríčiniť expozícia pred počatím, počas prenatálneho vývoja alebo postnatálne do obdobia sexuálnej zrelosti. K hlavným prejavom vývojovej toxicity patrí 1. smrť organizmu, 2. štrukturálna abnormalita, 3. poruchy rastu a 4. funkčné poruchy. Vývojová toxikológia sa predtým označovala ako teratológia.

Nepriaznivý účinok: každá zmena voči normálnemu stavu v súvislosti s ošetrovaním, ktorá znižuje schopnosť organizmu prežiť, reprodukovať sa alebo prispôbovať sa prostrediu. V širšom zmysle vývojová toxikológia zahŕňa každý účinok, ktorý vplýva na normálny vývoj zárodka ako pred narodením, tak aj a po narodení.

Porucha rastu: zmena hmotnosti alebo veľkosti orgánov, alebo tela potomstva.

Zmeny (anomálie): štrukturálne zmeny vo vývoji, ktoré zahŕňujú malformácie a aj odchýlky (28).

Malformácia/veľká abnormalita: štrukturálna zmena, ktorá sa pokladá za škodlivú pre zviera (môže byť tiež smrteľná) a je zvyčajne zriedkavá.

Odchýlka/malá abnormalita: štrukturálna zmena, o ktorej sa usudzuje, že má malý alebo žiadny škodlivý účinok na zviera; môže byť prechodná a môže sa vyskytovať pomerne často v kontrolnej populácii.

Zárodok: suma derivátov oplodneného vajíčka v každom štádiu vývoja od oplodnenia do narodenia vrátane extraembryonálnych membrán, ako aj embrya alebo plodu.

Implantácia (nidácia): uchytenie blastocysty v epitelovej výstelke uteru, vrátane jej penetrácie cez epitel utera a jej zahniezdenie do endometria.

Embryo: skoré štádium alebo vývojové štádium každého organizmu, najmä vyvíjajúceho sa produktu oplodnenia vajíčka po vzniku pozdĺžnej osi a pokiaľ nie sú prítomné všetky hlavné štruktúry.

Embryotoxicita: škodlivé pre normálnu štruktúru, vývoj, rast a/alebo životaschopnosť embrya.

Plod: nenarodené potomstvo v postembryonálnom období.

Fetotoxicita: škodlivé pre normálnu štruktúru, vývoj, rast a/alebo životaschopnosť plodu.

Potrat: predčasné vypudenie produktov oplodnenia z uteru: embrya alebo neživotaschopného plodu.

Resorpcia: zárodok, ktorý po implantovaní do uteru uhynul a vstrebáva sa alebo sa vstrebal.

Skorá resorpcia: dôkaz implantácie bez toho, aby sa dalo embryo/plod rozoznať.

Neskorá resorpcia: mŕtve embryo alebo plod s vonkajšími degeneratívnymi zmenami.

NOAEL: skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku, je to najvyššia dávka alebo úroveň expozície, pri ktorej sa nepozorujú žiadne nepriaznivé zistenia v súvislosti s ošetrovaním.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Žiadna.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa zvyčajne podáva gravidným zvieratám v dobe aspoň od implantácie do jedného dňa pred naplánovaným dňom usmrtenia, ktorý má byť čo možno najbližšie k zvyčajnému dňu pôrodu bez ohrozenia straty údajov následkom predčasnemu pôrodu. Testovacia metóda nie je určená iba na skúmanie obdobia organogenézy (t. j. 5 – 15 dní u hlodavcov (myši, potkany, škrečky) a 6 – 18 dní u králikov), ale aj účinkov od obdobia preimplantácie, v prípade potreby, počas celého obdobia gravidity do dňa, keď sa uskutoční cisársky rez. Tesne pred uskutočnením cisárskeho rezu sa samice usmrtia, obsah uteru sa vyšetrí a posúdia sa vonkajšie viditeľné anomálie na plodoch a zmeny na mäkkých tkanivách a kostre.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. Výber druhu zvierat

Odporúča sa, aby sa testovanie uskutočnilo na najvhodnejších druhoch a aby sa použili laboratórne druhy a kmeň, ktoré sa zvyčajne používajú pri testovaní prenatálnej vývojovej toxicity. Z hlodavcov sa uprednostňuje potkan a z nehlodavcov králik. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

1.5.2. Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C ($\pm$ 3 °C) pre hlodavce a 18 °C ($\pm$ 3 °C) pre králiky. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Párenie sa uskutoční v klietkach vhodných na tento účel. Aj keď sa uprednostňuje jednotlivé umiestnenie spárených zvierat, spoločné umiestnenie v malých počtoch je tiež prípustné.

1.5.3. Príprava zvierat

Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň 5 dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným experimentom. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách majú mať, pokiaľ je to možné, rovnakú hmotnosť a vek. Na každú veľkosť dávky sa použijú mladé dospelé, panenské samice. Samice sa spária so samcami rovnakého druhu a kmeňa a je potrebné zabrániť páreniu medzi súrodencami. Pre hlodavce je deň 0 gravidity dňom, keď sa zistila vaginálna zátk a/alebo sperma; pre králiky deň 0 je zvyčajne deň, keď sa uskutočnil koitus alebo umelé oplodnenie, ak sa použila táto technika. Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolnej a pokusnej skupiny. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klietok. Každému zvieraťu sa priradí vlastné identifikačné číslo. Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolnej a ošetrenej skupiny a ak sa samice páрили v skupinách, zvieratá v každej skupine sa rovnomerne rozdelia do uvedených skupín. Podobne sa rovnomerne rozdelia do skupín samice oplodnené rovnakým samcom.

1.6. POSTUP**1.6.1. Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet samíc tak, aby bolo k dispozícii približne 20 samíc s implantačnými miestami na autopsiu. Skupiny, ktoré majú menej ako 16 zvierat s implantačnými miestami, sú nevhodné. Úmrtnosť materských zvierat nevedie nevyhnutne k tomu, že štúdia je neplatná, ak nedosahuje viac ako 10 %.

1.6.2. Príprava dávok

Ak sa na uľahčenie dávkovania používa nosič alebo iná prídavná látka, je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám: účinky na absorpciu, distribúciu, metabolizmus a retenciu alebo vylúčenie testovanej látky; metódy na chemické vlastnosti testovanej látky, ktorý môže zmeniť jej toxické vlastnosti; a vplyv najvhodnejších spotrebu potravy a vody alebo nutričný stav zvierat. Nosič by nemal spôsobovať vývojovú toxicitu, ani by nemal mať vplyv na reprodukciu.

1.6.3. Dávkovanie

Testovaná dávka sa zvyčajne podáva každý deň od implantácie (napr. 5 dní po párení) do dňa naplánovaného uskutočnenia cisárskeho rezu. Ak predbežné štúdie, ktoré sú prípadne k dispozícii, neuvádzajú veľkú pravdepodobnosť preimplantačných strát, ošetrovanie sa môže predĺžiť na celé obdobie gravidity, od párenia do dňa naplánovaného usmrtenia. Je dobre známe, že nevhodné zaobchádzanie alebo stres počas gravidity môžu mať za následok prenatálne straty. Na ochranu proti prenatálnym stratám zapríčineným faktormi, ktoré nesúvisia s ošetrovaním, je potrebné zabrániť zbytočnej manipulácii s gravidnými zvieratami, ako aj stresu spôsobenému vonkajšími faktormi, ako napríklad hluk.

Použijú sa aspoň tri veľkosti dávok a uskutoční sa paralelná kontrola. Zdravé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolnej a pokusnej skupiny. Dávky sa rozložia tak, aby sa toxické účinky zvyšovali. Pokiaľ neexistujú žiadne obmedzenia na základe fyzikálneho/chemického charakteru a biologických vlastností testovanej látky, zvolí sa najvyššia dávka s cieľom vyvolať nejakú vývojovú toxicitu a/alebo toxicitu u matiek (klinické príznaky alebo úbytok telesnej hmotnosti), ale nie uhynutie alebo silné utrpenie. Aspoň jedna zo prechodných dávok má viesť k minimálnym viditeľným toxickým účinkom. Najnižšia dávka by nemala spôsobiť žiadny prejav toxicity u materských zvierat, ani vývojovej toxicity. Klesajúca postupnosť dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia v závislosti od dávkovania a hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). Intervaly dávkovania s faktorom 10; až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. Aj keď stanovenie NOAEL u matiek je cieľom, štúdie, pri ktorých sa nestanovuje táto hladina, môžu byť tiež prípustné (1).

Veľkosti dávok sa zvolia tak, aby zohľadnili všetky existujúce údaje o toxicite, páрили aj ďalšie informácie o metabolizme a toxikokinetike testovanej látky alebo príbuzných materiálov. Tieto informácie napomôžu aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania.

Použije sa paralelná kontrolná skupina. Touto skupinou bude zdanlivo ošetrovaná kontrolná skupina alebo kontrolná skupina ošetrovaná nosičom, ak sa používa nosič na podávanie testovanej látky. Všetkým skupinám sa podáva rovnaký objem buď testovanej látky alebo nosiča. So zvieratami v kontrolnej(-ých) skupine(-ách) sa zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusných skupinách. Kontrolné skupiny, ktorým sa podáva nosič, viac nosič v najvyššej použíwanej dávke (ako v skupine s najnižším dávkovaním).

1.6.4. Limitný test

Ak sa na základe testu s orálne podanou jednou dávkou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s použitím postupov uvedených pre túto štúdiu nezistí žiadna pozorovateľná toxicita buď u gravidných zvierat, alebo ich potomkov a ak sa účinok neočakáva na základe existujúcich údajov (napr. zo štruktúrne a/alebo metabolicky príbuzných látok), potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím troch dávok. Z predpokladanej expozície ľudí môže vyplývať potreba, aby sa v limitnom teste použili vyššie orálne dávky. Pri iných typoch podávania, ako napr. vdychovaním alebo aplikáciou cez kožu, fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky často môžu poukázvať a limitovať maximálnu prípustnú úroveň expozície (napríklad aplikácia cez kožu by nemala spôsobiť silnú lokálnu toxicitu).

1.6.5. Podávanie dávok

Testovaná látka alebo nosič sa zvyčajne podáva orálne pomocou intubácie. Ak sa použije iná cesta podávania, je potrebné, aby experimentátor uviedol zdôvodnenie a argumenty pre túto voľbu a môžu byť potrebné príslušné úpravy (2) (3) (4). Testovaná látka sa podáva každý deň približne v rovnakom čase.

Dávka pre jednotlivé zvieratá sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Je však potrebné venovať pozornosť pri nastavovaní dávky počas posledného trimestra gravidity. Je potrebné použiť existujúce údaje na výber dávky, aby sa zabránilo nadmernej toxicite matky. Ak sa však zaznamená nadmerná toxicita u ošetrovaných matiek, tieto zvieratá sa humánnym spôsobom usmrtia. Ak niektoré gravidné zvieratá vykazujú príznaky nadmernej toxicity, je potrebné zvážiť usmrtenie celej skupiny s touto dávkou. Ak sa látka podáva cez sondu, pokiaľ možno sa podá zvieratám ako jednorazová dávka s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieratá. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Ak sa použije ako nosič kukuričný olej, objem nemá byť vyšší ako 0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti. Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravujú tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

1.6.6. **Pozorovanie matiek**

Klinické vyšetrenie sa uskutoční a zaznamená aspoň raz za deň, pokiaľ možno v rovnakom(-ých) čase(-och) každý deň pri zohľadnení obdobia, keď sa predpokladajú maximálne účinky po podaní dávky. Stav zvierat sa zaznamená, vrátane mortality, moribundného stavu, trvalých zmien v správaní a všetkých príznakov zjavnej toxicity.

1.6.7. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy**

Zvieratá sa odvážia v 0. deň gravidity alebo najneskôr na 3. deň gravidity, ak sú dodané zvieratá od externého chovateľa spárené na základe časových údajov, v prvý deň dávkovania, aspoň každé 3 dni počas obdobia dávkovania a v deň naplánovaného usmrtenia.

Spotreba potravy sa zaznamená v trojdňových intervaloch a má sa zhodovať s dňami, keď sa zisťuje telesná hmotnosť.

1.6.8. **Vyšetrenie post mortem**

Samice sa usmrtia jeden deň pred očakávaným dňom vrhu. Samice, ktoré vykazujú príznaky potratu alebo predčasného pôrodu pred naplánovaným usmrtením, sa usmrtia a podrobia dôkladnému makroskopickému vyšetreniu.

V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa matka vyšetrí makroskopicky na všetky štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Posúdenie matiek počas cisárskeho rezu a následná analýza plodov sa uskutoční podľa možnosti bez vedomosti o tom, či ide o ošetrovanú skupinu, aby sa minimalizovalo ovplyvnenie.

1.6.9. **Vyšetrenie obsahu uteru**

Bezprostredne po usmrtení alebo čo najskôr po uhynutí sa odoberie uterus a zistí sa stav gravidity u zvierat. Ak uterus nevykazuje graviditu, je potrebné ho ďalej vyšetriť (napr. farbením sírnikom amónnym pre hlodavce a Salewského farbením alebo vhodnou alternatívnou metódou pre králiky) na potvrdenie negravidného stavu (5).

Gravidný uterus, vrátane cervixu, sa odváži. Nie je potrebné zisťovať hmotnosť gravidného uteru u zvierat, ktoré uhynuli počas štúdie.

Pri gravidných zvieratách sa určí počet žltých teliesok (corpora lutea).

Obsah uteru sa vyšetrí na počet mŕtvych embryí alebo plodov alebo počet životaschopných plodov. Stupeň resorpcie sa opíše, aby sa mohol odhadnúť relatívny čas uhynutia zárodku (pozri oddiel 1.2).

1.6.10. **Vyšetrenie plodov**

Určí sa pohlavie a telesná hmotnosť každého plodu.

Každý plod sa vyšetrí na vonkajšie zmeny (6).

Plody sa vyšetrí na zmeny na skelete a mäkkých tkanivách (napr. odchýlky a malformácie alebo anomálie) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kategorizácia fetálnych zmien sa

odporúča, ale nevyžaduje. Keď sa uskutoční kategorizácia, jasne sa stanovia kritériá definujúce každú kategóriu. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť reprodukčnému traktu, ktorý by sa mal vyšetriť na príznaky zmien vo vývoji.

V prípade hlodavcov sa pripraví približne polovica vrhu a vyšetrí na zmeny na skelete. Zvyšok sa pripraví a vyšetrí na zmeny mäkkých tkanív s použitím uznaných alebo vhodných metód sériových rezov alebo dôkladných pitevných techník.

V prípade nehlodavcov, napr. králiky, sa všetky plody vyšetrí na zmeny mäkkých tkanív a aj na zmeny na skelete. Telá týchto plodov sa podrobia dôkladnej autopsii na vyšetrenie zmien mäkkých tkanív, ktoré môžu zahŕňať postupy pre ďalšie posúdenie internej štruktúry srdca (25). Hlavy jednej polovice plodov vyšetrených týmto spôsobom sa odstránia a spracujú, aby sa posúdili zmeny mäkkých tkanív (vrátane očí, mozgu, nosového priechodu a jazyka) s použitím štandardných metód sériových rezov (26) alebo rovnako citlivou metódou. Telá týchto plodov a zvyšné neporušené plody sa spracujú a vyšetrí na zmeny na skelete s použitím rovnakých metód, ako boli opísané pre hlodavce.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa zaprotokolujú jednotlivo pre matky, ako aj pre ich potomstvo a zosumarizujú vo forme tabuliek a uvedie sa pre každú pokusnú skupinu a každú generáciu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré uhynuli počas testu, alebo sa usmrtili z humanných dôvodov, čas každého úmrtia alebo humanného usmrtenia, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, opis zistených príznakov toxicity, vrátane času nástupu, trvania a závažnosti všetkých toxických účinkov, typy vyšetrení embrya/plodu a všetky údaje týkajúce sa vrhu.

Číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou štatistickou metódou, pričom sa na analýzu údajov ako jednotka použije vrh. Použije sa všeobecne uznávaná štatistická metóda; štatistické metódy sa zvolia ako súčasť plánu štúdie a zdôvodnia sa. Údaje týkajúce sa zvierat, ktoré neprežili do naplánovaného usmrtenia, sa tiež zaznamenajú. Tieto údaje sa môžu zahrnúť do tej skupiny priemerov zvierat, ktorej sa týkajú. Závažnosť údajov, získaných od takýchto zvierat, a teda zahrnutie alebo vylúčenie z priemeru(-ov) ktorejkoľvek skupiny sa zdôvodní a individuálne posúdi.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Zistenia štúdie prenatalnej vývojovej toxicity sa vyhodnotia na základe zistených účinkov. Hodnotenie bude obsahovať tieto informácie:

- výsledky testu na matkách a embryách/plodoch, vrátane posúdenia vzťahu alebo neprítomnosti vzťahu medzi expozíciou zvierat testovanou látkou a výskytom a závažnosťou všetkých zistení,
- kritériá použité na kategorizáciu vonkajších zmien na plode, mäkkých tkanivách a skelete, ak sa uskutočnila kategorizácia,
- v prípade potreby historické kontrolné údaje na podporu interpretácie výsledkov štúdie,
- počty použité pri výpočte všetkých percent alebo indexov,
- vhodnú štatistickú analýzu zistení zo štúdie, ktoré by v prípade potreby mohli zahŕňať dostatočné informácie o analytickej metóde tak, aby nezávislý kontrolór/štatistik mohol prehodnotiť a zrekonštruovať analýzu.

V každej štúdii, pri ktorej sa nepreukázali žiadne toxické účinky, je potrebné zvážiť ďalšie vyšetrenia na stanovenie absorpcie a biologickej dostupnosti testovanej látky.

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Štúdia prenatalnej vývojovej toxicity poskytne informácie o účinkoch opakovanej expozície látkou počas gravidity na matkách a na vnútromaternicový vývoj ich potomstva. Výsledky štúdie sa interpretujú v spojitosti so zisteniami zo subchronických, reprodukčných, toxikokinetických a iných štúdií. Aj keď sa dôraz kladie na

všeobecnú toxicitu, pokiaľ ide o toxicitu u matky a aj vývojovú toxicitu, výsledky štúdie umožnia do určitej miery rozlíšenie medzi účinkami na vývoj, ktoré sa vyskytnú pri neprítomnosti všeobecnej toxicity, a tých účinkov, ktoré sú vyvolané dávkami, ktoré sú toxické aj pre materské zviera (27).

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto konkrétne informácie:

Testovaná látka:

- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikácia vrátane čísla CAS, ak je známe/stanovené,
- čistota.

Nosič (v prípade potreby):

- zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

- použitý druh a kmeň,
- počet a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,
- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testu:

- zdôvodnenie výberu veľkosti dávok,
- údaje o zložení testovanej látky/príprave krmiva, dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,
- údaje o podávaní testovanej látky,
- prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,
- podmienky prostredia,
- údaje o kvalite krmiva a vody.

Výsledky:

Údaje toxickej reakcie matky podľa dávky okrem iného:

- počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré prežili, počet gravidných zvierat a počet zvierat, ktoré potratili, počet zvierat, ktoré predčasne porodili,

- deň uhynutia počas štúdie, alebo či zvieratá prežili do usmrtenia,
- údaje o zvieratách, ktoré neprežili do naplánovaného usmrtenia, sa zaprotokolujú, ale sa nezahrnú do štatistických porovnaní medzi skupinami,
- deň zistenia každého nezvyčajného klinického príznaku a jeho ďalší priebeh,
- telesná hmotnosť, zmena telesnej hmotnosti a hmotnosť gravidného uteru, nepovinne vrátane zmeny telesnej hmotnosti upravenej o hmotnosť gravidného uteru,
- spotreba potravy, a ak sa meria, spotreba vody,
- pitevné nálezy, vrátane hmotnosti uteru,
- zaznamenajú sa hodnoty NOAEL pre účinky na matku a vývoj.

Vývojové údaje o vrhu s implantátmi, vrátane:

- počtu žltých teliesok (corpora lutea),
- počtu implantácií, počtu a percenta živých a mŕtvych plodov a resorpcií,
- počtu a percenta predimplantačných a poimplantačných strát.

Vývojové údaje o vrhu so živými plodmi, vrátane:

- počtu a percenta živého potomstva,
- pomeru pohlaví,
- telesnej hmotnosti plodu, pokiaľ možno podľa pohlavia a pre obe pohlavia spolu,
- vonkajšie malformácie, malformácie mäkkých tkanív a skeletu a iné závažné zmeny,
- kritériá pre kategorizáciu v prípade potreby,
- celkový počet a percento plodov a vrhov s každou vonkajšou zmenou, zmenou mäkkých tkanív alebo skeletu, ako aj typy výskytov jednotlivých anomálií a iných závažných zmien.

Diskusia k výsledkom

Záver

4. ODKAZY

- (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 Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für 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 Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381 – 391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229 – 242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291 – 306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as 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.
- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, pp. 163 – 173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411 – 445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *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, T.E. (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.

B.32. TEST KARCINOGENITY

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná obvyčajne sedem dní v týždni vhodným spôsobom v niekoľkých skupinách pokusných zvierat, jedna dávka na jednu skupinu počas väčšej dĺžky ich života. Počas a po ovplyvnení testovanou látkou sú u experimentálnych zvierat denne sledované príznaky toxicity, obzvlášť vznik tumorov.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú udržiavané v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a exponovaných skupín a označia.

1.6.1. Pokusné zvieratá

Na základe predchádzajúcich výsledkov môžu byť použité aj iné druhy (hlodavce aj nehlodavce). Mali by sa používať mladé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov a dávkovanie by sa malo začať čo najskôr po odstavení od matky.

Na začiatku testu by odchýlka hmotnosti zvierat nemala presahovať ± 20 % priemernej hodnoty. Ak sa robí subchronický orálny test ako predbežný pre dlhodobý test, mali by sa použiť v oboch testoch rovnaké druhy/ línie a kmene.

1.6.2. Počet a pohlavie

Pri hlodavcoch by sa malo použiť aspoň 100 zvierat (50 samíc a 50 samcov) pre každú dávku aj súbežnú kontrolu. Samice by mali byť virgínne, negravidné. Ak je v pláne utratiť nejaké zvieratá aj počas testu, počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením testu.

1.6.3. Dávkovanie a frekvencia expozície

Okrem súbežnej kontrolnej skupiny by mali byť použité aspoň tri rôzne dávky. Najvyššia dávka by mala vyvolať minimálne príznaky toxicity ako slabé zníženie hmotnosti (menej ako ± 10 %). Zmeny v dĺžke života by nemali byť spôsobené inými vplyvmi, ako sú tumory.

Najnižšia dávka by nemala mať vplyv na normálny rast, vývin a dlhovekosť zvierat ani vyvolávať žiadne toxické príznaky. Všeobecne by nemala byť nižšia ako 10 % najvyššej dávky.

Stredná dávka alebo dávky by mali byť stanovené v strede intervalu medzi najvyššou a najnižšou dávkou.

Výber dávok môže byť odhadnutý z údajov z predchádzajúcich sledovaní a testov toxicity.

Bežná frekvencia ovplyvňovania je denná.

Ak je chemikália podávaná v pitnej vode alebo primiešaná do potravy, voda a potrava by mali byť k dispozícii nepretržite.

1.6.4. Kontroly

Mali by byť použité súbežné kontrolné skupiny, ktoré sú identické v každom ohľade s ovplyvňovanými skupinami, okrem podávanej testovanej látky.

Za špeciálnych okolností, ako sú inhalačné testy aerosólov alebo použitie emulgátorov s neurčenou biologickou aktivitou v orálnych testoch, by mala byť použitá ďalšia kontrolná skupina, ktorá nie je vystavená ani použitým nosičom.

1.6.5. Spôsob podávania

Tri základné spôsoby podávania sú orálne, kožné (dermálne) a inhalácia. Výber spôsobu podávania závisí na fyzikálnych a chemických vlastnostiach testovanej látky a je pravdepodobný pre vystavenie človeka.

1.6.5.1. Orálne testy

Ak je testovaná látka absorbovaná z gastro-intestinálneho traktu a ak je prehltnutie jeden zo spôsobov, ako môže byť vystavený človek, pokiaľ nie sú vedľajšie účinky, je odporúčaný orálny spôsob podávania. Zvieratá môžu prijímať testovanú látku v potrave, rozpustenú v pitnej vode, alebo podávanú v kapsuliach.

V ideálnom prípade by sa malo použiť denné dávkovanie počas siedmich dní v týždni, pretože dávkovanie počas piatich dní v týždni by mohlo spôsobiť zotavenie alebo ústup toxicity v čase nedávkovania a to ovplyvní výsledok a ďalšie hodnotenie. Z praktického hľadiska je však prijateľné aj dávkovanie päť dní v týždni.

1.6.5.2. Kožné (dermálne) testy

Vystavenie kože jej natieraním môže byť vybrané kvôli simulácii hlavného spôsobu vystavenia človeka a tiež ako modelový systém pre indukciu kožných poškodení (lézií).

1.6.5.3. Inhalačné testy

Pretože inhalačné testy predstavujú technický problém pre ich väčšiu komplikovanosť v porovnaní s inými spôsobmi podávania, je namieste detailnejší návod pre tento spôsob podávania testovanej látky. Je nutné poznamenať, že vnútropriedušnicová injekcia (infúzia) môže byť opodstatnenou alternatívou za špecifickej situácie.

Vzorom pre dlhodobé testy sú obvyčajne predpokladané vystavenia ľudí, čo znamená denné vystavenie zvierat šesť hodín po vyrovnaní koncentrácie v inhalačnej komore, päť dní v týždni (prerušované vystavenia), alebo pri pravdepodobnom vystavení z prostredia 22 až 24-hodinové vystavenie denne sedem dní v týždni (nepretržité vystavenie), každý deň je v ten istý čas vyhradená jedna hodina na kŕmenie a údržbu testovacej komory. V oboch prípadoch sú zvieratá obvyčajne ovplyvňované stálou koncentráciou testovanej látky. Podstatný rozdiel medzi prerušovaným a nepretržitým vystavením je, že v prvom je 17 až 18-hodinový interval, v ktorom sa môžu zvieratá zotaviť z príznakov denného vystavenia dokonca s ešte dlhším intervalom na zotavenie cez víkendy.

Výber prerušovaného alebo nepretržitého vystavenia závisí od cieľov testu a ľudského vystavenia, ktoré je simulované v testoch. Musia sa brať do úvahy aj určité technické problémy. Napríklad výhody nepretržitého vystavenia pri simulácii podmienok prostredia sa negujú nevyhnutnosťou kŕmenia a napájania počas vystavenia a potrebou zložitejších (spôľahlivých) aerosólov, vytvárania pary a tiež technikou monitorovania.

1.6.6. Komory pre vystavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačných komorách vytvorených pre udržanie aktívneho prúdu vzduchu s výmenou 12-krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Kontrolné komory a komory na vystavenie by mali mať rovnakú konštrukciu a tvar kvôli zaistieniu porovnateľných podmienok pre vystavenie vo všetkých ohľadoch, okrem testovanej látky. Jemný podtlak vnútri komory je bežne udržiavaný pre zabránenie rozptýlu testovanej látky do okolitého prostredia. Komory by mali minimalizovať tiesnenie testovaných zvierat. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory.

Merať a monitorovať by sa mali:

- i) Prúd vzduchu: pomer prietoku vzduchu cez komoru by mal byť, pokiaľ je možné, meraný nepretržite.
- ii) Koncentrácia: počas každodenného času vystavenia by sa koncentrácia testovanej látky nemala odchyľovať viac ako $\pm 15 \%$ od priemernej hodnoty. Počas celkového trvania testu by sa mala koncentrácia zo dňa na deň udržiavať konštantne, ako to je len možné.
- iii) Teplota a vlhkosť: pre hľodavce by mala byť udržiavaná teplota $22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a vlhkosť v komore 30 až 70 %, okrem prípadu, keď je použitá voda na rozptýlenie testovanej látky v atmosfére testovacej komory. Pokiaľ je možné, obe veličiny by mali byť monitorované nepretržite.
- iv) Meranie veľkosti častíc: mala by byť určená veľkosť rozptýlených častíc v atmosfére komory, vrátane kvapalných alebo pevných aerosólov. Aerosólové častice by mali mať dýchatelnú veľkosť pre použité testované zvieratá. Vzorky atmosféry v testovacej komore by mali byť otestované v dýchacej zóne zvierat. Vzorka vzduchu by mala reprezentovať distribúciu častíc, ktorou sú zvieratá ovplyvňované a mala by byť určená gravimetrickým stanovením pre všetky suspendované aerosóly, aj keď mnoho aerosólov nie je dýchatelných. Analýza veľkosti častíc by mala uskutočňovať často počas zostavovania testovacieho systému kvôli zaistieniu stability aerosólov a potom tak často, ako je nevyhnutné, počas ovplyvnenia stanoviť zhodnosť distribúcie častíc, ktorými sú ovplyvňované zvieratá.

1.6.7. Trvanie testu

Trvanie testu karcinogenity zahŕňa väčšiu časť normálnej dĺžky života testovaných zvierat. Ukončenie testu by malo byť po 18 mesiacoch u myši a škrečka a po 24 mesiacoch u potkana; pri určitých kmeňoch zvierat s väčšou dĺžkou života a/alebo s nízkym spontánnym výskytom tumorov by sa mal test ukončiť po 24 mesiacoch u myši a škrečka a po 30 mesiacoch u potkana. Alternatívne je takéto predĺžené sledovanie prijateľné, ak počet prežívajúcich zvierat v skupine s najnižšou dávkou alebo kontrole dosahuje 25 %. Pri ukončení testu, kde je výrazný rozdiel v odpovedi rôznych pohlaví, by sa malo hodnotiť každé pohlavie oddelene. Ak len skupina s najväčšou dávkou hynie predčasne na jasné následky toxicity, nie je dôvod na ukončenie testu za predpokladu, že prejav toxicity nie je problémom v ostatných skupinách. Pri negatívnych výsledkoch testu nie je prijateľná väčšia strata ako 10 % v každej skupine z dôvodu autolýzy, kanibalizmu alebo technických problémov a prežívanie všetkých skupín nie je nižšie ako 50 % počas 18 mesiacov u myši a škrečka a 24 mesiacov u potkana.

1.6.8. Postup

1.6.8.1. Pozorovania

Denné pozorovania v klietkach by mali zahŕňať: zmeny na koži a srsti, očiach, slizniciach ako aj dýchacieho, obehového, autonómneho a centrálneho nervového systému, somatomotorickú aktivitu a model správania.

Pravidelné pozorovania sú nevyhnutné pre zabezpečenie, že počet zvierat nebude klesať počas testu z dôvodov kanibalizmu, autolýzy tkanív a nesprávneho premiestňovania. Chradnúce zvieratá by mali byť utratené a vypitvané.

Klinické príznaky a mortalita by mala byť zaznamenávaná pri všetkých zvieratách. Špeciálna pozornosť sa musí venovať vzniku tumorov: mal by byť zaznamenaný čas vzniku, lokalizácia, rozmery, výzor a rast výrazne viditeľných alebo hmatateľných tumorov.

Počas prvých 13 týždňov pozorovania by mala byť meraná spotreba potravy (a vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) týždenne, a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ to nie je potrebné

zmeniť kvôli zdravotnému stavu alebo zmene hmotnosti.

Hmotnosť zvierat by mala byť zaznamenávaná individuálne pre všetky zvieratá raz za týždeň prvých 13 týždňov testovania a potom najmenej raz za štyri týždne.

1.6.8.2. *Klinické vyšetrenia*

Hematológia

Ak testovanie v klietkach predpokladá zhoršenie zdravia zvierat počas testu, mal by sarobiť krvný obraz postihnutých zvierat.

Po 12 a 18 mesiacoch a pred utratením je potrebné urobiť krvné stery zvierat. Krvný obraz sa urobí na vzorkách zo zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole. Ak údaje, zvlášť tie získané pred utratením alebo údaje z patologických skúšok, naznačujú nevyhnutnosť, mal by sa urobiť krvný obraz aj pre skupinu(-y) s nižšou dávkou.

Celková pitva

Všetky zvieratá by mali byť podrobené celkovej pitve, vrátane tých, ktoré zahynuli počas experimentu alebo boli utratené, lebo chradli. Všetky výrazne viditeľné tumory a poškodenia (lézie) alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť zafixované.

Všetky orgány a tkanivá by sa mali fixovať vo vhodných médiách pre možné budúce histopatologické vyšetrenia: mozog (vrátane časti predĺženej miechy/varolov most, mozočková a mozgová kôra), hypofýza, štítna žľaza (vrátane prítušných teliesok), každé tkanivo týmusu, priedušnica a pľúca, srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, kožu, pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, močový mechúr, zástupcu lymfatických uzlín, samičie mliečne žľazy, stehenné svalstvo, periférne nervy, hrudná kosť aj s kostnou dreňou, stehnová kosť (vrátane kĺbu), miecha z troch častí (krčná, stredno-hrudníková, bedrová) a oči.

Naplnenie pľúc a močového mechúra fixačným činidlom je optimálny spôsob zachovania týchto tkanív: naplnenie pľúc pri inhalačných testoch je nevyhnutné pre primerané histopatologické vyšetrenia. Pri inhalačných testoch mal by byť uchovaný celý dýchací trakt, vrátane nosných dutín, hltana a hrtana.

Histopatológia

- a) Kompletné histopatologické vyšetrenie by malo byť urobené na orgánoch a tkanivách všetkých zvierat, ktoré zahynuli alebo boli utratené počas testu a všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupine s najvyššou dávkou.
- b) Všetky viditeľné tumory a poškodenia (lézie) alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť vyšetrené mikroskopicky vo všetkých skupinách.
- c) Ak je významný rozdiel vo výskyte neoplastických (rakovinových) poškodení (lézií) v skupine s najvyššou dávkou v porovnaní s kontrolou, malo by byť urobené histopatologické vyšetrenie obzvlášť na postihnutých orgánoch alebo tkanivách aj v ostatných skupinách.
- d) Ak je prežívanie v skupine s najvyššou dávkou podstatne nižšie ako v kontrole, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou.
- e) Ak je v skupine s najvyššou dávkou dôkaz toxických alebo iných príznakov, ktoré môžu mať vplyv na rakovinovú odpoveď, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou.

2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté do tabuľky a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich tumory objavené počas testu, čas ich objavenia a počet zvierat s tumormi objavenými po pitve. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

- druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,
- podmienky pri teste:

3.1.1. Opis zariadenia pre vystavenie:

vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačný systém, spracovanie odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zariadenie na meranie teploty, vlhkosti a, kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

3.1.2. Údaje o vystavení:

mali by byť v tabuľkách, s uvedením priemernej hodnoty a miery variability (napr. smerodajnej odchýlky) a mali by obsahovať:

- a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;
- b) teplotu a vlhkosť vzduchu;
- c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);
- d) povahu nosiča, ak je použitý;
- e) aktuálnu koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;
- f) strednú veľkosť častíc (kde je to vhodné),
- veľkosti dávok (vrátane nosiča, ak bol použitý) a koncentrácie,
- výskyt tumorov podľa pohlavia, dávky a typu tumoru,
- časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,
- údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a dávku,
- opis toxických alebo iných príznakov,
- čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,
- údaje o výžive a hmotnosti,
- použité hematologické testy a všetky ich výsledky,
- nálezy pitvy,
- detailný opis všetkých histopatologických nálezov,

- štatistické spracovanie výsledkov a opis použitých metód,
- diskusia o výsledkoch,
- interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.33. KOMBINOVANÝ TEST CHRONICKEJ TOXICITY/KARCINOGENITY**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Cieľom kombinovaného testu chronickej toxicity/karcinogenity je zistiť chronické a karcinogénne účinky látky pre človeka po predĺženom vystavení.

Z tohto dôvodu je test karcinogenity doplnený najmenej jednou satelitnou vystavenou skupinou a satelitnou kontrolnou skupinou. Dávky použité v satelitnej skupine s vysokou dávkou môžu byť vyššie ako sú použité v skupine s najvyššou dávkou pri teste karcinogenity. U zvierat v teste karcinogenity sa sleduje celková toxicita ako aj karcinogénna odpoveď. U zvierat v satelitnej vystavenej skupine sa sleduje celková toxicita.

Testovaná látka je bežne podávaná sedem dní v týždni vhodným spôsobom v niekoľkých skupinách pokusných zvierat, jedna dávka na jednu skupinu počas väčšej dĺžky ich života. Počas a po vystavení testovanej látke sú u pokusných zvierat denne sledované príznaky toxicity a vznik tumorov.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú udržiavané v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a vystavených skupín a označia.

1.6.1. Pokusné zvieratá

Preferovaným druhom je potkan. Na základe výsledkov predchádzajúcich testovaní iných zvierat (hlodavcov alebo nehlodavcov) môžu byť použité aj iné druhy. Mali by byť použité bežné laboratórne kmene mladých zdravých zvierat a dávkovanie by sa malo začať čo najskôr po odstavení od matky.

Na začiatku testu by variabilita hmotnosti zvierat nemala presahovať $\pm 20\%$ primeranej priemernej hodnoty. Ak sa robí sub-chronické orálne testovanie ako predbežné k dlhodobým testom, mali by byť použité v oboch testoch rovnaké druhy alebo línie/kmene.

1.6.2. Počet a pohlavie

Pri hlodavcoch by malo byť použitých aspoň 100 zvierat (50 samíc a 50 samcov) pre každú dávku aj súběžnú kontrolu. Samice by mali byť virgínne negravídne. Ak je v pláne utraťiť nejaké zvieratá aj počas testu, počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utraťené pred ukončením testu.

Vystavená satelitná skupina alebo skupiny pre iné patologické vyšetrenia ako nádorové by mala mať 20 zvierat z každého pohlavia, zatiaľ čo satelitná kontrolná skupina 10 zvierat z každého pohlavia.

1.6.3. Dávkovanie a frekvencia expozície

Na účely testu karcinogenity by mali byť okrem súbežnej kontrolnej skupiny použité aspoň tri rôzne dávky. Najvyššia dávka by mala vyvolať minimálne príznaky toxicity ako slabé zníženie hmotnosti (menej ako $\pm 10\%$). Zmeny v dĺžke života by nemali byť spôsobené inými vplyvmi ako sú tumory.

Najnižšia dávka by nemala mať vplyv na normálny rast, vývin a dĺžku života zvierat ani vyvolávať žiadne toxické príznaky. Všeobecne by nemala byť nižšia ako 10 % najvyššej dávky.

Stredná dávka alebo dávky by mali byť stanovené v strednom intervale medzi najvyššou a najnižšou dávkou.

Výber dávok môže byť odhadnutý z údajov z predchádzajúcich sledovaní a testov toxicity.

Na účely testu chronickej toxicity sa pridáva do experimentu ďalšia vystavená a súbežná satelitná kontrolná skupina. Najvyššia dávka pre satelitnú vystavenú skupinu zvierat by mala spôsobovať jednoznačné toxické príznaky.

Bežná frekvencia ovplyvňovania je denná.

Ak je chemikália podávaná v pitnej vode alebo primiešaná do jedla, mali by byť k dispozícii nepretržite.

1.6.4. Kontroly

Mali by sa použiť súbežné kontrolné skupiny, ktoré sú identické v každom ohľade s vystavenými skupinami okrem podávanej testovanej látky.

Za špeciálnych okolností ako sú inhalačné testy aerosólov alebo použitie emulgátorov s neurčenou biologickou aktivitou v orálnych testoch mala by sa použiť ďalšia kontrolná skupina, ktorá nie je vystavená ani použitým nosičom.

1.6.5. Spôsob podávania

Tri základné spôsoby podávania sú orálne, kožné (dermálne) a inhalácia. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej látky a je pravdepodobný pre vystavenie človeka.

1.6.5.1. Orálne testy

Ak je testovaná látka absorbovaná z gastrointestinálneho traktu a ak je prehltnutie jedným zo spôsobov, ako môže byť človek exponovaný, pokiaľ nie sú vedľajšie účinky, odporúča sa orálny spôsob podávania. Zvieratá môžu prijímať testovanú látku v potrave, rozpustenú v pitnej vode, alebo podávanú v kapsuliach.

Ideálne by malo byť použité denné dávkovanie počas siedmich dní v týždni, pretože dávkovanie počas piatich dní v týždni by mohlo spôsobiť zotavenie alebo ústup toxicity v čase nedávkovania, a to ovplyvní výsledok a ďalšie hodnotenie. Z praktického hľadiska je však prijateľné aj dávkovanie päť dní v týždni.

1.6.5.2. Kožné (dermálne) testy

Vystavenie kože natieraním môže byť vybrané kvôli simulácii hlavného spôsobu vystavenia človeka a tiež ako modelový systém pre indukciu kožných poškodení (lézií).

1.6.5.1. *Inhalačné testy*

Pretože inhalačné testy predstavujú technický problém pre ich väčšiu komplikovanosť v porovnaní s inými spôsobmi podávania, vyžadujú detailnejší návod pre tento spôsob podávania testovanej látky. Je nutné poznamenať, že vnútropriedušnicová injekcia (infúzia) môže byť opodstatnenou alternatívou za špecifickej situácie.

Vzorom pre dlhodobé testy sú obvyčajne predpokladané vystavenia ľuďí, čo znamená denné vystavenie zvierat šesť hodín po vyrovnaní koncentrácie v inhalačnej komore, päť dní v týždni (prerušované vystavenie) alebo pri pravdepodobnom vystavení z prostredia 22 až 24-hodinové vystavenie denne sedem dní v týždni (nepretržité vystavenie), každý deň je v ten istý čas vyhradená jedna hodina na kŕmenie a údržbu testovacej komory. V oboch prípadoch sú zvieratá obvyčajne vystavené stálej koncentrácii testovanej látky. Podstatný rozdiel medzi prerušovaným a nepretržitým vystavením je, že v prvom je 17 až 18-hodinový interval, v ktorom sa môžu zvieratá zotaviť z príznakov denného vystavenia dokonca s ešte dlhším intervalom na zotavenie cez víkendy.

Výber prerušovaného alebo nepretržitého vystavenia závisí od cieľov testu a ľudskej expozície, ktorá je simulovaná v testoch. Musia sa brať do úvahy aj určité technické problémy. Napríklad výhody nepretržitého vystavenia pri simulácii podmienok prostredia sa negujú nevyhnutnosťou kŕmenia a napájania počas vystavenia a potrebou zložitejších (spoľahlivých) aerosólov, vytvárania pary a tiež technikou monitorovania.

1.6.6. Komory pre vystavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačných komorách vytvorených pre udržanie aktívneho prúdu vzduchu s výmenou 12-krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Kontrolné komory a komory na vystavenie by mali mať rovnakú konštrukciu a tvar kvôli zaistieniu porovnateľných podmienok pre ovplyvnenie vo všetkých ohľadoch okrem testovanej látky. Jemný podtlak vo vnútri komory je bežne udržiavaný pre zabránenie rozptylu testovanej látky do okolitého prostredia. Komory by mali minimalizovať tiesnenie testovaných zvierat. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory.

Meráť a monitorovať by sa mali:

- i) prúd vzduchu: pomer prietoku vzduchu cez komoru by mal byť, pokiaľ je možné, meraný nepretržite;
- ii) koncentrácia: počas každodenného času vystavenia by sa koncentrácia testovanej látky nemala odchyľovať viac ako $\pm 15\%$ od priemernej hodnoty. Počas celkového trvania testu by mala byť koncentrácia zo dňa na deň udržiavaná konštantne, ako je to len možné;
- iii) teplota a vlhkosť: pre hlodavce by mala byť udržiavaná teplota $22 \pm 2^\circ\text{C}$ a vlhkosť v komore 30 až 70 % okrem prípadu, keď je použitá voda na rozptýlenie testovanej látky v atmosfére testovacej komory. Pokiaľ je možné, obe veličiny by sa mali monitorovať nepretržite;
- iv) meranie veľkosti častíc: mala by byť určená veľkosť rozptýlených častíc v atmosfére komory, vrátane kvapalných alebo pevných aerosólov. Aerosólové častice by mali mať dýchateľnú veľkosť pre použité testované zvieratá. Vzorky atmosféry v testovacej komore by mali byť otestované v dýchacej zóne zvierat. Vzorka vzduchu by mala reprezentovať distribúciu častíc, ktorou sú zvieratá ovplyvňované a mala by byť určená gravimetrickým meraním pre všetky suspendované aerosóly, aj keď mnoho aerosólov nie je dýchateľných. Analýza veľkosti častíc by sa mala robiť často počas zostavovania testovacieho systému kvôli zaistieniu stability aerosólov a potom tak často, ako je nevyhnutné počas vystavenia stanoviť zhodnosť distribúcie častíc, ktorým sú zvieratá vystavené.

1.6.7. Trvanie testu

Trvanie testu karcinogenity zahŕňa väčšiu časť normálnej dĺžky života testovaných zvierat. Ukončenie testu by malo byť po 18 mesiacoch u myši a škrečka a po 24 mesiacoch u potkana; pri určitých kmeňoch zvierat s väčšou dĺžkou života a/alebo s nízkym spontánnym výskytom tumorov by sa mal test ukončiť po 24 mesiacoch u myši a škrečka a po 30 mesiacoch u potkana. Alternatívne, takéto predĺžené sledovanie je prijateľné, ak počet prežívajúcich zvierat v skupine s najnižšou dávkou alebo v kontrolnej skupine dosahuje 25 %. Pri ukončení testu, kde je výrazný rozdiel v odpovedi rôznych pohlaví, by sa malo hodnotiť každé pohlavie oddelene. Ak len skupina s najväčšou dávkou hynie predčasne na jasné následky toxicity, nie je dôvod na ukončenie testu za predpokladu, že prejav toxicity nie je problémom v ostatných skupinách. Pri negatívnych výsledkoch testu nie je prijateľná väčšia ako 10 % strata v každej skupine v experimente z dôvodu autolýzy, kanibalizmu alebo technických problémov a prežívanie všetkých skupín nie je nižšie ako 50 % počas 18 mesiacov u myši a škrečka a 24 mesiacov u potkana.

Satelitná skupina 20 vystavených zvierat z každého pohlavia a 10 zodpovedajúcich kontrolných zvierat z každého pohlavia, ktorá sa použije na test chronickej toxicity, by sa mala testovať najmenej 12 mesiacov. Tieto zvieratá sú po utratení určené na patologické vyšetrenia účinku testovanej látky na nekomplikované starecké (gerontologické) zmeny.

1.6.8. *Postup*

1.6.8.1. *Pozorovania*

Denné pozorovania v kliebkach by mali zahŕňať zmeny na koži a srsti, očiach, slizniciach ako aj dýchacieho, obehového, autonómneho a centrálného nervového systému, somatomotorickú aktivitu a model správania.

Klinické vyšetrenia by sa mali robiť vo vhodných intervaloch aj na zvieratách v satelitnej vystavenej skupine alebo skupinách.

Pravidelné pozorovania sú nevyhnutné, aby počet zvierat neklesal počas testu z dôvodov kanibalizmu, autolýzy tkanív a nesprávneho premiestňovania. Chradnúce zvieratá by mali byť utratené a vypitvané.

Klinické príznaky, vrátane neurologických a očných zmien, rovnako ako aj mortalita, by mali byť zaznamenané pre všetky zvieratá. Špeciálna pozornosť sa musí venovať vzniku tumorov: mal by byť zaznamenaný čas vzniku, lokalizácia, rozmery, výzor a rast výrazne viditeľných alebo hmatateľných tumorov; mal by sa zaznamenať čas nástupu a priebeh toxických príznakov.

Počas prvých 13 týždňov pozorovania by mala byť meraná spotreba potravy (a vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) týždenne, a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ to nie je potrebné zmeniť kvôli zdravotnému stavu alebo zmene hmotnosti.

Hmotnosť zvierat by mala byť zaznamenávaná individuálne pre všetky zvieratá raz za týždeň prvých 13 týždňov testovania a potom najmenej raz za štyri týždne.

1.6.8.2. *Klinické vyšetrenia*

Hematológia

Hematologické vyšetrenie (napr. obsah hemoglobínu, hematokrit, množstvo červených krviniek, množstvo bielych krviniek, krvných doštičiek, a ďalšie merania zrážanlivosti) by mali byť robené po treťom, po šiestom mesiaci a potom približne v šesťmesačných intervaloch a na konci testu na krvných vzorkách zozbieraných z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín. Mali by byť, ak je to možné, z tých istých potkanov v každom intervale.

Ak z klinických vyšetrení vyplýva zhoršenie zdravotného stavu zvierat počas testu, mal by sa urobiť krvný obraz u postihnutých zvierat. Krvný obraz sa robí na vzorkách zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole. Pre skupiny s nižšou dávkou sa robí iba, ak je veľký rozdiel medzi skupinou s najvyššou dávkou a kontrolou, alebo ak sú zistené patologické nálezy.

Analýza moču

Mali by sa zbierať vzorky moču na analýzu z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín, ak je to možné v každom odbere z tých istých potkanov, podobne ako pri hematologickom vyšetrení. Nasledujúce údaje by mali byť pri hlodavcoch robené individuálne pre každé zviera alebo na spojenej vzorke pre každé pohlavie a skupinu:

- vonkajšie hodnotenie: objem a hustota pre každé zviera,
- proteíny, glukóza, ketóny, krv alebo krvné farbivo (semikvantitatívne),
- mikroskopické vyšetrenie sedimentu (semikvantitatívne).

Biochemické testy

Približne v šesťmesačných intervaloch a na konci testu by sa mali odoberať vzorky krvi zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín na biochemické vyšetrenie, ak je to možné v každom odbere z tých istých potkanov. Navyše z nehlodavcov by mali vzorky zozbierané aj pred testom. Zo vzoriek sa pripraví plazma a stanoví sa nasledujúce hodnoty:

- koncentrácia celkových proteínov,
- koncentrácia albumínu,
- pečeňové testy [ako aktivita alkalického fosfatázy, glutamát-piruvát transaminázy ⁽¹⁾ 4, sérovej glutamát-oxalacetát transaminázy ⁽²⁾], gama glutamyl transpeptidázy, ornitín dekarboxylázy,
- metabolizmus uhľovodíkov ako glukóza na lačno,
- testy funkcie obličiek ako močovina v krvi.

Celková pitva

Všetky zvieratá by sa mali podrobiť celkovej pitve vrátane tých, ktoré uhynuli počas experimentu alebo boli utratené, lebo chradli. Pred utratením by mali byť odobrané vzorky krvi zo všetkých zvierat pre stanovenie krvného obrazu. Všetky výrazne viditeľné poškodenia (lézie), tumory alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť zafixované. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

Všetky orgány a tkanivá by sa mali zafixovať pre histopatologické vyšetrenie. Týka sa to zvyčajne nasledujúcich orgánov a tkanív: mozog ⁽³⁾ (predĺžená miecha/varolov most, mozočková a mozgová kôra), hypofýza, štítna žľaza (vrátane prítitných teliesok), týmus, pľúca (vrátane priedušnice), srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň ⁽³⁾, slezina, obličky, nadobličky ⁽³⁾, pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, maternica, močový mechúr, lymfatické uzliny, pankreas, gonády ⁽³⁾, (prídavné pohlavné orgány), samicie mliečne žľazy, kožu, svalstvo, periférne nervy, miecha (krčná, hrudná, bedrová), hrudná kosť aj s kostnou dreňou, stehnová kosť (vrátane klbu) a oči.

Naplnenie pľúc a močového mechúra fixačným činidlom je optimálny spôsob zachovania týchto tkanív, naplnenie pľúc pri inhalačných testoch je nevyhnutné pre primerané histopatologické vyšetrenia. Pri špeciálnych testoch ako sú inhalačné testy, by mal byť preskúmaný dýchací trakt, vrátane nosa, hltana a hrtana.

Ak sa vykonávajú aj iné klinické vyšetrenia, mali by byť výsledky z nich dostupné pred mikroskopickým vyšetrením, pretože môžu poskytnúť dôležité informácie pre patológa.

Histopatológia

Pre časť testu na chronickú toxicitu:

Podrobné vyšetrenia by sa mali urobiť na všetkých fixovaných orgánoch všetkých zvierat zo satelitnej skupiny s najvyššou dávkou a v kontrole. Ak sa v satelitnej skupine s vysokou dávkou zistili patologické nálezy podmienené testovanou chemickou látkou, mali by byť na konci experimentu predmetom kompletného detailného histologického vyšetrenia cieľové orgány všetkých ostatných zvierat vo všetkých satelitných vystavených skupinách, ako aj z vystavených skupín z časti testu pre karcinogenitu.

Pre časť testu na karcinogenitu:

- a) Kompletné histopatologické vyšetrenie by malo byť urobené na orgánoch a tkanivách všetkých zvierat, ktoré zahynuli alebo boli utratené počas testu a všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupine s najvyššou dávkou.

⁽¹⁾ V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.

⁽²⁾ V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

⁽³⁾ Tieto orgány od desiatich zvierat z jedného pohlavia a skupiny hlodavcov a všetkých nehlodavcov by mali byť odvážené.

- b) Všetky viditeľné tumory alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor vo všetkých skupinách na všetkých orgánoch by mali byť vyšetrené mikroskopicky.
- c) Ak je významný rozdiel vo výskyte neoplastických (rakovinových) poškodení (lézií) v skupine s najvyššou dávkou v porovnaní s kontrolou, malo by byť urobené histopatologické vyšetrenie obzvlášť na postihnutých orgánoch alebo tkanivách aj v ostatných skupinách.
- d) Ak je prežívanie v skupine s najvyššou dávkou podstatne nižšie ako v kontrole, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou.
- e) Ak je v skupine s najvyššou dávkou dôkaz toxických alebo iných príznakov, ktoré môžu mať vplyv na rakovinovú odpoveď, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou.

2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich tumory alebo toxické príznaky počas testu, čas nástupu a počet zvierat, u ktorých boli zistené tumory po usmrtení. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

- druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,
- podmienky pri teste:

3.1.1. Opis zariadenia na ovplyvňovanie:

vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačný systém, spracovanie odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zariadenie na meranie teploty, vlhkosti a, kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

3.1.2. Údaje o vystavení:

mali by byť v tabuľkách, s uvedením priemernej hodnoty a miery variability (napr. smerodajnej odchýlky) a mali by obsahovať:

- a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;
 - b) teplotu a vlhkosť vzduchu;
 - c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);
 - d) povahu nosiča, ak je použitý;
 - e) aktuálnu koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;
 - f) strednú veľkosť častíc (kde je to vhodné),
- veľkosti dávok (vrátane nosiča, ak bol použitý) a koncentrácie,

- výskyt tumorov podľa pohlavia, dávky a typu tumoru,
- časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,
- údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a dávku,
- opis toxických alebo iných príznakov,
- čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,
- oftalmologické nálezy,
- údaje o výžive a hmotnosti,
- použité hematologické testy a všetky ich výsledky,
- použité klinické biochemické testy a všetky ich výsledky (vrátane výsledkov každej analýzy moču),
- nálezy pitvy,
- detailný opis všetkých histopatologických nálezov,
- štatistické spracovanie výsledkov a opis použitých metód,
- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.34. JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod častí B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod častí B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná v odstupňovaných dávkach v niekoľkých skupinách samcov a samíc. Samce by mali byť ovplyvňované počas rastu a najmenej jeden úplný cyklus spermatogenézy (približne 56 dní u myší a 70 dní u potkanov) s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na spermatogenézu.

Samice parentálnej (P) generácie by mali byť vystavené po dobu aspoň dvoch kompletných ovulačných cyklov s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na ovuláciu. Potom sa zvieratá spária. Testovaná látka sa podáva obom pohlaviu počas periódy párenia a potom len samiciam počas gravidity a počas laktácie. Pre inhalačné vystavenie je potrebné túto metódu modifikovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

Pred testom sú zdravé mladé dospelé zvieratá náhodne rozdelené do skupín vystavenia a kontrolných skupín a označené. Zvieratá sú držané v experimentálnych laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred testom. Odporúča sa podávať testovanú látku v potrave alebo v pitnej vode. Ostatné spôsoby podávania sú tiež prijateľné. Všetky zvieratá by mali byť vystavené rovnakým spôsobom počas primeranej doby experimentu. Ak sú nosiče alebo ďalšie pomocné látky použité pri dávkovaní, nemali by mať toxický efekt. Dávkovanie by malo byť sedem dní v týždni.

1.6.2. Pokusné zvieratá

Výber druhov Preferované druhy sú myš a potkan. Mali by byť použité zdravé zvieratá, ktoré neboli predmetom žiadnych testov. Nemali by byť použité kmene s nízkou plodnosťou. Zvieratá by mali byť charakterizované vo vzťahu k druhu, kmeňu, pohlaviu, hmotnosti a/alebo veku.

Samce aj samice by mali byť primerane vyšetrené na stanovenie plodnosti. Všetky testované aj kontrolné zvieratá by mali pred začiatkom podávania testovanej látky odstavené od matky.

Počet a pohlavie

Každá vystavená aj kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat, čo znamená asi 20 gravidných samíc v čase vrhu alebo krátko pred ním.

Cieľom je získať dosť gravidít a potomstva pre zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia potenciálneho účinku testovanej látky na plodnosť, graviditu a správanie matky v P generácii a na kojené mláďatá, rast a vývin F₁ potomstva po odstavení od matky.

1.6.3. Podmienky testu

Potrava a voda by sa mali poskytovať ľubovoľne (ad libidum). Tesne pred vrhom by mali byť samice separované v pôrodných klietkach alebo v klietkach pre matky s poskytnutým materiálom pre hniezdenie.

1.6.3.1. Testované dávky

Mali by byť použité aspoň tri testované dávky a kontrola. Ak je nosič použitý pre podávanie testovanej látky, kontrolná skupina by mala dostávať nosič v najväčšom použitom objeme. Ak testovaná látka spôsobuje redukciu príjmu potravy alebo jej metabolizmu, je potrebné považovať o použití zodpovedajúcej kontrolnej skupiny. V ideálnom prípade, ak neexistuje nejaké obmedzenie kvôli fyzikálnej/chemickej povahe alebo biologickým vlastnostiam testovanej látky, najvyššia dávka by mala indukovať toxické príznaky, ale nie mortalitu v parentálnej (P) generácii. Stredná dávka alebo dávky by mali indukovať minimálne toxické príznaky spôsobené testovanou látkou a najnižšia dávka by nemala indukovať žiadne pozorovateľné nepriaznivé účinky na rodičov alebo potomkov. Ak sa určená dávka podáva sondou alebo v kapsuliach, dávka by mala byť závislá na individuálnej hmotnosti zvierat a prispôbovaná každý týždeň zmenám hmotnosti. Pre samice počas gravidity môže dávka závisieť od hmotnosti v nultom alebo šiestom dni gravidity, ak je potrebné.

1.6.3.2. Limitný test

V prípade látky s nízkou toxicitou, ak dávka aspoň 1 000 mg/kg neindukuje žiadne negatívne vplyvy na reprodukčnú schopnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné. Ak predbežné pokusy s najvyššou dávkou a jasnými toxickými príznakmi na matku nevykazujú nepriaznivý účinok na plodnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné.

1.6.3.3. Vykonanie testu

Experimentálny plán

Začiatok denného dávkovania samcom parentálnej (P) generácie by mal byť v piatom až deviatom týždni života, keď by mali byť odstavení od matky a aklimatizovaní aspoň päť dní. U potkanov dávkovanie pokračuje 10 týždňov do periódy párenia (pre myši osem týždňov). Samce môžu byť utratené a vyšetrené na konci periódy párenia alebo môžu byť držané na testovanej diete pre možnosť druhého vrhu a môžu byť utratené a vyšetrené niekedy na konci pozorovania. Pre parentálne (P) samice sa dávkovanie začína aspoň po piatich dňoch aklimatizácie a pokračuje aspoň dva týždne pred párením. Denné dávkovanie P samíc by malo pokračovať počas trojtýždňovej periódy párenia, gravidity až do odstavenia F₁ potomstva. Do úvahy by sa mala brať modifikácia dávkovacieho plánu na základe iných dostupných informácií o testovanej látke, ako je indukcia metabolizmu alebo bioakumulácia.

Postup pri párení

V reprodukčnom teste toxicity sa môžu použiť pomery párenia 1:1 (jeden samec a jedna samica) alebo 1:2 (jeden samec a dve samice).

Pri pomere párenia 1:1 samica môže byť umiestnená s tým istým samcom, kým sa neprejaví gravidita alebo uplynú tri týždne. Každé ráno by mali byť samice vyšetrené na prítomnosť spermií alebo vaginálnej zátky. Deň 0 gravidity je definovaný ako deň, keď je spozorovaná vaginálna zátka alebo spermie.

Pri bezvýslednom párení by mali byť zvieratá vyšetrené na príčinu neplodnosti.

To znamená možnosť ďalšieho párenia s inými samcami alebo samicami, prípadne mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a overenie ovulačného cyklu alebo spermatogenézy.

Veľkosť vrhu

Ovplyvňovanie zvierat počas testu poskytuje normálnu možnosť vrhu a výchovu potomstva do štádia odstavenia od matky bez štandardizácie vrhov.

Ak je urobená štandardizácia, predpokladajú sa nasledovné postupy. Medzi dňom 1 a 4 po narodení je veľkosť každého vrhu upravená elimináciou plodov navyše, a to selekciou štyroch samcov a štyroch samíc v jednom vrhu.

Ak počet samcov a samíc neumožňuje získať štyri zvieratá z každého pohlavia v jednom vrhu, je akceptovateľná čiastočná úprava (napríklad päť samcov a tri samice). Úprava je nereálna pre vrhy s menej ako ôsmimi plodmi.

1.6.4. Pozorovania

Počas testovacieho obdobia by malo byť každé zviera pozorované denne aspoň raz. Mali by byť zaznamenané nápadné zmeny správania, príznaky ťažkého alebo oneskoreného vrhu a všetky toxické príznaky, vrátane úmrtnosti. V období pred párením a počas párenia by mala byť denne meraná spotreba potravy. Po vrhu a počas laktácie by mala byť meraná spotreba potravy (a spotreba vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) v ten istý deň ako váženie vrhu. P samce a samice by mali byť odvážené prvý deň dávkovania a potom raz týždenne. Tieto pozorovania by mali byť zaznamenávané individuálne pre každé dospelé zviera.

Trvanie gravidity sa počíta odo dňa 0 gravidity. Každý vrh by sa mal čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť množstvo a pohlavie plodov, potratov (mŕtvych plodov) živých plodov a prítomnosť výrazných anomálií.

Mŕtve plody a plody utratené v deň 4 by sa mali fixovať a vyšetriť na možné defekty. Živé plody by sa mali spočítať a vrhy odvážiť ráno hneď po narodení, na 4. a 7. deň a potom raz za týždeň do konca pozorovania, keď by mali byť zvieratá odvážené individuálne.

Mali by sa zaznamenať fyzické abnormality a poruchy správania samíc alebo potomstva.

1.6.5. Patológia

1.6.5.1. Pitva

Zvieratá P generácie by sa mali makroskopicky vyšetriť v čase utratenia alebo uhynutia počas testu na všetky štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny so špeciálnou pozornosťou na reprodukčné orgány. Mŕtve a chradnúce plody by sa mali vyšetriť na defekty.

1.6.5.2. Histopatológia

Pre mikroskopické vyšetrenie by sa mali fixovať vaječníky, maternica, krček maternice, vagína, semenníky, nadsemenníky, semenné vajíčky, prostata, koagulačná žľaza, hypofýza, a zasiahnuté orgány všetkých P zvierat. V prípade že tieto orgány neboli vyšetrené v iných testoch s viacerými dávkami, mali by byť mikroskopicky vyšetrené zo všetkých zvierat zo skupiny s najvyššou dávkou a z kontrolnej skupiny a zo zvierat, ktoré uhynuli počas pozorovania.

Orgány vykazujúce abnormality v týchto zvieratách by mali byť potom vyšetrené vo všetkých ostatných P zvieratách. Za týchto okolností by malo byť urobené mikroskopické vyšetrenie všetkých tkanív vykazujúcich výrazné patologické zmeny. Ak sa počas párenia zistila neplodnosť, mali by byť podrobené mikroskopickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat.

2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet plodných samcov, počet gravidných samíc, typy zmien a percento zvierat so všetkými typmi zmien.

Ak je to možné, výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. SPRÁVA**3.1. SPRÁVA Z TESTU**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

- použitý druh/kmeň,
- údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach, dávkach, vrátane plodnosti, gravidity a životaschopnosti,
- časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili do plánovaného času na utratenie, alebo do ukončenia testu,
- tabuľku uvádzajúcu údaje o hmotnosti každého vrhu, priemernú hmotnosť plodov a individuálnu hmotnosť plodov na konci testu,
- toxické alebo iné príznaky na reprodukciu, potomstvo a postnatálny rast,
- čas objavenia každého abnormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,
- údaje o hmotnosti pre P zvieratá,
- nálezy pitvy,
- detailný opis všetkých mikroskopických nálezov,
- štatistické spracovanie výsledkov, kde je to vhodné,
- diskusia o výsledkoch,
- interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. ODKAZY

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.35. DVOJGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY**1. METÓDA**

Táto metóda zodpovedá OECD TG 416 (2001).

1.1. ÚVOD

Táto metóda pre dvojgeneračné reprodukčné testovanie je navrhnutá tak, aby poskytla všeobecné informácie, ktoré sa týkajú účinkov testovanej látky na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov, vrátane funkcie pohlavných žliaz, estrálneho cyklu, rozmnožovacieho správania, počatia, gravidity, pôrodu, laktácie a odstavenia a rastu a vývoja potomstva. Štúdia môže poskytnúť informácie aj o účinkoch testovanej látky na neonatálnu morbiditu, mortalitu a predbežné údaje o prenatalnej a postnatálnej vývojovej toxicite a slúži ako usmernenie pre ďalšie testy. Okrem pozorovania rastu a vývoja F_1 generácie je táto testovacia metóda určená aj na posúdenie integrity a činnosti samčích a samičích reprodukčných systémov, ako aj rastu a vývoja F_2 generácie. Za účelom získania ďalších informácií o vývojovej toxicite a funkčných poruchách je možné do tohto protokolu zapracovať tiež ďalšie časti štúdie s použitím metód pre vývojovú toxicitu a/alebo v prípade potreby vývojovú neurotoxicitu, alebo by sa tieto konečné body mohli skúmať v samostatných štúdiách s použitím vhodných testovacích metód.

1.2. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa podáva viacerým skupinám samčích a samičích pokusných zvierat v odstupňovaných dávkach. Samcom P generácie sa podáva testovaná látka počas rastu a minimálne počas jedného úplného cyklu spermatogenézy (približne 56 dní u myši a 70 dní u potkana), aby sa zistili nepriaznivé účinky na spermatogenézu. Účinky na spermie sa stanovujú na základe množstva parametrov pre spermie (napr. morfológia spermie a pohyblivosť) a v preparátoch tkanív dôkladným histopatologickým vyšetrením. Ak sú dostupné údaje o spermatogenéze z predchádzajúcej štúdie pri opakovaných dávkach s dostatočným trvaním, napr. 90-dňová štúdia, nie je potrebné do štúdie zahrnúť samce P generácie. Odporúča sa však, aby sa uchovali vzorky alebo digitálne záznamy spermy P generácie na umožnenie neskoršieho posúdenia. Samiciam P generácie sa podáva testovaná látka počas rastu a v priebehu niekoľkých úplných estrálnych cyklov, aby sa dali stanoviť všetky nepriaznivé účinky testovanej látky na normálny priebeh estrálneho cyklu. Testovaná látka sa podáva rodičom (P) počas ich párenia, počas výslednej gravidity a počas odstavenia ich F_1 potomstva. Po odstavení pokračuje podávanie látky F_1 potomstvu počas ich rastu do dospelosti, párenia a narodenia F_2 generácie až do odstavenia F_2 generácie.

Klinické pozorovania a patologické vyšetrenia sa vykonávajú na všetkých zvieratách na príznaky toxicity s osobitným dôrazom na účinky na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov a na rast a vývoj potomstva.

1.3. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.3.1. Výber druhu zvierat**

Na testovanie sa prednostne používa potkan. Je potrebné zdôvodniť použitie iných druhov a budú potrebné príslušné úpravy. Kmene s nízkou plodnosťou, alebo o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt vývojových porúch, sa nemajú používať. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia.

1.3.2. Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C ($\pm$ 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej látky, keď sa podáva týmto spôsobom.

Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Párenie sa uskutočňuje v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Po zaznamenaní kopulácie sa spárené samice umiestnia jednotlivo do pôrodných klietok alebo do klietok pre matky. Spárené potkany sa môžu držať aj v malých skupinách a oddeliť jeden alebo dva dni pred pôrodom. Krátko pre termínom vrhu sa spáreným zvieratám poskytne vhodný a definovaný hniezdiaci materiál.

1.3.3. **Príprava zvierat**

Použijú sa zdravé mladé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň 5 dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Je potrebné, aby boli známe všetky súrodenecké vzťahy medzi zvieratami, aby sa zabránilo páreniu medzi súrodencami. Zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolnej a ošetrovanej skupiny (odporúča sa rozdelenie podľa telesnej hmotnosti). Kliecky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klieckov. Každému zvieratú sa priradí vlastné identifikačné číslo. V prípade P generácie sa to uskutoční pred začiatkom dávkovania. V prípade F₁ generácie sa to uskutoční po odstavení zvierat vybraných na párenie. Pre všetky vybrané F₁ zvieratá sa uchovávajú záznamy s uvedením vrhu, z ktorého pochádzajú. Okrem toho sa odporúča individuálna identifikácia mláďat čo najskôr po narodení, keď sa posudzuje väzba jednotlivých mláďat alebo funkčné testy.

Rodičia (P) majú byť na začiatku dávkovania vo veku 5 až 9 týždňov. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách majú mať, pokiaľ je to možné, rovnakú hmotnosť a vek.

1.4. **POSTUP**

1.4.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolovaná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat tak, aby bolo k dispozícii pokiaľ možno 20 gravidných samíc, ktoré rodia, alebo čoskoro budú rodiť. V prípade látok, ktoré spôsobujú neželateľné účinky v súvislosti s ošetrovaním (napr. sterilitu, nadmernú toxicitu pri vysokej dávke), toto nie je možné. Cieľom je dosiahnuť dostatok gravidít, aby sa zabezpečilo zmysluplné posúdenie potenciálu látky ovplyvniť fertilitu, graviditu a správanie matky a dojčenie, rast a vývoj F₁ potomstva od počatia do zrelosti a vývoj ich potomstva (F₂) do odstavenia. Preto prípad, keď sa nedosiahne potrebný počet gravidných zvierat (t. j. 20), nevedie nevyhnutne k neplatnosti štúdie a posudzuje sa na základe jednotlivých prípadov.

1.4.2. **Príprava dávok**

Odporúča sa, aby sa testovaná látka podávala orálne (v krmive, pitnej vode alebo sondou), pokiaľ sa iná cesta podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) nepokladá za vhodnejšiu.

V prípade potreby sa testovaná látka rozpustí alebo rozptýli vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zväčšilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, musia byť známe toxické charakteristiky. Určí sa stabilita testovanej látky v nosiči.

1.4.3. **Dávkovanie**

Použijú sa aspoň tri veľkosti dávky a uskutoční sa paralelná kontrola. Pokiaľ to fyzikálno-chemické vlastnosti alebo biologické účinky testovanej látky pripúšťajú, zvolí sa najvyššia dávka tak, aby spôsobila toxicitu, ale nespôsobila úmrtie alebo silné utrpenie. V prípade nečakanej úmrtnosti, štúdie s mierou úmrtnosti menej ako približne 10 % u rodičov (P) sú zvyčajne ešte stále akceptovateľné. Klesajúca postupnosť veľkosti dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia v závislosti od dávkovania a hladina bez pozorovateľného nepriaznivého účinku (NOAEL). Intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. V prípade štúdií týkajúcich sa výživy interval medzi dávkami nemá mať vyšší faktor ako 3. Veľkosti dávok sa zvolia pri zohľadnení všetkých existujúcich údajov o toxicite, najmä výsledky zo štúdií pri opakovaných dávkach. Posúdia sa aj všetky dostupné informácie o metabolizme a kinetike testovanej látky alebo príbuzných materiáloch. Okrem toho napomôžu tieto informácie aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania.

Kontrolnou skupinou môže byť neošetrovaná skupina alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej látky používa nosič. Okrem ošetrovania s testovanou látkou sa so zvieratami v kontrolnej skupine zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusnej skupine. Ak sa používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme. Ak sa testovaná látka podáva v krmive a spôsobuje znížený príjem potravy alebo jej využitia, potom sa usudzuje, že je potrebné použiť paralelne kŕmenú kontrolnú skupinu. Údaje z kontrolných štúdií, určených na posúdenie účinkov zníženej spotreby potravy na reprodukčné parametre, sa alternatívne môžu použiť namiesto paralelne kŕmenej kontrolnej skupiny.

Je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám nosiča a iných prídavných látok: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej látky; vplyv na chemické vlastnosti testovanej látky, ktorý môže meniť jej toxické vlastnosti; a vplyv na spotrebu potravy a vody alebo nutričný stav zvierat.

1.4.4. Limitný test

Ak v orálnej štúdii s jednou dávkou s veľkosťou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo pri podávaní v krmive alebo pitnej vode rovnaký percentuálny podiel v krmive alebo pitnej vode s použitím postupov opísaných pre túto štúdiu nespôsobí žiadne pozorovateľné toxické účinky ani u rodičov, ani u ich potomstva a ak sa toxicita neočakáva na základe údajov zo štruktúrne a/alebo metabolicky príbuzných látok, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím viacerých veľkostí dávok. Limitný test sa uplatňuje s výnimkou prípadu, keď z expozície ľudí vyplýva, že je potrebné použiť vyššiu orálnu dávku. Pre iné typy podávania, ako je napr. inhalácia alebo dermálna aplikácia z fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky, ako je napr. rozpustnosť, často môže vyplývať a byť limitovaná maximálna prípustná úroveň expozície.

1.4.5. Podávanie dávok

Zvierať sa podáva testovaná dávka 7 dní v týždni. Uprednostňuje sa orálna cesta podávania (krmivo, pitná voda alebo sonda). Ak sa použije iný spôsob podávania, uvedie sa zdôvodnenie a môžu byť potrebné príslušné úpravy. Všetkým zvieratám sa podáva látka rovnakým spôsobom počas príslušného obdobia pokusu. Ak sa testovaná látka podáva sondou, je potrebné použiť žalúdočnú sondu. Objem kvapaliny podanej jednorázovo nesmie byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti je maximum pre kukuričný olej), s výnimkou vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravujú tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. V štúdiách, pri ktorých sa používa sonda, mláďatá zvyčajne dostávajú testovanú látku iba nepriamo v mlieku, pokiaľ sa im po odstavení nezačne látka podávať priamo. V štúdiách, pri ktorých sa látka podáva v krmive alebo pitnej vode, mláďatá dostanú dodatočne testovanú látku priamo, keď začnú jesť samostatne počas posledného obdobia laktácie.

Pre látky podávané v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej látky neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Keď sa testovaná látka podáva v krmive môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm) alebo stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat; použitá alternatíva sa musí špecifikovať. V prípade, keď sa látka podáva sondou, látka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôbi sa aspoň raz za týždeň, aby sa zachovala stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Informácie, ktoré sa týkajú placentárnej distribúcie, sa posudzujú pri prispôbení veľkosti dávky cez sondu založenej na hmotnosti.

1.4.6. Priebeh pokusu

Denné podávanie testovanej látky samčej a samičej rodičovskej generácii (P) sa začína, keď sú vo veku 5 až 9 týždňov. Denné podávanie testovanej látky F₁ generácii samcov a samíc sa začína po odstavení; je potrebné pamätať na to, že v prípade, keď sa testovaná látka podáva v krmive alebo pitnej vode, priama expozícia F₁ mláďat testovanou látkou sa môže vyskytnúť už počas laktačného obdobia. Pre obidve pohlavia (P a F₁) pokračuje podávanie látky minimálne 10 týždňov pred obdobím párenia. Podávanie látky pokračuje u oboch pohlaví počas 2-týždňového obdobia párenia. Samce sa humánnym spôsobom usmrtia a vyšetrí, ak už nie sú potrebné na hodnotenie účinkov na reprodukciu. Rodičovskej generácii samíc (P) pokračuje podávanie látky počas gravidity a až do odstavenia F₁ potomstva. Je potrebné venovať pozornosť úpravám harmonogramu dávkovania založeným na dostupných informáciách o testovanej látke vrátane existujúcich údajov o toxicite, vplyve na metabolizmus alebo bioakumulácii. Dávka pre jednotlivé zviera sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Je však potrebné venovať pozornosť pri nastavovaní dávky počas posledného trimestra gravidity.

Ošetrovanie samcov a samíc generácie P a F₁ pokračuje až do ukončenia. Všetky dospelé samce a samice generácie P a F₁ sa humánnym spôsobom usmrtia, ak už viac nie sú potrebné na hodnotenie účinkov na reprodukciu. Potomstvo generácie F₁, ktoré sa nevyberie na párenie, a celé potomstvo generácie F₂ sa po odstavení humánnym spôsobom usmrtia.

1.4.7. Párenie

1.4.7.1. Párenie rodičov (P)

V prípade každého párenia sa umiestni každá samica s jedným samcom z rovnakej dávkovej skupiny (párenie 1:1), pokiaľ sa neuskutoční kopulácia, alebo neuplynú 2 týždne. Každý deň sa samice vyšetrí na prítomnosť spermy alebo vaginálnej zátky. Za 0. deň gravidity sa určí deň, kedy sa zistil výskyt vaginálnej zátky alebo

spermy. V prípade neúspešného párenia sa zväži opätovné párenie samíc so samcami z rovnakej skupiny s preukázanou plodnosťou. Vzájomne spárené páry sa v údajoch zreteľne identifikujú. Je potrebné zabrániť páreniu súrodencov.

1.4.7.2. *Párenie F_1 generácie*

Pre párenie F_1 potomstva sa z každého vrhu po odstavení vyberie aspoň jeden samec a jedna samica na párenie s mláďatami tej istej dávkovej skupiny, ale z iného vrhu, aby sa vytvorila F_2 generácia. Výber mláďat z každého vrhu je náhodný, ak sa nezistili žiadne významné odlišnosti telesnej hmotnosti alebo vzhľadu zvierat z vrhu. V prípade, že sa zistia tieto odlišnosti, vyberú sa najlepší zástupcovia z každého vrhu. Prakticky je to najlepšie na základe telesnej hmotnosti, ale môže to byť vhodnejšie na základe vzhľadu. F_1 potomstvo by sa nemalo páriť, pokiaľ nedosiahne úplnú pohlavnú zrelosť.

Páry bez potomstva sa vyšetria, aby sa určila zjavná príčina neplodnosti. Toto môže zahŕňať také postupy, ako napr. ďalšie možnosti páriť sa s inými samcami alebo samicami s preukázanou plodnosťou, mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a vyšetrenie estrálnych cyklov alebo spermatogenézy.

1.4.7.3. *Druhé párenie*

V určitých prípadoch, ako napr. zmeny vo veľkosti vrhu súvisiace s ošetrovaním alebo zistenie nejednoznačného účinku pri prvom párení, sa odporúča, aby sa dospelé zvieratá P alebo F_1 generácie opätovne spáрили na vytvorenie druhého vrhu. Odporúča sa opätovné spárenie samíc alebo samcov, ktoré nevytvorili vrh so zvieratami opačného pohlavia s preukázanou plodnosťou. Ak sa pokladá za potrebné, aby sa uskutočnil druhý vrh v ktorejkoľvek generácii, zvieratá sa opätovne spária jeden týždeň po odstavení posledného vrhu.

1.4.7.4. *Veľkosť vrhu*

Zvieratám sa umožní, aby vrhli prirodzeným spôsobom a vychovávali svoje potomstvo až do odstavenia. Standardizácia veľkosti vrhu je nepovinná. Ak sa uskutoční štandardizácia, použitá metóda sa detailne popíše.

1.5. POZOROVANIA

1.5.1. **Klinické vyšetrenia**

Všeobecné klinické vyšetrenie sa uskutoční každý deň a v prípade podávania dávok cez sondu je potrebné, aby načasovanie zohľadnilo predpokladané maximálne účinky po podaní dávky. Zmeny v správaní, príznaky ťažkého alebo dlhotrvajúceho pôrodu a všetky príznaky toxicity sa zaznamenajú. Ďalšie podrobnejšie vyšetrenie každého zvieratá sa uskutoční aspoň raz do týždňa a môže sa to zvyčajne urobiť počas váženia zvieratá. Dvakrát za deň, počas víkendu raz za deň sa v prípade potreby u všetkých zvierat zisťuje morbidita a mortalita.

1.5.2. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody rodičovských zvierat**

Rodičovské zvieratá (P a F_1) sa odvážia v prvý deň po podaní látky a potom aspoň raz za týždeň. Rodičovské samice (P a F_1) sa odvážia minimálne v dňoch gravidity 0, 7, 14 a 20 alebo 21 a počas laktácie v rovnaké dni ako sa vážia mláďatá z vrhov a v deň, keď sa zvieratá usmrťia. Tieto zistenia sa zaznamenajú jednotlivo pre každé dospelé zviera. V čase pred obdobím párenia a graviditou sa spotreba krmiva meria minimálne raz za týždeň. Spotreba vody sa meria minimálne raz do týždňa, ak sa testovaná látka podáva vo vode.

1.5.3. **Estrálny cyklus**

Dĺžka estrálneho cyklu a normálny priebeh sa zisťuje u samíc P a F_1 generácie vaginálnymi výtermi pred párením a nepovinne počas párenia, pokiaľ sa nepotvrdí spárenie. Pri odbere vaginálnych/cervikálnych buniek je potrebné venovať pozornosť, aby sa neporušila sliznica a následne nevyvolala pseudogravidita (1).

1.5.4. **Parametre spermií**

Pre všetky samce P a F_1 generácie sa po usmrtení zaznamená hmotnosť semenníkov a nadsemenníkov a odloží sa po jednom z každého orgánu na histopatologické vyšetrenie (pozri oddiel 1.5.7, 1.5.8.1). Z časti pozostávajúcej z aspoň desiatich samcov z každej skupiny samcov generácie P a F_1 sa zostávajúce semenníky a nadsemenníky použijú na zistenie počtu spermatidov homogenizačne rezistentných, prípadne zásob spermií

z chvostovej časti nadsemenníkov. V prípade tejto istej časti samcov, sa spermie z chvostovej časti nadsemenníkov alebo semenovodu odoberú na vyšetrenie pohyblivosti a morfológie spermií. Ak sa zistia účinky v súvislosti s ošetrovaním, alebo ak existuje dôkaz z iných štúdií o možných účinkoch na spermatogézu, hodnotenie spermií sa uskutoční u všetkých samcov v každej dávkovej skupine; v opačnom prípade sa môže výpočet obmedziť na samce P a F₁ generácie z kontrolnej skupiny a skupiny s vysokými dávkami.

Zistí sa celkový počet homogenizačne rezistentných spermatidov a spermií z chvostovej časti nadsemenníkov (2) (3). Zásoby spermií z chvostovej časti nadsemenníkov sa odvodí na základe koncentrácie a objemu spermií v suspenzii použitej na doplnenie kvalitatívnych hodnotení a počtu spermií získaných následným pomletím a/alebo homogenizáciou zvyšného tkaniva chvostovej časti. Počet sa zistí u vybratej podskupiny samcov všetkých dávkových skupín bezprostredne po usmrtení zvierat, pokiaľ sa neurobia video alebo digitálne záznamy, alebo pokiaľ sa vzorky nezamrazia a neanalyzujú neskôr. V týchto prípadoch sa môže ako prvá analyzovať kontrolná skupina a skupina s vysokou dávkou. Ak sa nezistia žiadne účinky v súvislosti s ošetrovaním (napr. účinky na počet spermií, pohyblivosť alebo morfológiu), ostatné dávkové skupiny nie je potrebné analyzovať. Ak sa zaznamenajú účinky v súvislosti s ošetrovaním v skupine s vysokými dávkami, potom sa skupiny s nižšími dávkami tiež posúdia.

Posúdi sa pohyblivosť spermií v nadsemenníkoch (alebo semenovode), alebo sa zaznamená na video pásku bezprostredne po usmrtení. Spermie sa odoberú tak, aby sa minimalizovalo poškodenie a zriedia, aby sa mohla vykonať analýza pohyblivosti s použitím uznaných metód (4). Percento progresívne pohybujúcich sa spermií sa stanoví buď subjektívne alebo objektívne. Ak sa uskutočňuje počítačová analýza pohyblivosti (5) (6) (7) (8) (9) (10), odvodenie progresívnej pohyblivosti sa zakladá na maximálnych hodnotách definovaných užívateľom pre priemernú rýchlosť dráhy a priamosť alebo lineárny index. Ak sa vzorky nahrávajú na videopásky (11), alebo sa obrázky inak zaznamenávajú počas autopsie, môže sa vykonať následná analýza iba kontrolnej skupiny a skupiny s vysokými dávkami samcov generácie P a F₁, pokiaľ sa nezistia účinky v súvislosti s ošetrovaním; v takomto prípade sa posúdia aj skupiny s nižšími dávkami. Pri neprítomnosti video alebo digitálnych záznamov sa všetky vzorky vo všetkých ošetrovaných skupinách analyzujú pri autopsii.

Uskutoční sa morfologické vyšetrenie spermií zo vzorky z nadsemenníkov (alebo semenovodu). Spermie (minimálne 200 na vzorku) sa vyšetrí ako fixné, mokré preparáty (12) a zatriedia sa ako buď normálne alebo abnormálne. Vzorky morfologických abnormalít spermií zahrnujú fúziu, oddelené hlavičky a zdeformované hlavičky a/alebo bičiky. Vyšetrenie sa vykoná na vybratej podskupine samcov všetkých dávkových skupín buď bezprostredne po usmrtení zvierat, alebo neskôr na základe video alebo digitálnych záznamov. Stery po fixovaní sa tiež môžu posúdiť neskôr. V týchto prípadoch sa môže ako prvá analyzovať kontrolná skupina a skupina s vysokou dávkou. Ak sa nepozorujú žiadne účinky v súvislosti s ošetrovaním (napr. účinky na morfológiu spermií), ostatné dávkové skupiny nie je potrebné analyzovať. Ak sa zaznamenajú účinky v súvislosti s ošetrovaním v skupine s vysokými dávkami, potom sa skupiny s nižšími dávkami tiež posúdia.

Ak sa horeuvedené parametre hodnotenia spermií už preskúmali ako súčasť štúdie systémovej toxicity o dĺžke aspoň 90 dní, nie je ich potrebné zopakovať v dvojgeneračnej štúdii. Odporúča sa však, aby sa uchovali vzorky alebo digitálne záznamy spermií P generácie na umožnenie neskoršieho posúdenia v prípade potreby.

1.5.5. Potomstvo

Každý vrh sa vyšetrí čo najskôr po pôrode (0. deň laktácie), aby sa zistil počet a pohlavie potomstva, mŕtvo narodené a živo narodené jedince a výskyt nápadných anomálií. Mláďatá, ktoré sa našli mŕtve v deň 0, ak nie sú macerované, sa prednostne vyšetrí na možné poruchy a príčinu uhynutia a sa zakonzervujú. Živé mláďatá sa spočítajú a každé sa jednotlivo po narodení odváži (0. deň laktácie) alebo na 1. deň a potom pravidelne v deň váženía, napr. na 4., 7., 14. a 21. deň laktácie. Fyzické abnormality a poruchy správania pozorované u matiek alebo potomstva sa zaznamenávajú.

Fyzický vývoj potomstva sa zaznamená najmä na základe prírastku telesnej hmotnosti. Ostatné fyzické parametre (napr. otvorenie očí a uší, prerezanie zubov, rast srsti) môžu poskytnúť doplňujúce informácie, ale tieto údaje sa hodnotia prednostne v súvislosti s údajmi o sexuálnej zrelosti (napr. vek a telesná hmotnosť v čase otvorenia vagíny alebo oddelenia žľuza a predkožky) (13). Vyšetrenia funkčnosti (napr. motorická aktivita, zmyslové funkcie, reflexná ontogenézia) F₁ potomstva pred a/alebo po odstavení predovšetkým tie, ktoré sa týkajú sexuálnej zrelosti, sa odporúčajú, ak takéto vyšetrenia nie sú zahrnuté v samostatných štúdiách. Vek v čase vaginálneho otvorenia a oddelenia predkožky sa určí pre odstavené zvieratá generácie F₁ vybratej pre párenie. Anogenitálna vzdialenosť sa zmeria v deň 0 po narodení u mláďat generácie F₂, ak sa vyskytnú zmeny v pomere pohlaví u generácie F₁ alebo v čase pohlavnej zrelosti.

Vyšetrenia funkčnosti sa môžu vynechať v skupinách, v ktorých sa iným spôsobom prejavili jasné príznaky nepriaznivých účinkov (napr. významný pokles prírastku hmotnosti atď.). Ak sa uskutočňujú vyšetrenia funkčnosti, neuskutočnia sa na mláďatách vybratých na párenie.

1.5.6. Autopsia

V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa všetky rodičovské zvieratá (P a F₁ generácie), všetky mláďatá s externými abnormalitami alebo klinickými príznakmi, ako aj po jednom náhodne vybratom mláďati/pohlaví/vrhu z F₁ a aj F₂ generácie vyšetrí makroskopicky na všetky štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Moribundné mláďatá sa humánnym spôsobom usmrť a uhynuté mláďatá, ak nie sú macerované, sa vyšetrí na možné defekty a/alebo príčinu uhynutia a zakonzervujú.

Maternice všetkých samíc, ktoré prvý raz rodili, sa vyšetrí spôsobom, ktorý neovplyvní histopatologické vyšetrenie, na výskyt a počet implantačných miest.

1.5.7. Hmotnosť orgánov

V čase usmrtenia sa zistí telesná hmotnosť týchto orgánov všetkých rodičovských zvierat P a F₁ generácie (párové orgány sa vážia jednotlivo):

- uterus, vaječníky,
- semenníky, nadsemenníky (celé a chvostová časť),
- prostata,
- semenné vaky s koagulačnými žľazami a ich tekutiny a prostata (ako jedna jednotka),
- mozog, pečeň, obličky, slezina, hypofýza, štítna žľaza a nadobličky a známe cieľové orgány.

Zistia sa konečné telesné hmotnosti mláďat generácie F₁ a F₂ vybratých na autopsiu. U jedného náhodne vybraného mláďaťa/pohlavia/vrhu sa odvážia tieto orgány (pozri časť 1.5.6): mozog, slezina a týmus.

Výsledky autopsie a hmotnosti orgánov sa posúdia v súvislosti so zisteniami z iných štúdií pri opakovaných dávkach, ak je to možné.

1.5.8. Histopatológia**1.5.8.1. Rodičovské zvieratá**

Tieto orgány a tkanivá rodičovských zvierat (P a F₁) alebo ich reprezentatívne vzorky sa fixujú a uchovávajú vo vhodnom médiu na histopatologické vyšetrenie:

- vagína, uterus s cervixom a vaječníky (zakonzervované vo vhodnom fixačnom prostriedku),
- jeden semenník (konzervovaný v Bouinovom roztoku alebo porovnateľnom fixačnom prostriedku), jeden nadsemenník, semenné vaky, prostata a koagulačná žľaza,
- predtým identifikovaný cieľový orgán(-y) zo všetkých zvierat P a F₁ generácie vybratých na párenie.

Úplné histopatologické vyšetrenie zakonzervovaných hore uvedených orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat zo skupiny s vysokými dávkami a z kontrolnej skupiny generácie P a F₁ vybratých na párenie. Vyšetrenie vaječníkov zvierat P generácie je nepovinné. Orgány vykazujúce zmeny v súvislosti s ošetrovaním sa tiež vyšetrí v skupinách s nízkymi a strednými dávkami na pomoc pri stanovení NOAEL. Ďalej sa podrobia histopatologickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat zo skupín s nízkymi a strednými dávkami s podozrením na zníženie fertility, napr. tie, ktoré zlyhali pri párení, počatí, plodení alebo vrhnutí zdravého potomstva, alebo u ktorých bol ovplyvnený estrálny cyklus alebo počet spermií, pohyblivosť alebo morfológia. Všetky makroskopické lézie ako napr. atrofia alebo tumory sa vyšetrí.

Semenníky sa podrobne histopatologicky vyšetrí (napr. s použitím Bouinovho fixačného prostriedku, zaliatia v parafíne a transverzálnych rezov s hrúbkou 4 – 5 um) na identifikáciu účinkov, ktoré boli spôsobené v súvislosti s ošetrovaním, ako sú napr. retencia spermatidov, chýbajúce vrstvy zárodočných buniek alebo typy, mnohoadrové obrovské bunky alebo olupovanie spermatogénnych buniek do lumenu (14). Vyšetrenie

intaktných nadsemenníkov zahrnuje hlavu, telo a chvostovú časť, ktoré sa môže vykonať na základe posúdenia pozdĺžneho rezu. Nadsemenníky sa vyšetrí na infiltráciu leukocytov, zmenu prevalencie typov buniek, aberantných typov buniek a fagocytózu spermií. PAS a farbenie hematoxylínom sa môže použiť na vyšetrenie samčích reprodukčných orgánov.

Vaječník po odstavení má obsahovať primordiálne a rastúce folikuly, ako aj veľké žlté teliesko obdobia laktácie. Histopatologickým vyšetrením sa má zistiť kvalitatívny úbytok primordiálnych folikul. Kvantitatívne hodnotenie primordiálnych folikul sa uskutoční pre samice F1 generácie; počet zvierat, výber rezu vaječníkov a výber veľkosti vzoriek má byť štatisticky primeraný na posúdenie použitej metódy. Do vyšetrenia sa zahrnie stanovenie počtu primordiálnych folikul, ktoré sa môžu kombinovať s malými rastúcimi folikulami na porovnanie ošetrovaných a kontrolných vaječníkov (15) (16) (17) (18) (19).

1.5.8.2. Odstavené zvieratá

Makroskopicky abnormálne tkanivo a cieľové orgány zo všetkých mláďat s vonkajšími abnormalitami alebo klinickými príznakmi, ako aj na jednom z náhodne vybratom mláďati/pohlaví/vrhu z oboch generácií F₁ a F₂, ktoré neboli vybraté na párenie, sa zafixuje a uchová vo vhodnom médiu na histopatologické vyšetrenie. Úplná histopatologická charakterizácia zakonzervovaného tkaniva sa uskutoční s osobitným dôrazom na orgány reprodukčného systému.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa zaprotokolujú jednotlivo a zosumarizujú vo forme tabuliek a uvedie sa pre každú pokusnú skupinu a každú generáciu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo humánneho usmrtenia, počet fertilných samíc, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, popis zistených príznakov toxicity, vrátane času nástupu, trvania a závažnosti každého toxického účinku, typy vyšetrení rodičov a potomstva, typy histopatologických zmien a všetky údaje, ktoré sa týkajú vrhu.

Číselné výsledky sa vyhodnotia príslušnou všeobecne uznávanou štatistickou metódou; ako súčasť plánu štúdie by sa mali zvoliť štatistické metódy, ktoré by sa mali zdôvodniť. Na analýzu údajov môžu byť užitočné štatistické modely reakcie na podanie dávky. Správa by mala obsahovať dostatok informácií o analytickej metóde a použitom počítačovom programe, aby nezávislý kontrolór/statistik mohol prehodnotiť a zrekonštruovať analýzu.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Zistenia z tejto štúdie dvojgeneračnej reprodukčnej toxicity by sa mali vyhodnotiť na základe zistených účinkov vrátane autopsie a mikroskopických nálezov. Hodnotenie bude zahrňovať vzťah alebo jeho absenciu medzi dávkou testovanej látky a prítomnosť alebo absenciu výskytu a závažnosti abnormalít, vrátane makroskopických lézií, identifikovaných cieľových orgánov, ovplyvnenej fertility, klinických abnormalít, ovplyvnenej reprodukčnej činnosti a schopnosti vrhnúť, zmien telesnej hmotnosti, účinkov na mortalitu a iných toxických účinkov. Pri hodnotení výsledkov testu by sa mali zohľadniť fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky a, ak sú dostupné, toxikokinetické údaje.

Riadne vykonaný test reprodukčnej toxicity by mal poskytnúť uspokojivé stanovenie hladiny, ktorá nevyvoláva účinky, a umožniť pochopenie nepriaznivých účinkov na reprodukciu, pôrod, laktáciu, postnatálny vývoj vrátane rastu a sexuálneho vývoja.

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Štúdia dvojgeneračnej reprodukčnej toxicity poskytne informácie o účinkoch opakovanej expozície látkou počas všetkých fáz reprodukčného cyklu. Štúdia poskytuje informácie predovšetkým o reprodukčných parametroch a o vývoji, raste, dozrievaní a prežívaní potomstva. Výsledky štúdie by sa mali interpretovať v spojitosti so zisteniami zo subchronických štúdií, štúdií prenatalného vývoja, toxikokinetických a iných dostupných štúdií. Výsledky tejto štúdie sa môžu použiť pri posudzovaní potreby ďalšieho testovania chemikálie. Extrapolácia výsledkov štúdie na človeka platí len obmedzene. Najlepšie slúžia na poskytnutie informácií o NOAEL a prípustnej expozícii ľudí (20) (21) (22) (23).

3. PODÁVANIE SPRÁV**3.1. SPRÁVA O TESTE**

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné údaje,
- čistota.

Nosič (v prípade potreby):

- zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo, hniezdiaci materiál atď.,
- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testu:

- zdôvodnenie výberu veľkosti dávok;
- údaje o príprave zloženia testovanej látky/krmiva, dosiahnutých koncentráciách;
- stabilita a homogenita prípravku,
- údaje o podávaní testovanej látky,
- prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na dosiahnutú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,
- údaje o kvalite krmiva a vody.

Výsledky:

- spotreba potravy a spotreba vody, ak sú k dispozícii, účinnosť krmiva (prírastok telesnej hmotnosti na gram skonzumovanej potravy) a spotreba testovaného materiálu pre zvieratá generácie P a F₁, okrem obdobia párenia a aspoň posledných troch mesiacov laktácie,
- údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii),
- údaje o telesnej hmotnosti zvierat P a F₁ generácie vybratých na párenie,
- údaje o hmotnosti vrhu a mláďat,

- telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o absolútnych a relatívnych hmotnostiach orgánov rodičov,
- povaha, závažnosť a trvanie klinických vyšetrení (s údajmi o reverzibilitate),
- čas uhynutia počas štúdie, alebo či zvieratá prežili do usmrtenia,
- údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a dávky, vrátane indexov pre párenie, fertilitu, graviditu, pôrod, životaschopnosť a laktáciu; v správe je potrebné uviesť čísla použité na výpočet týchto indexov,
- toxické alebo iné účinky na reprodukciu, potomstvo, postnatálny rast atď.,
- nálezy z autopsie,
- podrobný popis všetkých histopatologických nálezov,
- počet samíc generácie P a F₁ s normálnym cyklom a trvanie cyklu,
- celkový počet spermií z chvostovej časti nadsemenníkov, percento progresívne sa pohybujúcich spermií, percento morfológicky normálnych spermií a percento spermií s každou identifikovanou abnormalitou,
- čas do inseminácie, vrátane počtu dní do inseminácie,
- dĺžka gravidity,
- počet implantátov, žlté telieska (corpora lutea), veľkosť vrhu,
- počet živo narodených zvierat a straty po implantácii,
- počet mláďat s makroskopicky viditeľnými abnormalitami, ak je zistený počet nevyvinutých jedincov je potrebné uviesť,
- údaje o fyzických medzníkoch vo vývoji mláďat a iné postnatálne údaje o vývoji; hodnotené fyzické medzníky sa zdôvodnia,
- údaje o vyšetreniach funkčnosti u mláďat a dospelých, ak je možné,
- štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Diskusia k výsledkom.

Záver, vrátane hodnôt NOAEL pre matku a potomstvo.

4. ODKAZY

- (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 Spermatotoxicity 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: 298–303.
- (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.
- (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.

B.36. TOXIKOKINETIKA

1. METODA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná vhodným spôsobom. V závislosti na účele pozorovania môže byť látka podávaná počas určeného intervalu v jednej alebo v opakovaných dávkach jednej alebo niekoľkým skupinám pokusných zvierat. Neskôr v závislosti od typu testu sa látka a/alebo jej metabolity stanovuje v telových tekutinách, tkanivách a/alebo vo výlučkoch.

Pozorovanie môže prebiehať s neoznačenou alebo označenou formou testovanej látky. Ak sa použije značenie, malo by byť v takej pozícii na testovanej látke, aby poskytlo čo najviac informácií o osude zlúčeniny.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Zdravé mladé dospelé zvieratá sú aklimatizované v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne rozdelené do skupín na ovplyvnenie a kontrolných skupín a označené. Za výnimočných okolností môžu byť použité veľmi mladé, gravidné alebo vopred vystavené zvieratá.

Podmienky testu*Pokusné zvieratá*

Toxikokinetické testy sa môžu vykonávať na jednom alebo viacerých vhodných druhoch zvierat a mali by brať do úvahy, či sa tieto druhy použijú, alebo zamýšľajú použiť aj v iných toxikologických testoch s tou istou testovanou látkou. Ak sú v teste použité hlodavce, odchýľka ich hmotnosti by nemala presahovať $\pm 20\%$ priemernej hmotnosti.

Počet a pohlavie

Pre testy absorpcie a exkrécie by sa mali použiť štyri zvieratá v každej skupine s rôznou dávkou. Nie je nevyhnutné preferovať niektoré pohlavie, ale za určitých okolností sa môžu otestovať obe pohlavia. Ak je reakcia pohlaví odlišná, potom by sa mali testovať štyri zvieratá z každého pohlavia. V prípade použitia nehlodavcov je možné použiť menší počet zvierat. Ak sa testuje distribúcia látky v tkanivách, veľkosť počiatočnej skupiny by mala brať do úvahy počet zvierat, ktoré sa utratia v každom plánovanom časovom intervale a počet plánovaných testovaných intervalov.

Ak je testovaný metabolizmus, veľkosť skupiny závisí na potrebách testu. Pre testy s väčším počtom dávok a viacerými plánovanými časovými intervalmi by sa pri stanovení veľkosti skupiny mal brať do úvahy počet plánovaných intervalov a počet plánovaných utratení. Pri každom vyšetrení by počet zvierat nemal byť nikdy menší ako dve. Veľkosť skupiny by mala byť dostatočná pre poskytnutie prijateľnej informácie o absorpcii, hornej hranici (plateau) a vyčerpaní (ak je potrebné) testovanej látky a/alebo jej metabolitov.

Testované dávky

V prípade jednorazového podania by mali byť použité aspoň dve rôzne dávky. Nižšia dávka, pri ktorej by nemal byť pozorovaný žiadny toxický účinok a vyššia dávka, pri ktorej by mohli nastať zmeny v toxikokinetických parametroch, alebo pri ktorých sa objaví toxický účinok.

V prípade viacnásobného podávania je bežne postačujúca nižšia dávka, ale za určitých okolností je potrebná aj vyššia dávka.

Spôsob podávania

Pri toxikokinetických testoch by sa mal používať rovnaký spôsob podávania a ak je plánovaný nosič, mal by byť použitý aj v ostatných testoch toxicity. Testovaná látka sa v ovplyvňovanej skupine zvierat bežne podáva orálnou sondou alebo v potrave, aplikovaná na kožu alebo inhaláciou počas stanoveného času. Vnútrožilové (intravenózne) podávanie testovanej látky by sa mohlo použiť pri stanovení relatívnej absorpcie v porovnaní s ostatnými spôsobmi podávania. Navyše môže poskytnúť užitočné informácie pre model distribúcie danej látky skoro po jej aplikácii.

Mala by sa brať do úvahy možnosť interferencie nosiča s testovanou látkou. Pozornosť by sa mala venovať rozdielom v absorpcii látky medzi rôznymi spôsobmi podávania ako je sonda a potrava, preto je nevyhnutné presne stanoviť dávku, obzvlášť ak je testovaná látka podávaná v potrave.

Doba pozorovania

Všetky zvieratá by sa mali byť denne sledovať a zaznamenávať príznaky toxicity a ostatné dôležité klinické príznaky, vrátane času nástupu, stupňa a trvania.

Postup

Po odvážení testovaných zvierat sa testovaná látka podáva vhodným spôsobom. Ak je to dôležité, zvieratá môžu dostávať testovanú látku nalačno.

Absorpcia

Rýchlosť a rozsah absorpcie testovanej látky môže byť hodnotený rôznymi metódami bez použitia alebo s použitím referenčnej skupiny ⁽¹⁾, napríklad:

- stanovenie množstva testovanej látky a/alebo jej metabolitov vo výlučkoch ako je moč, žlč, výkaly, vydychovaný vzduch a zvyšky v tele zvieratá po smrti,
- porovnanie biologickej odpovede (napr. akútne toxikologické testy) medzi testovanými, kontrolnými a/alebo referenčnými skupinami,
- porovnanie množstva testovanej látky a/alebo jej metabolitov vylúčených obličkami v testovaných a referenčných skupinách,
- stanovenie plochy pod krivkou závislosti hladiny plazmy od času pre testovanú látku a/alebo jej metabolity a porovnania údajov s referenčnou skupinou.

Distribúcia

Pre analýzu modelov distribúcie sú v súčasnosti možné dva prístupy, môže byť použitý jeden z nich alebo obidva:

- dôležité kvalitatívne informácie sa získajú autorádiografickými technikami celého tela,
- kvantitatívne informácie sa získajú po utratení zvierat v rôznych časových intervaloch po ovplyvnení a stanovení koncentrácie a množstva testovanej látky a/alebo jej metabolitov v tkanivách a orgánoch.

⁽¹⁾ V tejto metóde je referenčná skupina tá, v ktorej je testovaná látka podávaná iným spôsobom pre úplné začlenenie danej dávky do biologického systému.

Vylučovanie

V testoch vylučovania sa zbiera moč, výkaly, vydychovaný vzduch a za určitých okolností aj žlč. V týchto výlučkoch je niekoľkokrát po ovplyvnení merané množstvo testovanej látky a/alebo jej metabolitov, pokiaľ nie je vylúčené okolo 95 % podanej dávky (najdlhšie sedem dní).

V špeciálnych prípadoch pri testovaní zvierat v laktácii je potrebné brať do úvahy vylučovanie testovanej látky do mlieka.

Metabolizmus

Pre stanovenie rozsahu a modelu metabolizmu by sa mali biologické vzorky analyzovať vhodnými metódami. Ak sú nejasnosti z predchádzajúcich toxikologických testov, mala by sa objasniť štruktúra metabolitov a navrhnúť vhodná metabolická dráha. Pre získanie informácií o metabolickej dráhe môže byť užitočné testovanie *in vitro*.

Ďalšie informácie o vzťahoch metabolizmu a toxicity môžu byť získané z biochemických testov, ako je stanovenie účinkov na metabolizujúce enzymatické systémy, vyčerpanie endogénnych neproteínových sulfhydrylových zlúčenín a väzba testovanej látky na makromolekuly.

2. ÚDAJE

Vzhľadom k typu prevedeného testu by mali byť údaje zhrnuté v tabuľke doplnené grafmi, keď je to vhodné. Pre každú testovanú skupinu, ak je to vhodné, by mala byť určená priemerná hodnota a smerodajná odchýlka v závislosti od času, dávky, tkaniva a orgánu. Ak sa robili metabolické testy, mala by byť určená štruktúra identifikovaných metabolitov a stanovené pravdepodobné metabolické dráhy.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Vzhľadom k typu prevedeného testu, správa z testu obsahuje podľa možnosti tieto informácie:

- druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživa,
- ak je použitá označená látka – jej vlastnosti,
- veľkosti dávok a použité časové intervaly,
- spôsoby podávania a každý použitý nosič,
- zistené toxické a iné príznaky,
- metódy stanovenia testovanej látky a/alebo jej metabolitov v biologických vzorkách, vrátane vydychovaného vzduchu,
- tabuľky meraní podľa pohlavia, dávky, životosprávy, času, tkanív a orgánov,
- stanovenie rozsahu absorpcie a vylučovania (exkrécie) v závislosti od času,
- metódy na charakterizovanie a identifikáciu metabolitov v biologických vzorkách,
- metódy biochemických meraní vo vzťahu k metabolizmu,
- navrhnuté metabolické dráhy,

- diskusiu o výsledkoch,
- interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B.

B.37. **ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTOK PO AKÚTNEJ EXPOZÍCII ICH ÚČINKOM**

1. **METÓDA**

1.1. **ÚVOD**

Pri stanovení a vyhodnotení toxických účinkov látok je dôležité zvážiť potenciál určitých skupín látok spôsobujúcich špecifické druhy neurotoxicity, ktoré nemusia byť zistené (objavené) v iných štúdiách toxicity. U určitých organofosforových zlúčenín sa zistilo, že spôsobujú oneskorenú neurotoxicitu a je nutné ich z tohto hľadiska hodnotiť.

Látky, ktoré môžu spôsobovať oneskorenú polyneuropatiu sa identifikujú pri použití screeningových testov *in vitro*; pravdaže, negatívne výsledky z *in vitro* štúdií neposkytujú dôkaz, že testovaná látka nie je neurotoxická.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

1.2. **DEFINÍCIE**

Organofosforové zlúčeniny zahŕňajú nenabitú organofosforové estery, tioestery alebo anhydridy organofosforečných, organofosfónových alebo organofosforamidových kyselín, alebo príbuzných tiolfosforových, tiófosforových, tiolfosfónových, tiófosfónových alebo fosfortioamínových kyselín, alebo iné látky spôsobujúce oneskorenú neurotoxicitu občas pozorovanú v tejto kategórii látok.

Oneskorená neurotoxicita je syndróm spájaný s predĺženým oneskorením nábehu ataxie, distálnej axonopatie v mieche a periférnom nervstve, a inhibíciou a starnutím neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) v nervových tkanivách.

1.3. **REFERENČNÉ LÁTKY**

Referenčná látka sa môže testovať s pozitívnu kontrolnou skupinou ako prostriedok dôkazu, že za daných laboratórnych testovacích podmienok sa odozva testovaných druhov zvierat významne nemení.

Ako príklad široko používaného neurotoxikantu slúži tri-o-tolylfosfát (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS názov: fosforečná kyselina, tris(2-metylphenyl)ester, známy tiež ako tris-o-krezylfosfát.

1.4. **PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY**

Skupine sliepok domácich, ktoré sú (ak je to vhodné) chránené od akútneho cholinergného účinku, sa orálne podáva jedna dávka testovanej látky. Zvieratá sa pozorujú 21 dní, pričom sa sledujú abnormality v správaní, ataxia, a paralýza. Biochemické merania a najmä inhibícia neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) sa vykonávajú na náhodne vybraných sľepkách každej skupiny, bežne 24 a 48 hodín po podaní látky. 21 dní po expozícii sa zvyšok sliepok usmrť a uskutoční sa histopatologické vyšetrenie vybraných nervových tkanív.

1.5. **POPIS TESTOVACEJ METÓDY**

1.5.1. **Príprava**

Náhodne sa vyberú mladé zdravé dospelé sliepky, ktoré netrpia vírusovou chorobou a nie sú podrobené lekárskej terapii, ktoré by rušili pozorovania, a zaradia sa do testovanej a kontrolnej skupiny. Najmenej 5 dní pred začiatkom testovania sa aklimatizujú na laboratórne podmienky.

Použijú sa dostatočne veľké kletky alebo ohrady, aby umožňovali voľný pohyb sliepok a jednoduché pozorovanie chôdze.

Orálne dávkovanie testovanej látky sa bežne uskutočňuje pomocou žalúdočnej sondy, želatínových kapsúl alebo porovnateľným spôsobom. Kvapaliny sa dávajú neriedené alebo rozpustené vo vhodnom nosiči (napríklad kukuričný olej); Pevné látky sa rozpustia, ak je to možné vzhľadom na veľkosť dávky, v želatínových kapsulách, čím nemusí byť zabezpečená účinná absorpcia. Toxické vlastnosti nevodných nosičov by mali byť známe a ak nie sú, musia byť pred testovaním stanovené.

1.5.2. Podmienky testovania

1.5.2.1. Testované zvieratá

Doporučujú sa mladé dospelé domáce sliepky (*Gallus gallus domesticus*) vo veku 8 až 12 mesiacov. Používa sa štandardná veľkosť chovov a pokolení a sliepky musia byť chované za podmienok umožňujúcich im voľný pohyb.

1.5.2.2. Počet a pohlavie

Okrem testovanej skupiny sa používa aj kontrolná skupina s nosičom aj pozitívna kontrolná skupina. Kontrolná skupina s nosičom je testovaná rovnako ako testovaná skupina s tým rozdielom, že sa im nepodáva testovaná látka.

Vhodný počet vtákov v každej skupine sa určí tak, že najmenej šesť jedincov môže byť usmrtených na biochemické stanovenia (tri v oboch časových bodoch) a šesť musí prežiť 21 dní pozorovacieho obdobia na patologické vyšetrenie.

Pozitívna kontrolná skupina sa sleduje súčasne alebo v nedávnej minulosti. Má obsahovať minimálne šesť sliepok, ktoré sú testované známym oneskorovacím neurotoxikantom. Tri sliepky sa použijú na biochemické stanovenia a tri na patologické vyšetrenie. Doporučuje sa periodické obnovovanie údajov z minulosti. Nové pozitívne kontrolné údaje sa získavajú vtedy, ak sa v testovacom laboratóriu zmení niektorá podstatná riadiaca zložka testu (pokolenie, potrava, podmienky ubytovania).

1.5.2.3. Úroveň dávok

Stanovenie úrovne dávky neskôr použitej v hlavnej štúdii sa uskutočňuje v predbežnej štúdii, pri ktorej sa používa vhodný počet sliepok a hladín. Väčšinou je v predbežnej štúdii nevyhnutné úmrtie, aby sa zistila postačujúca dávka pre hlavnú štúdiu. Zabrániť úmrtiu spôsobenému akútnym cholinergickým účinkom sa môže využitím atropínu alebo iných ochranných činidiel, o ktorých je známe, že rušivo neovplyvujú na oneskorené neurotoxické reakcie. Na odhad maximálnej neletálnej dávky testovanej látky je k dispozícii množstvo testovacích metód (pozri metódu B.1 bis). Pri výbere dávky pomáhajú tiež údaje získané testovaním sliepok z minulosti a iné toxikologické informácie.

Dávka testovanej látky v hlavnej štúdii má byť tak vysoká ako je len možné, s ohľadom na výsledky výberu dávky predbežnej štúdie a najvyššiu limitnú dávku 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Možné úmrtie by nemalo rušivo vplyvať s postačujúcim počtom prežitých zvierat na biochemické vyšetrenie (šesť) a histológiu (šesť) po 21 dňoch. Atropín alebo iné ochranné činidlá, o ktorých je známe, že rušivo neovplyvujú na oneskorené neurotoxické reakcie, by mal byť použitý, aby sa predišlo úmrtiu testovaných zvierat v dôsledku akútneho cholinergického účinku.

1.5.2.4. Limitný test

Ak sa test na úrovni dávky 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň uskutočňuje použitím postupov popísaných v tejto štúdii a neboli pozorované žiadne toxické účinky, a ak sa neočakáva toxicita ani na základe údajov štruktúrne príbuzných zlúčenín, potom štúdia pri vyššej hladine nie je nevyhnutná. Výnimkou je prípad, keď expozícia človeka indikuje potrebnosť skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

1.5.2.5. Doba pozorovania

Doba pozorovania je 21 dní.

1.5.3. Postup

Po použití ochranného činidla na zabránenie úmrtia v dôsledku akútneho cholinergického účinku sa podáva testovaná látka v jednej dávke.

1.5.3.1. Celkové pozorovania

Pozorovania začínajú ihneď po expozícii. Všetky sliepky sa starostlivo pozorujú niekoľkokrát počas prvých dvoch dní a potom najmenej raz denne počas 21 dní alebo do plánovaného usmrtenia. Všetky toxické príznaky sa zaznamenávajú, vrátane času nábehu, druhu, prudkosti a dĺžky trvania abnormalít správania. Ataxia sa meria v rádovej odstupňovanej mierke na najmenej štyroch úrovniach a sleduje sa paralýza. Najmenej dvakrát za týždeň sú sliepky určené na patologické vyšetrenie vybrané z klieťok a podrobené cyklu vynútenej motorickej aktivity, ako je vyliezanie po rebríku, s cieľom umožniť pozorovanie minimálnych toxických účinkov. Umierajúce zvieratá a zvieratá viditeľne trpiace alebo viditeľne pociťujúce bolesť sa odstraňujú, humánne usmrtia a prevedie sa ich pitva.

1.5.3.2. Telesná hmotnosť

Všetky sliepky sa vážia krátko pred podaním testovanej látky a najmenej každý týždeň potom.

1.5.3.3. Biochémia

Šesť sliepok náhodne vybraných z každej testovanej a kontrolnej skupiny s nosičom, a tri sliepky z pozitívnej kontrolnej skupiny (ak je táto skupina testovaná súčasne) sa usmrtia do niekoľkých dní po expozícii. Mozog a miecha sa pripravujú a analyzujú na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy. Naviac môžu byť použité na prípravu a analýzu neuropatie inhibície aktivity cieľovej esterázy sedacieho ischiatického nervového tkaniva. Normálne sa po 24 hodinách usmrtia tri sliepky kontrolnej a každej testovanej skupiny a tri po 48 hodinách, zatiaľ čo po 24 hodinách sa usmrtia tri sliepky pozitívnej kontrolnej skupiny. Ak pozorovania klinických príznakov intoxikácie (tie bývajú často zistené pozorovaním času nábehu cholinergických príznakov) naznačujú, že zvieratá sa toxického činidla zbavujú veľmi pomaly, potom sa uprednostňuje odoberanie vzoriek tkanív z troch vtákov po 24 a až 72 hodinách po podaní.

Pokiaľ sa usúdi, že to je potrebné, tieto vzorky sa používajú aj na analýzu acetylcholinesterázy (AChE). Spontánna reaktivácia AChE však môže nastať aj *in vivo*, čo vedie k podhodnoteniu potenciálu látky ako inhibítora AChE.

1.5.3.4. Makroskopická pitva

Pitva všetkých zvierat (plánovane usmrtených aj usmrtených z dôvodu umierania) zahŕňa pozorovanie vzhľadu mozgu a miechy.

1.5.3.5. Histopatologické vyšetrenie

Nervové tkanivo zo zvierat, ktoré prežili pozorovaciu periódu a neboli použité na biochemické štúdie, sa podrobí mikroskopickému vyšetreniu. Tkanivá musia byť fixované použitím premývacích metód *in situ*. Časti zahŕňajú mozoček (stredne pozdĺžna úroveň), predĺženú miechu, miechu, a periférne nervy. Časti miechy sa zoberú z horného krčného úseku, strednej hrudníkovej a bedrovokrížovej oblasti. Berú sa aj časti distálnej oblasti holenných nervov a ich vetvy vedúce k dvojhlavému lýtkovému svalu a sedacie nervy. Sekcie sa zafarbujú vhodným myelínom a axonovo určitými farbivami.

2. ÚDAJE

Negatívne výsledky vybraných parametrov tejto metódy (biochémia, histopatológia a pozorovanie správania) normálne nevyžadujú ďalšie testovanie na oneskorenú neurotoxicitu. Nejednoznačné alebo nepresvedčivé výsledky týchto parametrov si môžu vyžadovať ďalšie vyhodnotenie.

Musia sa zabezpečiť individuálne údaje. Naviac musia byť všetky údaje zhrnuté v tabuľkovej forme pre každú testovanú skupinu s počtom použitých zvierat na začiatku testu, počtom zvierat, u ktorých sa prejavili známky poškodenia, účinkov na správanie alebo biochemických účinkov, typy a prudkosť týchto poškodení alebo účinkov, percentuálne množstvo zvierat prejavujúcich jednotlivý typ a prudkosť poškodenia alebo účinku.

Nálezy pochádzajúce z tejto štúdie sa vyhodnotia z hľadiska rozsahu, intenzity a korelácie so správaním, biochemických a histopatologických účinkov, a ďalších pozorovaných účinkov u testovanej a kontrolnej skupiny.

Ak je to možné, numerické výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistická metóda sa vyberá počas plánovania štúdie.

3. **SPRÁVA**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

3.1. Testované zvieratá:

- použitý kmeň,
- počet a vek zvierat,
- zdroj, podmienky bývania, atď.,
- individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

3.2. Testovacie podmienky:

- podrobnosti o príprave testovanej látky, jej stabilite a homogenite, pokiaľ je to možné,
- zdôvodnenie výberu nosiča,
- podrobnosti o podávaní testovanej látky,
- podrobnosti o kvalite krmiva a pitnej vody,
- zdôvodnenie voľby výberu dávky,
- spresnenie podávaných dávok, vrátane podrobností o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávanej látky,
- totožnosť a podrobnosti o podávanom ochrannom činidle.

3.3. Výsledky:

- údaje o telesných hmotnostiach,
- toxické reakcie podľa úrovne dávky, vrátane úmrtnosti,
- povaha, intenzita a dĺžka trvania klinických pozorovaní (či boli reverzibilné alebo nie),
- podrobný opis biochemických metód a zistení,
- pitevné nálezy,
- podrobný popis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, ak je vhodné.

Diskusia.

Záver.

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 418.

B.38. **ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTOK PRI 28-DŇOVEJ ŠTÚDII
OPAKOVANEJ DÁVKY**

1. **METODA**

1.1. **ÚVOD**

Pri stanovení a vyhodnotení toxických účinkov látok je dôležité zväžiť potenciál určitých kategórií látok spôsobujúcich určité druhy neurotoxicity, ktoré nemusia byť zistené v iných štúdiách toxicity. U určitých organofosforových látok sa zistilo, že spôsobujú oneskorenú neurotoxicitu a je nutné ich z tohto hľadiska hodnotiť.

Látky, ktoré môžu spôsobovať oneskorenú polyneuropatiu sa identifikujú pri použití screeningových testov *in vitro*; pravdaže, negatívne výsledky z *in vitro* štúdií neposkytujú dôkaz, že testovaná látka nie je neurotoxická.

28-dňový test oneskorenej neurotoxicity poskytuje informácie o možných zdravotných rizikách, pravdepodobne sa zvyšujúcich po opakovanej expozícii cez obmedzené časové obdobie. Test poskytuje informácie o odozve na dávku a môže tiež umožňovať odhad hodnoty nepozorovaných žiadnych nepriaznivých účinkov, na základe ktorej je možné stanoviť kritérium bezpečnosti expozície.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

1.2. **DEFINÍCIE**

Organofosforové látky zahŕňajú nenabité organofosforové estery, tioestery alebo anhydridy organofosforečných, organofosfónových alebo organofosforamidových kyselín, alebo príbuzných tiolfosforových, tiófosforových, tiolfosfónových, tiófosfónových alebo fosforotioamidových kyselín, alebo iné látky spôsobujúce oneskorenú neurotoxicitu občas pozorovanú v tejto kategórii látok.

Oneskorená neurotoxicita je syndróm spájaný s predĺženým oneskorením nábehu ataxie, distálnej axonopatie v mieche a periférnom nervstve, a inhibíciou a starnutím neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) v nervových tkanivách.

1.3. **PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY**

Denné dávky testovanej látky sa orálne podávajú sliepкам domácim počas 28 dní. Zvieratá sa pozorujú prinajmenšom denne a sledujú sa abnormality správania, ataxia a paralýza až do 14 dní po poslednej dávke: Biochemické merania a najmä inhibícia neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) sa vykonávajú na náhodne vybraných sliepkach každej skupiny, bežne 24 a 48 hodín po podaní látky. Dva týždne po poslednej dávke sa zvyšok sliepok usmrtí a uskutoční sa histopatologické vyšetrenie vybraných nervových tkanív.

1.4. **POPIS TESTOVACEJ METÓDY**

1.4.1. **Príprava**

Náhodne sa vyberú mladé zdravé dospelé sliepky, ktoré netrpia vírovou chorobou a nie sú podrobené lekárskej terapii, a bez abnormalít chôdze, čo by rušilo pozorovania, a zaradia sa do testovanej a kontrolnej skupiny. Najmenej 5 dní pred začiatkom testovania sa aklimatizujú na laboratórne podmienky.

Použijú sa dostatočne veľké kletky alebo výbehy, aby umožňovali voľný pohyb sliepok a jednoduché pozorovanie chôdze.

Orálne sa dávkuje každý deň, 7 dní do týždňa a uprednostňuje sa podávanie pomocou žalúdočnej sondy alebo želatínových kapsúl. Tekutiny sa dávkujú neriedené alebo rozpustené vo vhodnom nosiči (napríklad kukuričný olej). Pevné látky sa rozpustia, ak je to možné vzhľadom na veľkosť dávky, v želatínových tobolkách, čím nemusí byť zabezpečená účinná absorpcia. Toxické vlastnosti nevodných nosičov by mali byť známe a ak nie sú, musia byť pred testovaním stanovené.

1.4.2. Podmienky testovania**1.4.2.1. Testované zvieratá**

Oporúčajú sa mladé dospelé domáce sliepky (*Gallus gallus domesticus*) vo veku 8 až 12 mesiacov. Používa sa štandardná veľkosť chovov a pokolení a sliepky musia byť chované za podmienok umožňujúcich im voľný pohyb.

1.4.2.2. Počet a pohlavie

Všeobecne sa používajú najmenej tri testované skupiny a kontrolná skupina s nosičom. Kontrolná skupina s nosičom je testovaná rovnako ako testovaná skupina s tým rozdielom, že sa im nepodáva testovaná látka.

Vhodný počet sliepok v každej skupine sa určí tak, že najmenej šesť jedincov môže byť usmrtených na biochemické stanovenia (tri v obidvoch časových bodoch) a šesť musí prežiť 14 dní pozorovacieho obdobia na patologické vyšetrenie.

1.4.2.3. Hladiny dávok

Dávky sa vyberajú so zreteľom na tri výsledky získané pri akútnom teste oneskorenej neurotoxicity a ďalších prístupných údajov o toxicite alebo kinetike testovanej látky. Najvyššia dávka sa vyberá s cieľom indukovania toxických účinkov, pričom sa uprednostňuje oneskorená neurotoxicita, ale bez toho, aby spôsobovala uhynutie alebo očividné trápenie zvierat. Podľa toho sa vyberá zostupujúca postupnosť dávok so zámerom dokázať závislosť odozvy od dávky a pri najnižšej dávke dokázať aj hladinu, pri ktorej nebol pozorovaný žiadny nepriaznivý účinok.

1.4.2.4. Limitný test

Ak sa test na úrovni dávky 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň uskutočňuje použitím postupov popísaných v tejto štúdii a neboli pozorované žiadne toxické účinky, a ak sa neočakáva toxicita ani na základe údajov štruktúrne príbuzných zlúčenín, potom štúdia pri vyššej hladine nie je nevyhnutná. Výnimkou je prípad, ak expozícia človeka indikuje potrebnosť skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

1.4.2.5. Doba pozorovania

Všetky zvieratá sa pozorujú prinajmenšom denne počas expozičného obdobia a 14 dní potom, s výnimkou plánovanej pitvy.

1.4.3. Postup

Zvieratám sa podáva testovaná látka sedem dní v týždni počas obdobia 28 dní.

1.4.3.1. Celkové pozorovania

Pozorovania začínajú ihneď po začatí expozície. Všetky sliepky sa starostlivo pozorujú prinajmenšom raz denne počas 28 dní a potom 14 dní alebo až do plánovaného usmrtenia. Všetky toxické príznaky sa zaznamenávajú, vrátane času nábehu, druhu, intenzity a dĺžky trvania príznakov. Do pozorovaní sa zahŕňa sledovanie abnormalít správania, ale aj ďalšie príznaky. Ataxia sa meria v rádovej odstupňovanej mierke na najmenej štyroch úrovniach a sleduje sa paralýza. Najmenej dvakrát za týždeň sú sliepky, určené na patologické vyšetrenie, vybrané z kletok a podrobené cyklu vynútenej motorickej aktivity, ako je vyliezanie po rebríku, s cieľom umožniť pozorovanie minimálnych toxických účinkov. Umierajúce zvieratá a zvieratá viditeľne trpiace alebo viditeľne pociťujúce bolesť sa odstraňujú, humánne usmrťujú a prevedie sa ich pitva.

1.4.3.2. Telesná hmotnosť

Všetky sliepky sa zvažujú krátko pred prvým podaním testovanej látky a najmenej každý týždeň potom.

1.4.3.3. Biochémia

Šesť sliepok náhodne vybraných z každej testovanej a kontrolnej skupiny s nosičom sa usmrťujú do niekoľkých dní po poslednej dávke. Mozog a bedrová miecha sa pripravujú a analyzujú na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy (NTE). Navyše môžu byť použité na prípravu a analýzu neuropatie inhibície aktivity cieľovej esterázy sedacieho ischiatického nervového tkaniva na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy (NTE).

Normálne sa po 24 hodinách usmrtia tri sliepky kontrolnej a každej testovanej skupiny a tri po 48 hodinách po poslednej dávke. Ak údaje získané pri akútnej štúdií alebo pri iných štúdiách (napríklad toxikokinetiky) naznačujú, že je výhodnejší iný čas usmrtenia zvierat po podaní poslednej dávky, potom sa použije tento čas a zdôvodní sa.

Pokiaľ sa usúdi, že to je potrebné, tieto vzorky sa používajú aj na analýzu acetylcholinesterázy (AChE). Spontánna reaktivácia AChE však môže nastať aj *in vivo*, čo vedie k podhodnoteniu potenciálu látky ako inhibítora AChE.

1.4.3.4. *Makroskopická pitva*

Pitva všetkých zvierat (plánovane usmrtených aj usmrtených z dôvodu umierania) zahŕňa pozorovanie vzhľadu mozgu a miechy.

1.4.3.5. *Histopatologické vyšetrenie*

Nervové tkanivo zo zvierat, ktoré prežili pozorovaciu periódu a neboli použité na biochemické štúdie, sa podrobí mikroskopickému vyšetreniu. Tkanivá musia byť fixované použitím premývacích metód *in situ*. Časti zahŕňajú mozog (stredne pozdĺžna úroveň), predĺženú miechu, miechu, a periférne nervy. Časti miechy sa odoberú z horného krčného úseku, strednej hrudníkovej a bedrovokrížovej oblasti. Odoberú sa aj časti distálnej oblasti holenných nervov a ich vetvy do dvojhlavých lýtkových svalov a sedacie ischiatické nervy. Sekcie sa zafarbia vhodným myelínom a axónovo určitými farbivami. Zo začiatku sa mikroskopické vyšetrenie uskutočňuje s konzervovanými tkanivami všetkých zvierat kontrolnej skupiny a skupiny testovanej pri vysokej dávke. Ak je mikroskopické vyšetrenie na prítomnosť účinkov pozitívne, uskutoční sa aj u sliepok zo skupín testovaných so strednou a nízkou dávkou.

2. **ÚDAJE**

Negatívne výsledky vybraných parametrov tejto metódy (biochémia, histopatológia a pozorovanie správania) normálne nevyžadujú ďalšie testovanie na oneskorenú neurotoxicitu. Nejednoznačné alebo nepresvedčivé výsledky týchto parametrov si môžu vyžadovať ďalšie vyhodnotenie.

Musia sa zabezpečiť individuálne údaje. Naviac musia byť všetky údaje zhrnuté v tabuľkovej forme pre každú testovanú skupinu s počtom použitých zvierat na začiatku testu, počtom zvierat, u ktorých sa prejavili známky poškodenia, účinkov na správanie alebo biochemických účinkov, typy a intenzitu týchto poškodení, alebo účinkov, a percentuálne množstvo zvierat vykazujúce jednotlivý typ a prudkosť poškodenia alebo účinku.

Nálezy pochádzajúce z tejto štúdie sa vyhodnotia z hľadiska rozsahu, intenzity a korelácie so správaním, biochemických a histopatologických účinkov, a ďalších pozorovaných účinkov u každej testovanej a kontrolnej skupiny.

Ak je to možné, číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistická metóda sa vyberá počas plánovania štúdie.

3. **SPRÁVA**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

3.1. Testované zvieratá:

- použitý kmeň,
- počet a vek zvierat,
- zdroj, podmienky bývania, atď.,
- individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

3.2. Testovacie podmienky:

- podrobnosti o príprave testovanej látky, jej stabilite a homogenite, pokiaľ je to možné,
- zdôvodnenie výberu nosiča,
- podrobnosti o podávaní testovanej látky,
- podrobnosti o kvalite krmiva a pitnej vody,
- zdôvodnenie voľby výberu dávky,
- spresnenie podávaných dávok, vrátane podrobností o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávanej látky,
- zdôvodnenie voľby pre výber iných časov biochemického stanovenia ako je 24 a 48 hodín.

3.3. Výsledky:

- údaje o telesných hmotnostiach,
- toxické reakcie podľa úrovne dávky, vrátane úmrtnosti,
- hodnota nepozorovaných žiadnych nepriaznivých účinkov,
- povaha, intenzita a dĺžka trvania klinických pozorovaní (či boli reverzibilné alebo nie),
- podrobný opis biochemických metód a zistení,
- pitevné nálezy,
- podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
- štatistické spracovanie výsledkov, ak je vhodné.

Diskusia.

Záver.

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 419.

B.39. **TEST NEPLÁNOVANEJ SYNTÉZY DNA (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS – UDS) S PEČEŇOVÝMI BUNKAMI CICAVCOV *IN VIVO***

1. **METODA**

Táto metóda je obdobou OECD TG 486, testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis – UDS) s pečeneňovými bunkami cicavcov *in vivo* (1997).

1.1. **ÚVOD**

Účelom testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis – UDS) s pečeneňovými bunkami cicavcov *in vivo* je identifikovať testovacie látky, ktoré indukujú opravu DNA v pečeneňových bunkách pokusných zvierat (1) (2) (3) (4).

Tento *in vivo* test poskytuje metódu na skúmanie genotoxických účinkov chemikálií v pečeni. Meraným parametrom je dôkaz poškodenia DNA a následná oprava v pečeneňových bunkách. Pečeň je zvyčajne hlavným miestom metabolizmu absorbovaných zmesí. Poškodenia DNA je preto vhodné merať *in vivo*.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Koncový bod neplánovanej syntézy DNA (UDS) sa meria stanovením absorpcie označených nukleozidov v bunkách, ktoré neprechádzajú plánovanou (S-fáza) syntézou DNA. Najpoužívanjšou technikou je stanovenie absorpcie trítium označeného tymidínu (^3H -TdR) autorádiografiou. Pre *in vivo* testy UDS sa používajú najmä krysie pečene. Použiť sa môžu aj iné ako pečeneňové tkanivá, tie ale nie sú predmetom tejto metódy.

Zistenie UDS závisí od počtu báz DNA odstránených a nahradených na mieste poškodenia. Test UDS je preto osobitne hodnotný na zistenie „dlhej opravy“ (20–30 báz) indukovanej látkou. „Krátka oprava“ (jedna až tri bázy) sa naopak zisťuje s omnoho menšou citlivosťou. Z dôvodu neopravenia, nesprávnej opravy alebo nesprávnej replikácie lézií DNA môžu vzniknúť mutagénne udalosti. Rozsah reakcie UDS neposkytuje žiadny náznak kvality opravného procesu. Je ďalej možné, že mutagén reaguje s DNA, ale poškodenie DNA nie je opravené odstraňovacím opravným procesom. Nedostatok špecifických informácií o mutagénnej aktivite poskytnutý testom UDS je kompenzovaný potenciálnou citlivosťou tohto parametra, pretože sa meria na celom genóme.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. **DEFINÍCIE**

Opravované bunky: čisté jadrové vlákno (net nuclear grain – NNG) vyššie ako stanovená hodnota, adjustuje sa v laboratóriu vykonávajúcom test.

Čisté jadrové vlákno (net nuclear grain – NNG): kvantitatívny ukazovateľ aktivity UDS buniek pri autorádiografických testoch UDS vypočítaný odpočítaním priemerného počtu cytoplazmatických vlákien v cytoplazmatických oblastiach ekvivalentných jadrú (CG) od počtu jadrových vlákien (NG): $\text{NNG} = \text{NG} - \text{CG}$. Počty NNG sa vypočítavajú pre jednotlivé bunky a potom spočítavajú pre bunky v kultúre, v paralelných kultúrach, atď.

Neplánovaná syntéza DNA (UDS): opravná syntéza DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi.

1.3. **PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY**

Test UDS s pečeneňovými bunkami cicavcov naznačuje opravnú syntézu DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi. Test je zvyčajne založený na aplikácii ^3H -TdR do pečeneňových buniek DNA, ktoré majú nízku frekvenciu buniek v S-fáze bunkového cyklu. Absorpcia ^3H -TdR sa zvyčajne stanovuje autorádiografiou, keďže táto metóda nie je tak citlivá na rušenie z buniek v S-fáze, ako napríklad počítanie kvapalnej scintilácie.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Bežne sa používajú krysy, hoci použiť sa dajú aj iné vhodné druhy cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne kmene mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť $\pm 20\%$ strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou vlhkosti je 50 % až 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Kletky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia kletiek. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú a ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je potrebné, rozriedujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo, alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, kedykoľvek je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každej nezávisle uskutočňovanej časti pokusu sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívnym kontrolným skupinám sa podávajú látky, u ktorých je známa tvorba UDS pri podaní na úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva zistiteľný nárast proti pozadiu. Pozitívne kontrolné skupiny vyžadujúce metabolickú aktiváciu sa používajú pri dávkach vyvolávajúcich mierne reakcie (4). Dávky sa volia tak, aby boli účinky zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Príklady látok pre pozitívne kontrolné skupiny:

Odber vzorky	Latka	č. CAS	č. EINECS
skorý odber (2–4 hodiny)	N-nitrozodimetylamín	62-75-9	200-249-8
neskorý odber (12–16 hodín)	N-2-fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Pre pozitívne kontrolné skupiny sa môžu použiť aj iné vhodné látky. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám boli látky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky.

1.5. POSTUP

1.5.1. Počet a pohlavie zvierat

Používa sa primeraný počet zvierat tak, aby bola zohľadnená prirodzená biologická variácia pri reakcii na test. Počet zvierat činí najmenej tri analyzovateľné zvieratá na skupinu. Ak existujú dostatočné historické údaje, pre súčasné negatívne a pozitívne kontrolné skupiny sa vyžaduje jedno alebo dve zvieratá.

Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov používajúce rovnaké spôsoby expozície, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, postačuje aj testovanie jedného pohlavia, najlepšie samcov. Ak je expozícia chemikálií na ľudí závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. Harmonogram ošetrovania

Testovacie látky sa podávajú jedenkrát.

1.5.3. Úrovně dávok

Zvyčajne sa používajú minimálne dve úrovne dávok. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Vo všeobecnosti by najnižšia dávka mala byť 50 % až 25 % najvyššej dávky.

Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii.

Najvyššia dávka sa definuje ako dávka, ktorá spôsobuje známky toxicity v pečeni (napríklad: pyknotické jadrá).

1.5.4. Limitný test

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch hladín dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. Podávanie dávok

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné spôsoby expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Intraperitoneálna cesta sa však neodporúča, pretože pečeň by mohla byť vystavená testovacej látke priamo a nie prostredníctvom obehového systému. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou závisí od veľkosti testovacieho zvieratá. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie objemov vyšších ako tento sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. Príprava pečňových buniek

Pečeňové bunky sa pripravujú z pokusných zvierat zvyčajne po 12 až 16 hodinách od podania. Vo všeobecnosti je potrebný aj ďalší odber vzorky (zvyčajne po dvoch až štyroch hodinách od podania dávky), pokiaľ neexistuje jasná pozitívna reakcia po 12 až 16 hodinách. Odber vzoriek sa môže uskutočniť aj v inom čase, ak je to zdôvodnené na základe toxikokinetických údajov.

Krátkodobé kultúry pečňových buniek cicavcov sa zvyčajne tvoria perfúziou pečene in situ kolagenázou a umožnením čerstvo oddelených pečňových buniek zachytiť sa na vhodnom povrchu. Pečeňové bunky z negatívnych kontrolných skupín zvierat by mali mať životaschopnosť (5) najmenej 50 %.

1.5.7. Stanovenie UDS

Čerstvo izolované pečňové bunky cicavcov sa inkubujú s médiom obsahujúcim $^3\text{H-TdR}$ primerane dlho, napríklad: tri až osem hodín. Na konci inkubačnej doby sa oddelí médium od buniek, pričom tieto môžu byť inkubované s médiom obsahujúcim nadbytočný neoznačený tymidín na zníženie neprirodzenej rádioaktivity („studený lov“). Bunky sa následne očistia, fixujú a nechajú vysušiť. Pri dlhších inkubačných časoch nie je studený lov potrebný. Sklíčka sa namočia do autorádiografickej emulzie, vystavia do tmy (napríklad: pri chladení počas 7 až 14 dní), vyvolajú, zafarbia a následne sa spočítajú exponované striebřité vlákna. Z každého zvieraťa sa pripravujú dve až tri sklíčka.

1.5.8. Analýza

Sklíčka obsahujú dostatočný počet buniek s normálnou morfológiou na umožnenie cieleného hodnotenia UDS. Preparáty sa mikroskopicky skúmajú na známky otvorenej cytotoxicity (napríklad: pyknóza, znížené hodnoty včlenenia rádioaktívnych alebo ťažkých izotopov).

Sklíčka sa pred rátaním vlákien označia kódmi. Z každého zvieraťa sa z minimálne dvoch sklíčok hodnotí 100 buniek; hodnotenie menej ako 100 buniek/zviera sa zdôvodní. Počty vlákien sa nehodnotia na S-fázové jadrá, avšak je možné zaznamenať podiel S-fázových buniek.

Množstvo aplikovaného $^3\text{H-TdR}$ do jadra a cytoplazmy morfologicky normálnych buniek podľa rozloženia striebřitých vlákien sa stanovuje vhodnou metódou.

2. ÚDAJE**2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV**

Uvádzajú sa údaje za každé zviera a sklíčko. Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Počet čistých jadrových vlákien (NNG) sa vypočítava pre každú bunku, pre každé zviera a pre každú dávku a čas odpočítaním počtu CG od počtu NG. Ak sa počítajú „opravované bunky“, kritériá pre definovanie „opravovaných buniek“ sa zdôvodnia a založia na historických alebo súčasných údajoch o negatívnych kontrolných skupinách. Numerické výsledky sa môžu hodnotiť štatistickými metódami. Ak sa použijú štatistické testy, vyberajú sa a zdôvodňujú pred uskutočnením štúdie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Príklady kritérií pre pozitívne/negatívne reakcie zahŕňajú:

pozitívne i) hodnoty NNG nad stanovenou hranicou, ktorá je zdôvodnená na základe laboratórnych historických údajov,

alebo ii) hodnoty NNG oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny;

negatívne i) hodnoty NNG v rámci/pod historickou prahovou hodnotou kontrolnej skupiny

alebo ii) hodnoty NNG nie oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny.

Zvažuje sa biologická relevantnosť výsledkov, t. j. do úvahy sa berú parametre ako variácia medzi zvieratami, vzťah medzi dávkou a reakciou a cytotoxicita. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy. Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vopred vylúčia jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky testu UDS s pečňovými bunkami cicavcov *in vivo* naznačujú, že testovacia látka vyvoláva poškodenie DNA v pečňových bunkách *in vivo*, ktoré sa dajú opraviť neplánovanou syntézou DNA *in vitro*. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje poškodenie DNA zistiteľné týmto testom.

Mala by sa prediskutovať pravdepodobnosť, že testovacia látka dosiahne všeobecnú obehovú sústavu alebo špecificky cieľové tkanivo (napríklad: systémová toxicita).

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

- zdôvodnenie voľby nosiča,
- rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky chovu, strava atď.,
- individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

- pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,
- údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,
- zdôvodnenie voľby úrovne dávok,
- podrobnosti o príprave testovacej látky,
- podrobnosti o podávaní testovacej látky,
- zdôvodnenie voľby spôsobu podávania,
- metódy overenia, že testovacia látka dosiahla všeobecnú obehovú sústavu alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,
- konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,
- podrobnosti o kvalite stravy a vody,
- podrobný opis harmonogramu podávania a odberu vzoriek,
- metódy merania toxicity,
- metóda prípravy pečenej buniek a kultúr,
- použitá autorádiografická technika,

- počet pripravených sklíčok a počet hodnotených buniek,
- hodnotiace kritériá,
- kritériá hodnotenia pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

- stredné hodnoty jadrových vlákien, cytoplazmatických vlákien a čistých jadrových vlákien podľa jednotlivých sklíčok, zvierat a skupín,
- vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,
- štatistické analýzy, ak boli použité,
- známky toxicity,
- súčasné údaje o negatívnych (rozpušťaadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách,
- historické údaje o negatívnych (rozpušťaadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,
- počet „opravovaných buniek“, ak bol stanovený,
- počet buniek v S-fáze, ak bol stanovený,
- životaschopnosť buniek.

Rozbor výsledkov.

Záver.

4. LITERATÚRA

Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. *Mutation Res.*, 156, 1 – 18.

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, 123 – 133.

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.

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, 263 – 285.

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, 21 – 27.

Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. *Environ. Mutagen*, 4, 553 – 562.

B.40. POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TEST POMOCOU TRANSKUTÁNEHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)

1. METODA

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 430 (2004).

1.1. ÚVOD

Poleptaním kože sa rozumie nevratné poškodenie tkaniva kože po aplikácii testovaného materiálu [v znení definície podľa Globálne harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok a zmesí (GHS)] (1). Táto metóda poskytuje postup posudzovania žieravosti, ktorý sa nevykonáva na živých zvieratách.

Posudzovanie žieravých účinkov na kožu sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách (2). Snaha o obmedzenie bolesti a utrpenia zvierat v súvislosti s týmto postupom viedla k takej revízii testovacej metódy B.4, ktorou sa umožňuje stanoviť poleptanie kože pomocou alternatívnych metód *in vitro*, čo umožňuje vylúčiť bolesť a utrpenie zvierat.

Prvým krokom k vymedzeniu alternatívnych testov, ktorými by sa umožnilo testovať žieravé účinky na kožu na účely regulácie, bolo uskutočnenie prevalidačných štúdií (3). Potom sa vykonala riadna validačná štúdia metód *in vitro* (6) (7) (8) na posúdenie poleptania kože (4) (5). Výsledky z týchto štúdií a z ďalších publikácií viedli k odporúčaniu, že na posúdenie žieravých účinkov na kožu *in vivo* by sa mohli použiť tieto testy (9) (10) (11): test na modeli ľudskej kože (pozri testovaciu metódu B.40bis) a test transkutáneho elektrického odporu (táto metóda).

Vo validačnej štúdii a ďalších publikovaných štúdiách sa uvádza, že skúškou na transkutánný elektrický odpor (TER) potkanej kože (12) (13) je možné spoľahlivo rozlišovať medzi známymi látkami so žieravými účinkami na kožu a látkami, ktoré nemajú žieravé účinky (5) (9).

Testom opísaným v tejto metóde sa umožňuje identifikovať žieravé chemické látky a zmesi. Ďalej sa ním umožňuje identifikovať nežieravé látky a zmesi, ak sa podporí dôkaznými stanoveniami založenými na ďalších existujúcich údajoch (napr. pH, vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou, údaje o vplyve na človeka a/alebo na zvieratá) (1) (2) (11) (14). Test neposkytuje údaje o dráždivých účinkoch na kožu, ani neumožňuje ďalšiu kategorizáciu žieravých látok, ako to umožňuje Globálne harmonizovaný systém klasifikácie (GHS) (1).

Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii pokožky sa odporúča dodržiavať stratégiu sekvenčného testovania, ako je uvedené v testovacej metóde B.4 (2) a ako je stanovené v Globálne harmonizovanom systéme (1). Táto stratégia testovania zahŕňa vykonávanie testov poleptanie kože *in vitro* (ako je opísané v tejto metóde) a dráždivosť pre kožu pred zvážením testovania na živých zvieratách.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Poleptanie kože *in vivo*: je vznik nevratného poškodenia kože: najmä viditeľná nekróza postihujúca epidermu a zasahujúca do dermy, ktorá nastane do štyroch hodín po aplikácii testovanej látky. Typickými reakciami na poleptanie sú vrede, krvácanie, krvavé chrasty a na konci štrnásťdňového pozorovania strata farby v dôsledku vyblednutia kože, úplné ložiská alopecie a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Transkutánný elektrický odpor (TER): je miera elektrickej impedancie kože vyjadrená ako hodnota odporu v kiloohmoch. Jednoduchá a robustná metóda posúdenia bariérovej funkcie spočíva v zaznamenávaní prechodu iónov cez kožu s použitím aparatury s Wheatstonovým mostíkom.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Tabuľka 1

Referenčné chemické látky

Názov	Č. EINECS	Č. CAS	
propan-1,2-diamín	201-155-9	78-90-0	silno žieravý

Názov	Č. EINECS	Č. CAS	
kyselina akrylova	201-177-9	79-10-7	silno žieravá
2- <i>tert</i> -butylfenol	201-807-2	88-18-6	žieravý
hydroxid draselný (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žieravý
kyselina sirova (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žieravá
kyselina oktanova (kaprylova)	204-677-5	124-07-02	žieravá
4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-4-ylamin	209-533-5	584-13-4	nežieravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežieravý
fenetyl bromid	203-130-8	103-63-9	nežieravý
tetrachloretylen	204-825-9	27-18-4	nežieravý
kyselina izostearova	250-178-0	30399-84-9	nežieravá
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežieravý

Väčšina z uvedených chemických látok je prevzatá zo zoznamu chemických látok vybraných pre medzinárodnú validačnú štúdiu ECVAM (4). Ich výber sa zakladá na týchto kritériách:

- rovnaký počet žieravých a nežieravých látok;
- komerčne dostupné látky, ktoré sa vzťahujú na väčšinu relevantných tried chemických látok;
- zahŕnutie silno žieravých aj menej žieravých látok s cieľom umožniť rozlišovanie na základe schopnosti leptať;
- voľba chemických látok, s ktorými možno manipulovať v laboratóriu bez vážnych nebezpečenstiev iných ako je žieravosť.

1.4. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaný materiál sa aplikuje až 24 hodín na epidermálny povrch kožných terčikov v dvojkomorovom testovacom systéme, v ktorom tieto kožné terčiky majú funkciu deliacej steny medzi komorami. Kožné terčiky sa odoberú z potkanov vo veku 28 až 30 dní, ktoré boli usmrtené šetrným spôsobom. Žieravé materiály sa identifikujú podľa ich schopnosti spôsobovať stratu normálnej integrity a bariérovej funkcie rohovitej vrstvy (*stratum corneum*), ktorá sa meria ako zníženie TER pod prahovú úroveň (12). Pre potkanov bola vybraná ako referenčná prahová hodnota TER 5 k Ω na základe rozsiahlych údajov pre široký okruh chemických látok, pre ktoré hodnota TER v prevažnej väčšine prípadov bola buď značne nad touto hodnotou (často > 10 k Ω), alebo značne pod ňou (často < 3 k Ω) (12). Všeobecne povedané, materiály, ktoré nie sú žieravé pre zvieratá, ale sú dráždivé alebo nedráždivé, neznižujú TER pod túto referenčnú prahovú hodnotu. Okrem toho, používanie iných kožných prípravkov alebo iného zariadenia si môže vynútiť zmenu voľby referenčnej prahovej hodnoty a jej ďalšiu validáciu.

Do testovacieho postupu je na potvrdenie pozitívnych výsledkov vrátane hodnôt TER okolo 5 k Ω zaradený krok na stanovenie viazania farbiva. Týmto krokom viazania farbiva sa stanovuje, či zvýšenie priepustnosti iónov je v dôsledku fyzického porušenia rohovitej vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo sa, že metóda TER s využitím kože potkana umožňuje predvídať výsledky zisťovania žieravosti *in vivo* s králikmi podľa testovacej metódy B.4 (2). Malo by sa uviesť, že test *in vivo* na králikoch je veľmi konzervatívny vzhľadom na žieravé a dráždivé účinky na kožu v porovnaní s testom na ľudskej koži pomocou náplasti (15).

1.5. POPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.5.1. Zvieratá**

Vybratým živočíšnym druhom sú potkany, pretože citlivosť ich kože na chemické látky sa v tomto teste v minulosti preukázala (10). Vek (v čase odberu kože) a kmeň potkanov sú osobitne dôležité na zabezpečenie toho, aby folikuly chlpov boli v latentnej fáze, predtým než začne rásť zrelej srsti.

Chrbtová a bočná srst mladých, približne 22-denných samcov alebo samic potkanov (z kmeňa príbuzného Wistaru alebo porovnateľného kmeňa) sa opatrne odstráni malými nožnicami. Zvieratá sú potom umyté opatrným utieraním, pričom sa ostrihaná oblasť ponára do antibiotického roztoku (obsahujúceho napríklad streptomycín, penicilín, chloramfenikol a amfotericín v koncentráciách účinne inhibujúcich rast baktérií). Zvieratá sa na tretí alebo štvrtý deň po prvom omytí znova omyjú antibiotikami a používajú sa do 3 dní po druhom omytí, keď sa rohovitá vrstva (*stratum corneum*) po odstránení srsti zregeneruje.

1.5.2. Príprava kožných terčikov

Zvieratá sa šetrným spôsobom usmrťia vo veku 28 až 30 dní; tento vek je kritický. Z každého zvierata sa potom odstráni chrbtová a bočná koža a nadbytočný podkožný tuk sa z kože opatrne zoškrabe. Odoberú sa kožné terčiky, z ktorých každý má priemer približne 20 mm. Koža sa pred použitím terčikov môže uchovávať, ak sa preukázalo, že pozitívne a negatívne kontrolné údaje sú rovnocenné s tými, ktoré sa získali s čerstvou kožou.

Každý kožný terčik sa preloží cez jeden z koncov teflónovej trubičky z PTFE (polytetrafluóretylén) tak, aby epidermálny povrch bol v kontakte trubičkou. Cez koniec trubičky sa natesno prevlečie gumový tesniaci krúžok, aby sa koža nepohybovala, a nadbytočné tkanivo sa oreže. Rozmery trubičky a tesniaceho krúžku sú uvedené na obrázku 2. Gumový tesniaci krúžok sa potom na koniec teflónovej (PTFE) trubičky opatrne a utesní vazelinou. Trubičku pridržiava v receptorovej komore obsahujúcej roztok MgSO_4 (154 mM) pružinová svorka (obrázok 1). Kožný terčik by sa mal úplne ponoriť do roztoku MgSO_4 . Z jednej kože potkana možno získať 10 až 15 kožných terčikov.

Pre každú zvieraciu kožu sa pred začatím testovania zmeria elektrický odpor dvoch kožných terčikov ako postup kontroly kvality. Ak sa pri tomto teste majú použiť ostatné terčiky, pre obidva terčiky by mala byť nameraná hodnota odporu väčšia ako 10 k Ω . Ak je hodnota odporu nižšia ako 10 k Ω , zvyšné terčiky z tejto kože by sa mali z testov vyradiť.

1.5.3. Aplikácia testovaných a kontrolných látok

Pre každú štúdiu by sa mali súbežne použiť pozitívne a negatívne kontroly, aby sa zaručila dostatočná účinnosť daného experimentálneho modelu. Mali by sa použiť kožné terčiky z toho istého zvierata. Navrhovanými látkami pre pozitívnu kontrolu je 10 M kyselina chlorovodíková a pre negatívnu kontrolu destilovaná voda.

Na epidermálny povrch vnútri trubičky sa rovnomerne aplikujú tekuté testované látky (150 μl). Pri testovaní tuhých materiálov sa na terčik rovnomerne aplikuje dostatočné množstvo tuhej látky, aby bol pokrytý celý povrch epidermy. Na vrch tuhej látky sa pridá deionizovaná voda (150 μl) a trubička sa jemne pretrepe. S cieľom zaistiť maximálny styk látky s kožou môže vzniknúť potreba zohriať tuhú látku na 30 °C, aby sa testovaná látka roztavila alebo zmäkla, alebo ju treba pomlieť na zrnitý materiál alebo prášok.

Pre každú testovanú a kontrolnú látku sa použijú tri kožné terčiky. Testované látky sa aplikujú počas 24 hodín pri teplote 20 – 23 °C. Testovaná látka sa celkom odstráni umytím prúdom vody z vodovodu s teplotou do 30 °C.

1.5.4. Merania TER

Impedancia kože sa meria ako TER. TER sa meria použitím nízkonapäťového, Wheatstonovho meracieho mostíka na striedavý prúd (13). Všeobecné špecifikácie tohto mostíka: prevádzkové napätie 1 – 3 volty, sínusový alebo pravouhlý tvar kmitov striedavého prúdu s frekvenciou 50 – 1 000 Hz a rozsah merania najmenej 0,1 – 30 k Ω . Merací mostík použitý vo validačnej štúdii meria indukčnú kapacitanciu a odpor až do hodnôt 2 000 H, 2 000 μF a 2 M Ω pri frekvenciách 100 Hz alebo 1 kHz, s použitím sériových alebo paralelných hodnôt. Na účely merania TER v rámci skúšky žieravosti sa zaznamenávajú hodnoty odporu pri frekvencii 100 Hz a s použitím sériových hodnôt. Pred meraním elektrického odporu sa povrchové napätie kože zníži pridaním dostatočného množstva 70 % etanolu tak, aby sa epiderma zakryla. Po niekoľkých sekundách sa etanol z trubičky odstráni a tkanivo sa potom zvlhčí pridaním 3 ml roztoku MgSO_4 (154 mM). Elektrody meracieho mostíka sa umiestnia na obe strany kožného terčika a zmeria sa odpor v k Ω /kožný terčik (obrázok 1). Rozmery elektródy a dĺžka exponovanej elektródy pod krokosvorkami sú uvedené na obrázku 2. Svorka vnútornej elektródy je počas merania opretá o horný koniec teflónovej trubičky, aby sa zaistilo, že sa dĺžka časti elektródy ponorenej v roztoku MgSO_4 nemení. Vonkajšia elektróda je umiestnená vo vnútri receptorovej komory tak, aby spočívala na dne komory. Vzdialenosť medzi pružinovou svorkou a dnom

teflónovej trubičky sa udržiava konštantná (obrázok 2), pretože táto vzdialenosť má vplyv na nameranú hodnotu odporu. V dôsledku toho by vzdialenosť medzi vnútornou elektródou a kožným terčíkom mala byť konštantná a minimálna (1 – 2 mm).

Ak je nameraná hodnota odporu vyššia ako 20 k Ω , môže to byť spôsobené zvyškami testovanej látky na epidermálnej strane kožného terčíka. O ďalšie odstránenie tohto nánosu sa možno pokúsiť napríklad tak, že sa teflónová trubička zakryje palcom chráneným v rukavici a pretrepáva sa ňou približne 10 sekúnd; roztok MgSO₄ sa odstráni a meranie odporu sa opakuje s čerstvým MgSO₄.

Vlastnosti a rozmery testovacej aparatury a použitý experimentálny postup môžu mať vplyv na namerané hodnoty TER. Referenčná prahová hodnota 5 k Ω pre leptavé účinky bola odvodená na základe údajov zistených špecifickou aparaturou a postupom opísaným v tejto metóde. Ak sa zmenia podmienky testovania alebo sa použije iná aparatura, môžu sa použiť iné prahové a kontrolné hodnoty. Preto je potrebné kalibrovat metodiku a prahové hodnoty odporu testovaním série referenčných štandardných materiálov vybraných z chemických látok použitých vo validačnej štúdii (4, 5), alebo z tried chemických látok podobných skúmaným chemikáliám. Súbor vhodných referenčných chemických látok sa uvádza v tabuľke 1.

1.5.5. Metódy stanovenia viazania farbiva

Expozícia kože určitým nežieravým materiálom môže mať za následok zníženie odporu pod prahovú hodnotu 5 k Ω , v dôsledku čoho sa umožní prienik iónov cez rohovitú vrstvu (*stratum corneum*) a znižuje sa elektrický odpor (5). Napríklad neutrálne organické látky a chemické látky (vrátane detergentov, emulzifikátorov a ostatných povrchovo aktívnych činidiel), ktoré majú povrchovo aktívne vlastnosti, môžu viesť k odstráneniu kožných lipidov, čím sa bariéra stane pre ióny priepustnejšia. Preto, ak sú hodnoty TER testovaných látok nižšie ako 5 k Ω , alebo sa pohybujú okolo 5 k Ω , a nie je viditeľné poškodenie, malo by sa vykonať posúdenie prieniku farbiva na kontrolných a upravených tkanivách, aby sa zistilo, či sú namerané hodnoty TER výsledkom zvýšenej priepustnosti kože alebo poleptania kože (3, 5). V prípade poleptania kože, keď sa *stratum corneum* poruší, farbivo sulforodamín B pri aplikácii na povrch kože rýchlo ňou preniká a sfarbuje podkladové tkanivo. Toto konkrétne farbivo je stabilné v prostredí širokého rozsahu chemických látok a nemá naň vplyv extrakčný postup opísaný ďalej.

1.5.5.1. Aplikácia a odstránenie farbiva sulforodamínu B

Po posúdení TER sa síran horečnatý odstráni z trubičky a koža sa pozorne preskúma, či nie je viditeľne poškodená. Ak zreteľné veľké poškodenie nie je viditeľné, aplikuje sa na epidermálnu stranu každého kožného terčíka počas 2 hodín 150 μ l 10 % roztoku (m/V) farbiva sulforodamínu B (Acid Red 52; C.I. 45100; č. EINECS 222-529-8; č. CAS 3520-42-1) v destilovanej vode. Tieto kožné terčíky sa potom asi 10 sekúnd omývajú tečúcou vodou pri teplote zodpovedajúcej najviac izbovej teplote, aby sa odstránilo všetko nadbytočné/ neviazané farbivo. Všetky kožné terčíky sa opatrne odoberú z teflónovej trubičky a umiestnia sa do liekovky (napr. sklenej scintilačnej liekovky s objemom 20 ml) obsahujúcej deionizovanú vodu (8 ml). Liekovky sa 5 minút ľahko pretrepávajú, aby sa odstránilo akékoľvek nadbytočné neviazané farbivo. Tento postup oplachovania sa zopakuje a potom sa kožné terčíky vyberú a vložia do liekoviek obsahujúcich 5 ml 30 % (hm/obj.) laurylsíranu sodného (SDS) v destilovanej vode a cez noc sa inkubujú pri teplote 60 °C.

Po inkubácii sa všetky kožné terčíky odstránia a zlikvidujú a zostávajúci roztok sa odstreduje 8 minút pri teplote 21 °C (pri relatívnej odstredivej sile $\sim 175 \times g$). Vzorka supernatantu s objemom 1 ml sa zriedi v pomere 1:5 (v/v) (t. j. 1 ml + 4 ml) s 30 % (w/v) SDS v destilovanej vode. Optická hustota (OD) roztoku sa meria pri 565 nm.

1.5.5.2. Výpočet obsahu farbiva

Obsah farbiva sulforodamínu B v kožnom terčíku sa vypočíta z hodnôt OD (5) (mólový extinkčný koeficient sulforodamín B pri 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulová hmotnosť = 580). Obsah farbiva sa stanoví pre každý kožný terčík s využitím vhodnej kalibračnej krivky a potom sa vypočíta priemerný obsah farbiva pre replikáty.

2. ÚDAJE

Hodnoty odporu (k Ω) a prípadne hodnoty stredného obsahu farbiva (μ g/terčík), pre testovaný materiál, ako aj pre pozitívne a negatívne kontroly by sa mali uviesť v podobe tabuľky (jednotlivé údaje z jednotlivých pokusov ich stredné hodnoty s ich $\pm$ smerodajnou odchýlkou), vrátane údajov o duplicitných/opakovaných experimentoch, a ich stredné a jednotlivé hodnoty.

2.1. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Stredné hodnoty výsledkov TER sú prijateľné, ak súbežne namerané hodnoty pre pozitívnu aj negatívnu kontrolu patria do prijateľného rozmedzia danej metódy v danom testovacom laboratóriu. Pre opísanú metodiku a aparatúru sú prijateľné hodnoty rozmedzia odporu uvedené v tejto tabuľke:

Kontrola	Látka	Rozsah odporu (kΩ)
pozitívna	10M kyselina chlorovodíková	0,5 – 1,0
negatívna	destilovaná voda	10 – 25

Výsledné stredné hodnoty viazania farbiva sú prijateľné, ak hodnoty pre súbežné kontroly spadajú do prijateľných rozmedzí danej metódy. Pre opísanú metodiku a aparatúru sú odporúčané prijateľné rozmedzia obsahu farbiva pre kontrolné látky uvedené v tejto tabuľke:

Kontrola	Látka	Rozsah obsahu farbiva (µg/terčik)
pozitívna	10M kyselina chlorovodíková	40 – 100
negatívna	destilovaná voda	15 – 35

Testovaná látka sa pokladá za látku, ktorá nie je žieravá pre kožu:

- i) ak je stredná hodnota TER zmeraná pre testovanú látku vyššia než 5 kΩ, alebo
- ii) ak je stredná hodnota TER nižšia alebo sa rovná 5 kΩ, a
 - kožný terčik nevykazuje zreteľné poškodenie a
 - stredný obsah farbiva na terčik je omnoho nižší než stredný obsah farbiva na terčik stanovený súbežnou pozitívnou kontrolou s 10M HCl.

Testovaná látka sa pokladá za látku žieravú pre kožu:

- i) ak je stredná hodnota TER nižšia alebo sa rovná 5 kΩ a kožný terčik je zreteľne poškodený, alebo
- ii) ak je stredná hodnota TER nižšia, alebo sa rovná 5 kΩ a
 - kožný terčik nie je zjavne poškodený, ale
 - priemerný obsah farbiva je pre testovanú látku vyšší alebo sa rovná strednému obsahu farbiva na terčik stanovenému súbežnou pozitívnou kontrolou s 10M HCl.

3. SPRÁVY

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné látky:

- chemický názov (chemické názvy) ako napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS a číslo CAS, ak je známe,
- čistota a zloženie látky alebo prípravku (v hmotnostných percentách) a fyzikálne vlastnosti,

- fyzikálno-chemické vlastnosti ako napríklad fyzikálny stav, pH, stabilita, rozpustnosť vo vode, relevantné pre vykonanie štúdie,
- úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním, pokiaľ je to vhodné (napr. zahriatie, rozmletie),
- stabilita, ak je známa.

Pokusné zvieratá:

- použitý kmeň a pohlavie,
- vek zvierat, ak sú použité ako darcovské zvieratá,
- zdroj, podmienky umiestnenia zvierat, výživa atď.,
- podrobnosti o príprave kože.

Testovacie podmienky:

- kalibračné krivky na testovacia aparátúra,
- kalibračné krivky na vykonanie testu účinnosti viazania farbiva,
- podrobnosti o použitom testovacom postupe na meranie TER,
- podrobnosti o testovacom postupe použitom na posúdenie viazania farbiva, v prípade potreby;
- opis všetkých modifikácií testovacích postupov,
- opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky:

- tabuľky s údajmi z merania hodnôt TER a prípadne obsahu viazaného farbiva pre jednotlivé zvieratá a jednotlivé vzorky kože;
- opis všetkých pozorovaných účinkov.

Rozbor výsledkov

Záver

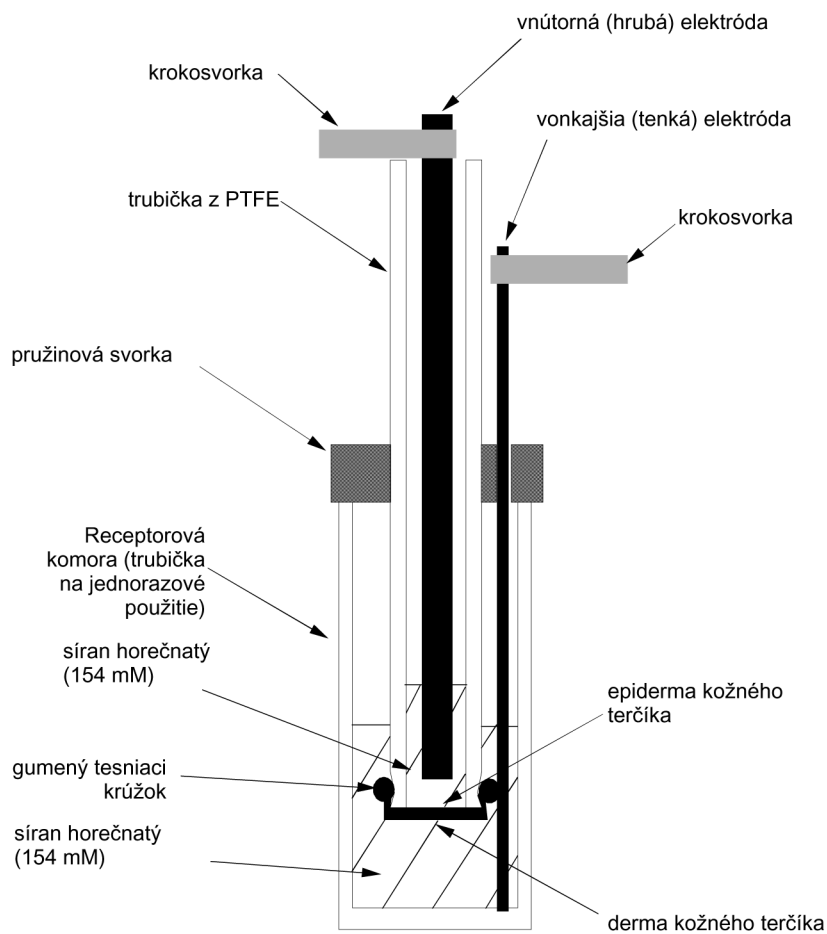
4. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (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](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., Ponc, 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, 62 pp.
- (7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillozo, 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™, EPI SKINTM (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/epidocs/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.
- (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 interlaboratory 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.

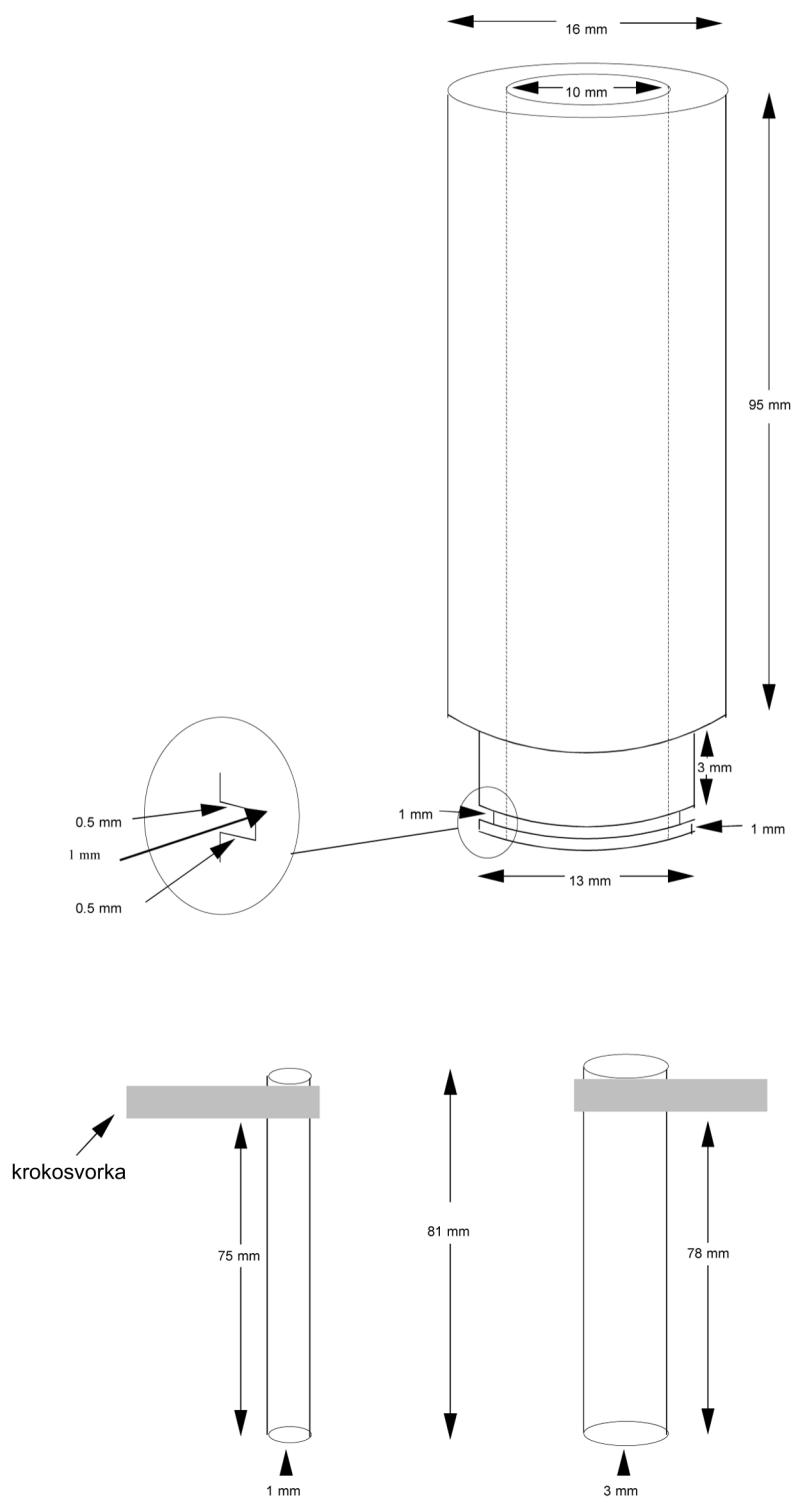
Obrázok 1

Aparatúra na meranie TER potkanej kože



Obrázok 2

Rozmery teflónovej a receptorovej trubičky a použitých elektród



Rozhodujúce faktory zobrazenej aparatury:

- vnútorný priemer trubičky z PTFE,
- dĺžka elektród vzhľadom na trubičku z PTFE a trubičku receptora taká, že elektródy nedosahujú ku kožnému terčíku a elektróda so štandardnou dĺžkou je v kontakte s roztokom MgSO_4 ,
- objem roztoku MgSO_4 v trubičke receptora by mal zaistiť hĺbku vrstvy tekutiny vzhľadom na úroveň trubičky z PTFE, ako je znázornené na obrázku 1,
- kožný terčík by mal byť k trubičke z PTFE pripevnený tak, aby elektrický odpor predstavoval skutočnú mieru vlastnosti kože.

B.40 BIS. POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO*: TEST POMOCOU MODELU ĽUDSKEJ KOŽE

1. METÓDA

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 431 (2004).

1.1. ÚVOD

Poleptaním kože a rozumie nevrátne poškodenie tkaniva kože po aplikácii testovaného materiálu [v znení definície podľa Globálne harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok a zmesí (GHS)] (1). Pri tejto testovacej metóde nie sú na posúdenie žieravosti pre kožu potrebné živé zvieratá ani tkanivá zvierat.

Posudzovanie žieravosti pre kožu sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách (2). Snaha o obmedzenie bolesti a utrpenia zvierat v súvislosti s týmto postupom viedla k takej revízii testovacej metódy B.4, ktorou sa umožňuje stanoviť poleptanie kože pomocou alternatívnych metód *in vitro*, čo umožňuje vylúčiť bolesti a utrpenie zvierat.

Prvým krokom k vymedzeniu alternatívnych testov, ktorými by sa umožnilo testovanie žieravých účinkov na kožu na účely regulácie, bolo vykonanie prevalidačných štúdií (3). Po nich sa vykonala riadna validačná štúdia metód *in vitro* (6), (7), (8) na posúdenie poleptania kože (4), (5). Výsledky z týchto štúdií a z iných publikácií (9) viedli k odporúčaniu, že na posúdenie žieravosti pre kožu *in vivo* by sa mohli použiť tieto testy (10), (11), (12), (13): test na modeli ľudskej kože (táto metóda) atest transkutánného elektrického odporu (pozri testovaciu metódu B.40).

Vo validačných štúdiách sa uvádza, že testy s využitím modelov ľudskej kože (3), (4), (5), (9) umožňujú spoľahlivo rozlišovať medzi známymi látkami so žieravým účinkom na kožu a látkami, ktoré nemajú žieravé účinky. V protokole o teste sa takisto uvádza rozdiel medzi látkami so silnými a menej silnými žieravými účinkami na kožu.

Testom opísaným v tejto metóde sa umožňuje identifikovať žieravé chemické látky a zmesi. Takisto sa ním umožňuje identifikovať nežieravé látky a zmesi, ak sa podporí dôkaznými stanoveniami založenými na ďalších existujúcich informáciách (napríklad pH, vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou, údaje o vplyve na človeka/zvieratá) (1), (2), (13), (14). Test bežne neposkytuje dostatočné údaje o dráždivých účinkoch na kožu, ani neumožňuje ďalšiu kategorizáciu žieravých látok, ako to umožňuje Globálne harmonizovaný systém klasifikácie (GHS)(1).

Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii pokožky sa odporúča dodržiavať stratégiu sekvenčného testovania, ako je uvedené v testovacej metóde B.4 (2) a ako je stanovené v Globálne harmonizovanom systéme klasifikácie (GHS) (1). Táto stratégia testovania zahŕňa vykonávanie testov *in vitro* s cieľom zistiť poleptanie kože (ako je opísané v tejto metóde) a dráždivosť pre kožu pred zvážením testovania na živých zvieratách.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Poleptanie kože *in vivo*: je vznik nevrátneho poškodenia kože: najmä viditeľná nekróza postihujúca epidermu a zasahujúca do dermy, ktorá nastane do štyroch hodín po aplikácii testovanej látky. Typickými reakciami na poleptanie sú vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci štrnásťdňového pozorovania strata farby v dôsledku vyblednutia kože, úplné ložiská alopecie a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať histopatológiu.

Životaschopnosť buniek: parameter, ktorým sa meria celková aktivita bunkovej populácie (napr. schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MMT) a ktorý v závislosti od posledného merania a od použitia usporiadania testu je v korelačnom vzťahu s celkovým počtom buniek a/alebo s ich vitalitou.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Tabuľka 1

Referenčné chemické látky

Názov	Číslo EINECS	Číslo CAS	
propán-1,2-diamín	201-155-9	78-90-0	silno žieravý

Názov	Číslo EINECS	Číslo CAS	
kyselina akrylová	201-177-9	79-10-7	silno žieravá
2- <i>tert</i> -butylfenol	201-807-2	88-18-6	žieravý
hydroxid draselný (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žieravý
kyselina sírová (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žieravá
kyselina oktanová (kaprylová)	204-677-5	124-07-02	žieravá
4 <i>H</i> -1,2,4-triazol-3-ylamín	209-533-5	584-13-4	nežieravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežieravý
fenetylbromid	203-130-8	103-63-9	nežieravý
tetrachlóretylén	204-825-9	27-18-4	nežieravý
kyselina izostearová	250-178-0	30399-84-9	nežieravá
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežieravý

Väčšina z uvedených chemických látok je prevzatá zo zoznamu chemických látok vybraných pre medzinárodnú validačnú štúdiu ECVAM (4). Ich výber sa zakladá na týchto kritériách:

- rovnaký počet žieravých a nežieravých látok;
- komerčne dostupné látky, ktoré sa vzťahujú na väčšinu relevantných tried chemických látok;
- zahŕnutie silno žieravých a menej žieravých látok, aby sa umožnilo rozlíšenie na základe možného žieravého účinku;
- výber chemických látok, s ktorými možno manipulovať v laboratóriu bez vážnych nebezpečenstiev, iných ako je žieravosť.

1.4. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaný materiál sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model ľudskej kože pozostávajúci aspoň z rekonštruovanej epidermy s funkčnou rohovitou vrstvou (*stratum corneum*). Žieravé materiály sa identifikujú na základe schopnosti spôsobiť pri špecifikovanej expozičnej dobe pokles životaschopnosti buniek [stanovený napríklad pomocou skúšky redukcie MTT (15)] pod definovanú prahovú úroveň. Podstata skúšky pomocou modelu ľudskej kože sa zakladá na hypotéze, že žieravé chemikálie sú tie, ktoré sú schopné preniknúť rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difúziou alebo eróziou a sú cytotoxické pre bunky v hlbších bunkových vrstvách.

1.4.1. Postup**1.4.1.1. Modely ľudskej kože**

Modely ľudskej kože možno vyrobiť alebo získať komerčne (napr. modely EpiDerm™ a EPISKIN™) (16), (17), (18), (19) alebo ich možno pripraviť či vyrobiť v testovacom laboratóriu (20), (21). Uznáva sa, že využitie ľudskej kože podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zreteľom a podmienkam. Každý nový model by mal byť validovaný (aspoň v rozsahu uvedenom v 1.4.1.1.2). Modely ľudskej kože použité pre tento test musia spĺňať tieto podmienky:

1.4.1.1.1. Všeobecné podmienky modelu:

Na zostavenie epitelu by sa mali použiť ľudské keratinocyty. Pod funkčnou rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) by malo byť viac vrstiev životaschopných epitelových buniek. Model kože môže mať takisto ako zložku stromálnu vrstvu. Rohovitá vrstva (*stratum corneum*) by mala byť viacvrstvá a s potrebným profilom lipidov, aby sa umožnila funkcia robustnej bariéry odolávajúcej rýchlemu prenikaniu cytotoxických markerov. Izolačné vlastnosti modelu by mali zabrániť prenikaniu materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva. Preniknutie testovaných chemických látok okolo *stratum corneum* povedie k chybnému modelovaniu expozície kože. Model kože by nemal byť kontaminovaný baktériami (vrátane mykoplazmy) ani hubami.

1.4.1.1.2 Podmienky funkčného modelu:

Rozsah životaschopnosti sa obyčajne stanovuje na základe MTT alebo iných metabolicky premenených vitálnych farbív. V týchto prípadoch by optická hustota (optical density – OD) extrahovaného (solubilizovaného) farbiva negatívneho kontrolného tkaniva mala byť aspoň 20-násobne vyššia ako OD samotného extrakčného rozpúšťadla [pozri prehľad v (22)]. Negatívne kontrolné tkanivo by malo byť stabilné v kultúre (malo by viesť k podobným výsledkom merania životaschopnosti) počas expozičnej doby testu. *Stratum corneum* musí byť dostatočne robustné, aby odolalo rýchlemu prieniku určitých cytotoxických markerových chemikálií (napríklad 1 % Triton X-100). Túto vlastnosť možno odhadnúť pomocou expozičnej doby potrebnej na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET₅₀) (napr. pri modeloch EpiDerm™ a EPISKIN™ je to > 2 hod.). Tkanivo by malo byť preukázateľne schopné reprodukovateľnosti v čase a prednostne aj medzilaboratórne. Okrem toho by malo umožniť predikciu potenciálu žieravosti referenčných chemických látok (pozri tabuľku 1), ak sa používa vo zvolenom testovacom protokole.

1.4.1.2. Aplikácia testovaných a kontrolných látok

Pre každý experiment (expozičný čas), vrátane kontrolných, sa použijú dve repliky tkaniva. Pri tekutých materiáloch sa musí aplikovať dostatočné množstvo testovanej látky, aby sa povrch kože rovnomerne pokryl: malo by sa použiť najmenej 25 µl/cm². Pri tuhých materiáloch sa musí aplikovať dostatočné množstvo testovanej látky, aby koža bola rovnomerne pokrytá, a testovaná látka by mala byť zvlhčená deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby bol zaistený dobrý styk s kožou. Tuhé materiály by sa mali podľa potreby pred aplikáciou zomlieť na prášok. Metóda aplikácie by mala byť pre testovanú látku vhodná (pozri napr. odkaz 5). Na konci expozičnej doby sa testovaný materiál musí dôkladne zmyť z povrchu kože pomocou vhodného pufru alebo 0,9 % roztokom NaCl.

Pre každú štúdiu by sa mali súbežne vykonať pozitívne a negatívne kontroly na zabezpečenie dostatočnej funkčnosti daného experimentálneho modelu. Odporúčanými látkami pre pozitívnu kontrolu sú ľadová kyselina octová alebo 8N KOH. Odporúčanými látkami pre negatívnu kontrolu sú 0,9 % roztok NaCl alebo voda.

1.4.1.3. Meranie životaschopnosti buniek

Na meranie životaschopnosti buniek sa môžu používať len validované kvantitatívne metódy. Ďalej, miera životaschopnosti musí byť zlučiteľná s využívaním v trojrozmernom modeli tkaniva. Nešpecifické viazanie farbiva nesmie interferovať s meraním životaschopnosti. Preto nie sú vhodné farbivá viažuce bielkoviny a farbivá nepodliehajúce metabolickej konverzii (napr. neutrálna červen). Najčastejšie používanou skúškou je stanovenie redukcie MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá: číslo EINECS 206-069-5, číslo CAS 298-93-1], pre ktorú bolo preukázané, že poskytuje presné a reprodukovateľné výsledky (5), ale možno použiť aj iné. Vzorka kože sa umiestni do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (napr. 0,3 až 1 mg/ml) a inkubuje sa pri vhodnej teplote počas 3 hodín. Pomocou rozpúšťadla (izopropanol) sa potom extrahuje zrazenina modrého formazánového produktu, pričom koncentrácia formazánu sa meria na základe stanovenia OD pri vlnovej dĺžke medzi 540 a 595 nm.

Chemický účinok testovaného materiálu na vitálne farbivo môže imitovať účinok bunkového metabolizmu, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti. K tomu preukázateľne dochádza, keď sa testovaný materiál úplne neopláchne z kože (9). Ak testovaný materiál pôsobí priamo na vitálne farbivo, musia sa použiť ďalšie kontroly, aby zistilo, či testované látky neinterferujú s meraním životaschopnosti, a prípadné výsledky korigovať (9), (23).

2. ÚDAJE

Pre každé tkanivo je potrebné do tabuľky zaznamenať hodnoty OD a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre testovaný materiál a pre pozitívne aj negatívne kontroly, vrátane údajov o duplicitných alebo opakovaných experimentoch, a prípadne ich stredné a individuálne hodnoty.

2.1. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Hodnoty OD namerané pre každú testovaciu vzorku sa môžu použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti vzhľadom na výsledok negatívnej kontroly, ktorý je dohodou stanovený na úroveň 100 %. Referenčná prahová hodnota percentuálneho podielu životaschopnosti buniek umožňujúca rozlišovať žieravé a nežieravé testované materiály (alebo rozlišovať medzi rôznymi triedami žieravých), alebo štatistické postupy použité na vyhodnotenie výsledkov a identifikáciu žieravých materiálov, musia byť jasne definované, zdokumentované, a musí sa preukázať ich vhodnosť. Vo všeobecnosti sa tieto referenčné prahové hodnoty určujú počas optimalizácie testu, ich testovaním predvalidačnej fázy a potvrdzujú sa validačnou štúdiou. Predikcia žieravosti je v spojení s modelom EpiDerm™ daná napríklad takto (9):

Testovaná látka sa pokladá za žieravú pre kožu:

- i) ak po 3 minútach expozície je životaschopnosť nižšia ako 50 %, alebo
- ii) ak po 3 minútach expozície je životaschopnosť vyššia ako 50 % alebo sa rovná 50 % a životaschopnosť po 1 hodine expozície je nižšia ako 15 %.

Testovaná látka sa pokladá za látku nežieravú pre kožu:

- i) ak po 3 minútach expozície je životaschopnosť vyššia ako 50 % alebo sa rovná 50 % a životaschopnosť po 1 hodine expozície je vyššia ako 15 % alebo sa rovná 15 %.

3. SPRÁVY

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná a kontrolná látka:

- chemický názov (chemické názvy), ako napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS a číslo CAS, ak je známe,
- čistota a zloženie látky alebo prípravku (v hmotnostných percentách),
- fyzikálno-chemické vlastnosti ako napríklad fyzikálny stav, pH, stabilita, rozpustnosť vo vode, relevantné pre vykonanie štúdie,
- prípadná úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),
- stabilita, ak je známa.

Zdôvodnenie modelu kože a použitého protokolu.

Testovacie podmienky:

- použitý bunkový systém,
- údaje o kalibrácii zariadenia použitého na meranie životaschopnosti buniek (napr. spektrofotometer),
- úplné podkladové údaje pre konkrétny použitý model kože vrátane jeho validity,

- podrobnosti o použítom testovacom postupe,
- použité testovacie dávky,
- opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,
- odkaz na minulé údaje o danom modeli,
- opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky:

- údaje z individuálnych testovacích vzoriek, spracované v podobe tabuľky,
- opis ďalších pozorovaných účinkov.

Rozbor výsledkov.

Záver

4. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (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](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., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219 – 255.
- (4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471 – 482.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, 483 – 524.
- (6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.
- (7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. 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>
- (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. NTH 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 assays. 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) Ponc, 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.
- (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.41. TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*

1. METÓDA

Táto metóda je ekvivalentná OECD TG 432 (2004).

1.1. ÚVOD

Fototoxicita sa definuje ako toxická odozva na látku aplikovanú na telo, ktorá je buď vyvolaná, alebo zvýšená (je zjavná pri nižších úrovniach dávok) po následnej expozícii svetlu, alebo ktorá je vyvolaná ožiarení kože po systémovom podaní chemickej látky.

Test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa používa na identifikáciu fototoxického potenciálu testovanej látky vyvolaného chemickou látkou excitovanou po expozícii svetlu. Týmto testom sa vyhodnocuje foto-cytotoxicita pomocou relatívneho zníženia životaschopnosti buniek exponovaných účinkom chemickej látky jednak v prítomnosti a jednak v neprítomnosti svetla. Látky identifikované týmto testom sú pravdepodobne fototoxické *in vivo* po systémovej aplikácii a distribúcií do kože, alebo po lokálnej aplikácii.

Uvádza sa, že mnohé druhy chemických látok indukujú fototoxické účinky (1), (2), (3), (4). Spoločnou črtou je ich schopnosť absorbovať svetelnú energiu slnečného svetla. Podľa prvého fotochemického zákona (Grotthaus-Draperov zákon) je fotoreakcia podmienená dostatočnou absorpciou svetelných kvánt. Pred zvažovaním biologického testovania sa preto musí stanoviť absorpčné spektrum testovanej chemickej látky v oblasti U V/ viditeľného svetla v súlade s usmernením OECD Test Guideline 101. Vychádza sa z toho, že ak je mólový extinkčný/absorpčný koeficient nižší ako $10 \text{ litrov} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, daná chemická látka pravdepodobne nie je fotoreaktívna. Takúto chemickú látku nie je potrebné testovať testom fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ani iným biologickým testom na nepriaznivé fotochemické účinky (1), (5). Pozri aj prílohu 1.

Nedávno boli vyhodnotené spoľahlivosť a význam testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (6), (7), (8), (9). Ukázalo sa, že test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je prediktívny, pokiaľ ide o akútne fototoxické účinky na zvieratá a ľudí *in vivo*. Test nie je určený na predikciu ďalších nepriaznivých účinkov, ktoré môžu vzniknúť zo spoločného pôsobenia chemickej látky a svetla, napr. neumožňuje skúmať fotogenotoxicitu, fotoalergiu ani fotokarcinogenitu, ani neumožňuje posúdiť fototoxický potenciál. Okrem toho tento test nie je určený na riešenie nepriamych mechanizmov fototoxicity ani účinkov metabolitov testovanej látky alebo účinkov zmesí.

Keďže použitie metabolizujúcich systémov je všeobecnou požiadavkou pri všetkých testoch *in vitro* určených na predikciu genotoxického a karcinogénneho potenciálu, v prípade fototoxikológie existujú iba zriedkavé prípady, keď je potrebná metabolická transformácia na to, aby chemická látka pôsobila ako fototoxín *in vivo* alebo *in vitro*. Nepokladá sa teda za potrebné ani za vedecky opodstatnené, aby sa tento test vykonával s použitím systému metabolickej aktivácie.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Intenzita ožiarenia: intenzita ultrafialového (UV) alebo viditeľného svetla dopadajúceho na povrch, meraná v jednotkách W/m^2 alebo mW/cm^2 .

Dávka svetla: množstvo (= intenzita $\times$ čas) ultrafialového (UV) alebo viditeľného žiarenia dopadajúceho na povrch a vyjadreného v jouloch (= $\text{W} \times \text{s}$) na plochu povrchu, napr. J/m^2 alebo J/cm^2 .

Vlnové pásma UV svetla: označenia odporúčané CIE (Medzinárodná komisia pre osvetlenie – Commission Internationale de L'Eclairage) sú tieto: UVA (315 – 400 nm), UVB (280 – 315 nm) a UVC (100 – 280 nm). Používajú sa aj iné označenia; rozlíšenie medzi UVB a UVA sa často kladie na 320nm a UVA možno rozdeliť na UV-A1 a UV-A2 s hranicou približne na 340 nm.

Životaschopnosť buniek: parameter, ktorým sa meria celková aktivita bunkovej populácie (napr. absorbovanie vitálneho farbiva neutrálneho červeného do bunkových lyzozómov), ktorý v závislosti od posledného merania a použitej testovacej metódy je v korelačnom vzťahu s celkovým počtom buniek a/alebo ich vitalitou.

Relatívna životaschopnosť buniek: životaschopnosť buniek vyjadrená vo vzťahu k rozpúšťadlovým (negatívnym) kontrolným vzorkám, ktoré boli odoberané počas celého testovacieho postupu (buď +Irr, alebo -Irr), ale bez aplikovania testovanej chemickej látky.

PIF (Photo-Irritation-Factor – koeficient svetelnej dráždivosti): koeficient vytvorený porovnaním dvoch rovnako účinných cytotoxických koncentrácií (IC_{50}) testovanej chemickej látky získanej za neprítomnosti (-Irr) a za prítomnosti (+Irr) necytotoxického ožiarenia UV A/vis svetlom.

IC₅₀: koncentrácia testovanej chemickej látky, ktorou sa životaschopnosť bunky zníži o 50 %.

MPE (*Mean-Photo-Effect* – **stredný svetelný účinok**): veličina odvodená z matematickej analýzy priebehu kriviek odozvy na koncentráciu, získaných za neprítomnosti (–Irr) a za prítomnosti (+Irr) necytotoxického žiarenia UV A/vis svetlom.

Fototoxická: akútna toxická odozva, ktorá je vyvolaná po prvej expozícii kože určitým chemikáliám a následnej expozícii svetlu, alebo ktorá je podobne vyvolaná ožiarením kože po systémovom podávaní chemickej látky.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je založený na porovnaní cytotoxicity chemickej látky pri testovaní s expozíciou necytotoxického dávky simulovaného slnečného svetla a bez tejto expozície. Cytotoxicita je v tomto teste vyjadrená ako koncentračne závislé zníženie absorpcie vitálneho farbiva neutrálneho červeného (NR), meraná 24 hodín po pôsobení testovanej chemickej látky a ožiarovania (10). NR je slabé kationové farbivo, ktoré ľahko preniká cez bunkové membrány nedifúznym spôsobom, pričom sa akumuluje vnútrobunkovo v lyzozómoch. Zmeny bunkového povrchu citlivej lyzozomálnej membrány vedú k lámavosti lyzozómov a iným zmenám, ktoré sa postupne stávajú nevratnými. Také zmeny vyvolané pôsobením xenobiôtik vedú k zníženiu absorpcie a viazaniu NR. Preto je možné rozlišovať medzi životaschopnými a poškodenými alebo mŕtvymi bunkami, čo je základom tohto testu.

Bunky Balb/c 3T3 sa kultivujú počas 24 hodín, aby sa vytvorili monomolekulové vrstvy. Dve 96-jamkové doštičky na jednu testovanú chemickú látku sa 1 hodinu predinkubujú ôsmimi rôznymi koncentraciami testovanej látky. Potom sa jedna z týchto dvoch doštičiek exponuje najvyššej necytotoxické dávke ožiarovania, kým druhá doštička sa udržiava v tme. V oboch doštičkách sa potom pôsobiacie médium nahradí kultivačným médium a po ďalších 24 hodinách inkubácie sa stanoví životaschopnosť buniek pomocou absorpcie neutrálneho červeného. Životaschopnosť buniek sa vyjadruje ako percentuálny podiel vzhľadom na výsledok neupravenej rozpúšťadlovej kontrolnej vzorky a vypočíta sa pre každú z testovacích koncentrácií. Na predikciu fototoxického potenciálu sa porovnávajú odozvy koncentrácií získané pri ožiarení a bez ožiarovania, zvyčajne na úrovni IC₅₀, t. j. pri koncentrácii, ktorou sa znižuje životaschopnosť buniek na 50 % v porovnaní s neupravovanými kontrolnými vzorkami.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. Prípravné práce

1.4.1.1. Bunky

Pri validačnej štúdii sa použila permanentná myšia fibroplastová bunková línia Balb/c 3T3, klon 31, buď z banky kultúr amerického typu (ATCC – American Type Culture Collection), Manassas, Virgínia, USA, alebo z európskej banky bunkových kultúr (ECACC – European Collection of Cell Cultures), Salisbury, grófstvo Wiltshire, Spojené Kráľovstvo, a preto sa odporúča získať bunky z riadne kvalifikovaného depozitára buniek. Pri tom istom testovacom procese sa môžu použiť iné bunky alebo bunkové línie, ak sú kultivačné podmienky prispôbené špecifickým potrebám buniek, ale musí byť preukázaná ich rovnocennosť.

Bunky by sa mali pravidelne kontrolovať, či nedošlo k mykoplasmovej kontaminácii a použiť iba vtedy, ak sa kontaminácia nezistí (11).

Je dôležité pravidelne kontrolovať citlivosť buniek na UV podľa postupu kontroly kvality opísaného v tejto metóde. Keďže citlivosť buniek na UVA môže s počtom pasáží stúpať, mali by sa použiť bunky Balb/c 3T3 s najnižším dosiahnuteľným počtom pasáží, najlepšie menej ako 100. (Pozri 1.4.2.2.2. a prílohu 2.)

1.4.1.2. Média a kultivačné podmienky

Na rutinné pasážovanie buniek a počas testovacieho postupu by sa mali používať vhodné kultivačné média a inkubačné podmienky, napr. pre bunky Balb/c 3T3 sú to DMEM (Dulbeccova modifikácia Eagleovho média – Dulbecco's Modified Eagle's Medium) obohatenú 10 % sérom z novonarodeného teľaťa, 4 mM glutamínom, penicilínom (100 IU), a streptomycínom (100 µg/ml), a o inkubáciu v zvlhčenom prostredí pri 37 °C s 5 – 7,5 % CO₂ v závislosti od použitého pufra (pozri časť 1.4.1.4 druhý pododsek). Osobitne dôležité je kultivačnými podmienkami bunky zabezpečiť, aby bunkový časový cyklus bol v rámci bežného doterajšieho rozsahu pre použité bunky alebo bunkovú líniu.

1.4.1.3. Príprava kultúr

Bunky zo zmrazených kmeňových kultúr sa nasadia do kultivačného média v primeranej hustote a pred použitím v teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa najmenej raz subkultivujú.

Bunky používané pri teste fototoxicity sa nasadia do kultivačného média v primeranej hustote tak, aby do konca testu nedošlo ku konfluencii kultúr, t. j. do okamihu, keď sa po 48 hodinách od nasadenia stanovuje životaschopnosť buniek. V prípade buniek Balb/c 3T3, ktoré sa pestujú v 96-jamkových doštičkách, sa odporúča hustota nasadenia 1×10^4 buniek na jamku.

Pre každú testovanú chemickú látku sa bunky rovnakým spôsobom nasadia do dvoch samostatných 96-jamkových doštičiek, ktoré sa potom súbežne podrobia celému testovaciemu postupu za rovnakých kultivačných podmienok, s výnimkou času, keď sa jedna z doštičiek ožiari (+Irr) a druhá sa ponechá v tme (–Irr).

1.4.1.4 Príprava testovanej látky

Testované látky musia byť tesne pred použitím čerstvo pripravené, pokiaľ sa však údajmi nepreukáže ich stabilita pri skladovaní. Odporúča sa, aby sa každá manipulácia s chemikáliami a počiatočné ošetrenie buniek vykonávali za takých svetelných podmienok, ktoré by pred ožiarovaním zabránili fotoaktívácii alebo degradácii testovanej látky.

Testované chemické látky sa rozpustia v pufrovaných soľných roztokoch, napr. v Earlovom rovnovážnom soľnom roztoku (EBSS), alebo v iných fyziologicky rovnovážnych pufrovaných roztokoch, ktoré nesmú obsahovať bielkovinové zložky, zložky absorbujúce svetlo, (napr. pH indikátory farby a vitamíny), aby sa predišlo interferencii počas ožarovania. Keďže bunky sa počas ožarovania držia približne 50 minút mimo inkubátora v atmosfére obsahujúcej CO_2 , je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo alkalizácii. Ak sa používajú slabé pufre ako napr. EBSS, možno to dosiahnuť inkubovaním buniek v atmosfére obsahujúcej 7,5 % CO_2 . Ak sú bunky inkubované v atmosfére obsahujúcej iba 5 % CO_2 , mal by sa zvoliť silnejší pufer.

Testované chemické látky s obmedzenou rozpustnosťou vo vode by mali byť rozpustené vo vhodnom rozpúšťadle. Ak sa použije rozpúšťadlo, musí byť prítomné v konštantnom objeme vo všetkých kultúrach, t. j. v negatívnych (rozpušťačových) kontrolných vzorkách, ako aj vo všetkých koncentráciách testovanej chemickej látky a pri tejto koncentrácii musí byť necytotoxické. Koncentrácie testovanej chemickej látky by sa mali zvoliť tak, aby sa zabránilo zrážaniu alebo zakaleniu roztoku.

Odporúčanými rozpúšťadlami sú dimetylsulfoxid (DMSO) a etanol (ETOH). Vhodné môžu byť aj iné rozpúšťadlá s nízkou cytotoxicitou. Všetky rozpúšťadlá by sa pred použitím mali posúdiť z hľadiska ich špecifických vlastností, napr. reakcie s testovanou chemickou látkou, zmierňovania fototoxického účinku, vlastností v súvislosti so zachytávaním radikálov a/alebo chemickej stability v rozpúšťadle.

Rozpúšťanie sa môže uľahčiť vírivým miešaním a/alebo pôsobením ultrazvuku, a/alebo zahriatím na príslušné teploty, pokiaľ sa to nedotkne stability testovanej chemickej látky.

1.4.1.5 Podmienky ožarovania

1.4.1.5.1 Zdroj svetla

Pri testovaní fototoxicity je rozhodujúcim faktorom výber vhodného svetelného zdroja a filtrov. Svetlo v pásme UVA a vo viditeľnom pásme sa zvyčajne spája s fototoxickými reakciami *in vivo* (3), (12), zatiaľ čo žiarenie v pásme UVB je menej relevantné, ale je veľmi cytotoxické; cytotoxicita sa zvyšuje 1 000-krát pri posune vlnovej dĺžky z 313 na 280 nm (13). Kritériá výberu vhodného svetelného zdroja musia zahŕňať požiadavku, aby svetelný zdroj vysielať svetlo s vlnovými dĺžkami, ktoré testovaná chemická látka absorbuje (absorpčné spektrum) a aby dávka svetla (dosiahnuteľná v priebehu primeraného expozičného času) bola dostatočná na detekciu známych fotocytotoxických chemických látok. Ďalej, použité vlnové dĺžky a dávky by nemali mať neprimerane zhubné účinky na testovací systém, napr. emisiou tepla (infračervená oblasť).

Za optimálny zdroj umelého svetla sa pokladá simulácia slnečného svetla pomocou solárnych simulátorov. Distribúcia ožarovacieho výkonu filtrovaného solárneho simulátora by mala byť blízka vonkajšiemu dennému svetlu uvedenému v (14). V solárnych simulátoroch sa používajú jednak xenónové výbojky, a jednak vysokotlakové ortuťovo-kovové halogénové výbojky (15). Druhá z nich má tú výhodu, že vyžaruje menej tepla a je lacnejšia, ale slnečné svetlo napodobňuje menej dokonale než xenónová výbojka. Pretože všetky solárne simulátory vyžarujú významné množstvá UVB žiarenia, mali by byť vhodným spôsobom filtrované s cieľom stlmiť vysoko cytotoxické vlnové dĺžky UVB. Vzhľadom na to, že bunkové kultúry plastových materiálov obsahujú UV stabilizátory, spektrum by sa malo merať pomocou rovnakého druhu veka 96-jamkovej doštičky, ako sa bude používať pri skúške. Bez ohľadu na opatrenia prijaté na stlmenie častí spektra pomocou filtrovania alebo filtračnými účinkami zariadenia, ktorým sa nemožno vyhnúť, spektrum zaznamenané pod týmito filtermi by sa nemalo líšiť od normalizovaného denného svetla vo vonkajšom prostredí (14). Príklad distribúcie spektrálneho vyžarovania filtrovaného solárneho simulátora použitého vo validačnej štúdii testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa uvádza v literatúre (8), (16). Pozri aj prílohu 2 obrázok 1.

1.4.1.5.2 Dozimetria

Intenzita svetla (intenzita ožarovania) by sa mala pravidelne kontrolovať pred každým testom fototoxicity s použitím vhodného širokopásmového UV-merača. Táto intenzita by sa mala merať cez rovnaký druh veka 96-jamkovej doštičky, aký sa použije počas skúšky. Tento UV-merač musí byť kalibrovaný na zdroj. Funkčnosť UV-merača by sa mala kontrolovať a na tento účel sa odporúča použiť druhý, referenčný UV-merač rovnakého

druhu s totožnou kalibráciou. V ideálnom prípade by sa mal v dlhších časových odstupoch použiť spektorradiometer na zmeranie spektrálneho vyžarovania filtrovaného svetelného zdroja a na kontrolu kalibrácie širokopásmového UV-merača.

Dávka 5 J/cm^2 (meraná v pásme UVA) bola stanovená ako necytotoxická pre bunky Balb/c 3T3 a ako dostatočne silná na excitáciu chemických látok tak, aby vyvolávali fototoxické reakcie (6), (17), napr. na dosiahnutie 5 J/cm^2 počas 50 minút bolo vyžarovanie upravené na hodnotu $1,7 \text{ mW/cm}^2$. Pozri prílohu 2 obrázok 2. Ak sa používa iná bunková línia alebo odlišný svetelný zdroj, je možné, že dávka vyžarovania sa bude musieť kalibrovať tak, aby sa mohol zvoliť režim dávkovania, ktorý nebude mať zhubný účinok na bunky, ale bude dostatočný na excitovanie štandardných fototoxínov. Čas svetelnej expozície sa vypočíta týmto spôsobom:

$$t \text{ (min)} = \frac{\text{dávka ožiarenia (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{ožiarenie (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2. Testovacie podmienky

1.4.2.1. Koncentrácie testovanej látky

Rozmedzia koncentrácií chemickej látky testovanej so svetlom (+Irr) a bez svetla (-Irr) by mali byť vhodne stanovené v rámci experimentov na zistenie rozsahu dávky. Môže byť užitočné posúdiť rozpustnosť na začiatku a po 60 minútach (alebo podľa toho, aký čas úpravy sa používa), keďže rozpustnosť sa môže meniť v čase alebo v priebehu expozície. Hodnota pH bunkových kultúr s pridanou testovanou chemickou látkou mala byť v rozsahu 6,5 – 7,8, aby bola vylúčená toxicita vyvolaná nevhodnými kultivačnými podmienkami alebo vysoko kyslými či zásaditými chemickými látkami.

Najvyššia koncentrácia testovanej látky by sa mala byť zlučiteľná s fyziologickými testovacími podmienkami, napr. mal by byť vylúčený osmotický stres a stres z pH. V závislosti od testovanej chemickej látky môže byť potrebné vziať do úvahy ďalšie fyzikálno-chemické vlastnosti ako sú faktory obmedzujúce najvyššiu testovaciu koncentráciu. V prípade relatívne nerozpustných látok, ktoré nie sú toxické pri koncentráciách až do bodu nasýtenia, mala by sa testovať najvyššia dosiahnuteľná koncentrácia. Vo všeobecnosti by sa malo vylúčiť zrážanie testovanej chemickej látky pri akýchkoľvek testovacích koncentráciách. Maximálna koncentrácia testovanej látky by nemala presiahnuť $1\,000 \text{ µg/ml}$; osmolarita by nemala presiahnuť 10 mmol . Mali by sa použiť geometrické rady riedenia 8 koncentrácií testovanej látky s konštantným faktorom riedenia (pozri časť 2.1 druhý odsek).

Ak existujú údaje (z experimentu na zistenie rozsahu), že testovaná chemická látka nie je cytotoxická až do limitnej koncentrácie pri pokuse v tme (-Irr), ale je vysoko cytotoxická pri ožiarení (+Irr), rozsahy koncentrácií, ktoré sa musia zvoliť na pokus (+Irr), sa môžu líšiť od rozsahov zvolených pre (-Irr) pokus, aby sa splnila požiadavka dostatočnej kvality údajov.

1.4.2.2. Kontroly

1.4.2.2.1. Radiačná citlivosť buniek, zistenie doterajších údajov:

Citlivosť buniek na svetelný zdroj by sa mala pravidelne kontrolovať (približne každý piata pasáž) pomocou posúdenia ich životaschopnosti po expozícii narastajúcim dávkam ožiarenia. Pri tomto posudzovaní by sa malo použiť niekoľko dávok ožiarenia vrátane úrovni podstatne vyšších, ako sú úrovne používané pri teste fototoxicity 3T3 NRU. Tieto dávky sú najľahšie stanoviteľné meraniami UV častí svetelného zdroja. Bunky sa nasadia pri hustote používanej pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* a ožarujú sa nasledujúci deň. Životaschopnosť buniek sa potom stanoví o deň neskôr s použitím absorpcie neutrálnej červene. Malo by preukázať, že výsledná najvyššia necytotoxická dávka (napr. v rámci validačnej štúdie: 5 J/cm^2 [UVA]) bola dostatočná na správnu klasifikáciu referenčných chemických látok (tabuľka 1).

1.4.2.2.2. Radiačná citlivosť, kontrola prebiehajúceho testu:

Test spĺňa kritériá kvality, keď ožiarené negatívne/rozpúšťadlové kontrolné vzorky vykazujú životaschopnosť vyššiu ako 80 % v porovnaní s experimentom v tme s neožiarenou negatívnou/rozpúšťadlovou kontrolnou vzorkou.

1.4.2.2.3. Životaschopnosť kontrolných vzoriek rozpúšťadla:

Absolútna optická hustota ($\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$) neutrálnej červene extrahovanej z kontrolných vzoriek rozpúšťadla udáva, či 1×10^4 buniek nasadených do každej jamky vyrástlo v bežnom čase zdvojnásobenia počas dvoch dní skúšky. Test spĺňa kritériá prijateľnosti, ak je stredná hodnota $\text{OD}_{540 \text{ NRU}}$ pre neexponované vzorky $\geq 0,4$ (t. j. približne dvadsaťnásobok absorpcie rozpúšťadlového pozadia).

1.4.2.2.4. Pozitívna kontrola:

Známa fototoxická chemická látka sa testuje súbežne s každým testom fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*. Odporúča sa chlórpromazín (CPZ). Pre CPZ testovaný podľa štandardného protokolu pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa definovali tieto kritériá prijateľnosti testu: pre CPZ ožiarený (+Irr): $IC_{50} = 0,1$ až $2,0 \mu\text{g g/ml}$, pre CPZ neožiarený (-Irr): $IC_{50} = 7,0$ až $90,0 \mu\text{g/ml}$. Koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) by mal byť > 6 . Mala by sa monitorovať predchádzajúca funkčnosť tejto pozitívnej kontroly.

Namiesto chlórpromazínu sa môžu používať ako súbežné pozitívne porovnávacie vzorky aj iné fototoxické chemické látky, vhodné pre chemickú triedu alebo vlastnosti rozpustnosti vyhodnocovanej chemickej látky.

1.4.3. Postup testovania (6), (7), (8), (16), (17):

1.4.3.1. Prvý deň:

Do obvodových jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky tkanivových kultúr sa odpipetuje $100 \mu\text{l}$ kultivačného média (= slepé vzorky). Do zostávajúcich jamiek sa nadávkuje $100 \mu\text{l}$ bunkovej suspenzie s koncentráciou 1×10^5 buniek/ml do kultivačného média (= 1×10^4 buniek/jamka). Pre každú sériu koncentrácií jednotlivých testovanej látky a pre rozpúšťadlové a pozitívne porovnávacie vzorky by sa mali pripraviť dve doštičky.

Bunky sa inkubujú 24 hodín (pozri časť 1.4.1.2), až kým nevytvoria polosplývajúcu monomolekulovú vrstvu. Táto doba inkubácie umožňuje regeneráciu buniek, ich prilnavosť a exponenciálny rast.

1.4.3.2. Druhý deň:

Po inkubácii sa kultivačné médium z buniek dekantuje a opatrne premyje so $150 \mu\text{l}$ pufrovaného roztoku použitého na inkubáciu. Pridá sa $100 \mu\text{l}$ pufira obsahujúceho vhodnú koncentráciu testovanej chemickej látky alebo rozpúšťadla (kontrola rozpúšťadlom). Aplikuje sa 8 rôznych koncentrácií testovanej chemickej látky. Bunky sa testovanou chemickou látkou inkubujú v tme počas 60 minút (pozri časť 1.4.1.2 a druhý odsek v časti 1.4.1.4).

Vyberie sa jedna z dvoch doštičiek pripravených na každú sériu koncentrácií testovanej látky a porovnávacích vzoriek, spravidla náhodne, na stanovenie cytotoxicity (-Irr) (t. j. kontrolná doštička), a jedna (expozíčná doštička) na stanovenie fotocytotoxicity (+Irr).

Na vykonanie expozície +Irr sa bunky pri izbovej teplote počas 50 minút ožarujú cez veko 96-jamkovej doštičky najvyššou dávkou žiarenia, ktorá je necytotoxická (pozri taktiež prílohu 2). Neožiarené doštičky (-Irr) sa uchovávajú pri izbovej teplote v tmavej škatuli 50 minút (= doba expozície účinkom svetla).

Testovací roztok sa dekantuje a dôkladne dvakrát premyje so $150 \mu\text{l}$ pufrovaného roztoku použitého na inkubáciu, ale neobsahujúceho testovaný materiál. Pufer sa nahradí kultivačným médiom a inkubuje sa (pozri časť 1.4.1.2) cez noc (18 – 22 hodín).

1.4.3.3. Tretí deň:

1.4.3.3.1. Vyhodnotenie mikroskopom

Bunky by sa mali preskúmať pomocou mikroskopu s fázovým kontrastom vzhľadom na ich rast, morfológiu a integritu monomolekulovej vrstvy. Zmeny v morfológii bunky a účinky na rast bunky by sa mali zaznamenať.

1.4.3.3.2. Test absorpcie neutrálnej červene

Bunky sa premyjú so $150 \mu\text{l}$ predhriateho pufira. Premývací roztok sa odstráni jemným poklepávaním. Pridá sa $100 \mu\text{l}$ neutrálnej červene s koncentráciou $50 \mu\text{g/ml}$ neutrálnej červene (NR) (N8, N8, 3-trimetyl-2, 8-fenazíndiamín monohydrochlorid, EINECS číslo 209-035-8; CAS číslo 553-24-2; C.I. 50040) do média bez séra (16) a 3 hodiny sa inkubuje spôsobom opísaným v časti 1.4.1.2. Po inkubácii sa médium NR odstráni a bunky sa premyjú so $150 \mu\text{l}$ pufru. Ten sa dekantuje a prebytočný pufer sa odstráni odsátím alebo odstredením.

Pridá sa presne $150 \mu\text{l}$ desorbčného roztoku NR (čerstvo pripravený v zložení 49 dielov vody + 50 dielov etanolu + 1 diel kyseliny octovej).

Mikrotitračná doštička sa jemne trepe na trepačke mikrotitračných doštičiek počas 10 minút, až do vyextrahovania a NR z buniek a vytvorenia homogénneho roztoku.

Spektrofotometrom sa zmeria optická hustota extraktu NR pri 540 nm, pričom sa na porovnanie použije slepá skúška. Údaje sa uložia vo vhodnom formáte elektronického súboru na účely následnej analýzy.

2. ÚDAJE

2.1. KVALITA A KVANTITA ÚDAJOV

Údaje z testovania by mali umožniť zmysluplnú analýzu závislosti odozvy na koncentrácii získanej pri ožarovaní a bez neho, a pokiaľ je to možné, koncentrácii testovanej chemickej látky, pri ktorej je životaschopnosť buniek znížená na 50 % (IC_{50}). Ak sa zistí cytotoxicita, mal by sa rozsah koncentrácií a interval medzi jednotlivými koncentráciami nastaviť tak, aby to umožnilo zladit' krivku s experimentálnymi údajmi.

Pre jasne pozitívne ako aj pre jasne negatívne výsledky (pozri časť 2.3 prvý odsek) môže postačovať primárny experiment podporený jedným alebo viacerými predbežnými experimentmi na stanovenie rozsahu dávok.

Nepreukazné, hraničné alebo nejasné výsledky by sa mali objasniť ďalším testovaním (pozri aj časť 2.4 druhý odsek). V takýchto prípadoch by sa mala zvážiť modifikácia experimentálnych podmienok. Medzi experimentálne podmienky, ktoré by sa možno mohli modifikovať, patrí rozsah či odstup koncentrácií, čas predinkubácie a čas expozície ožiareniu. Pre chemické látky nestabilné vo vode môže byť vhodný kratší expozičný čas.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Na umožnenie vyhodnotenia údajov sa môže vypočítať koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) alebo stredný svetelný účinok (MPE).

Pri výpočte parametrov fotocytotoxicity (pozri ďalej) sa súbor diskrétnych hodnôt závislost odozvy na koncentrácii musí aproximovať s použitím vhodnej spojitej krivky koncentračnej závislosti odozvy (vhodným modelom). Zladenie krivky s údajmi sa zvyčajne vykonáva metódou nelineárnej regresie (18). Na posúdenie vplyvu variability údajov na zladenú krivku sa odporúča samozavádzací postup (*bootstrap*).

Koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) sa vypočíta pomocou tohto vzorca:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Ak IC_{50} za prítomnosti alebo za neprítomnosti svetla nemožno vypočítať, nemožno pre testovaný materiál stanoviť PIF. Stredný svetelný účinok (MPE) je založený na porovnaní úplných kriviek závislosti odozvy na koncentrácii (19). Je definovaný ako vážený priemer celého reprezentatívneho súboru hodnôt svetelného účinku.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Svetelný účinok PE_C pri každej koncentrácii C sa definuje ako súčin účinku odozvy RE_C a účinku koncentrácie DE_C , t. j. $PE_C = RE_C \times DE_C$. Účinok odozvy RE_C predstavuje rozdiel medzi odozvami pozorovanými za prítomnosti a za neprítomnosti svetla, t. j. $RE_C = R_C(-Irr) - R_C(+Irr)$. Účinok dávky je daný vzťahom

$$DE_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

pričom C^* predstavuje koncentráciu ekvivalencie, t. j. koncentráciu, pri ktorej je odozva na $+Irr$ rovnaká ako odozva na $-Irr$ pri koncentrácii C . Ak C^* nemožno stanoviť, pretože hodnoty odozvy krivky $+Irr$ sú sústavne vyššie alebo nižšie ako hodnoty $R_C(-Irr)$, tak hodnota účinku dávky sa stanoví na hodnotu 1. Váhové faktory w_i sú dané najvyššou hodnotou odozvy, t. j. $w_i = \max\{R_i(+Irr), R_i(-Irr)\}$. Súradnicová sieť pre koncentrácie C ; sa zvolí tak, aby v koncentračnom intervale definovanom hodnotami koncentrácií použitými v rámci experimentu bol rovnaký počet bodov. Výpočet MPE je obmedzený na maximálnu hodnotu koncentrácie, pri ktorej aspoň jedna z dvoch kriviek stále vykazuje hodnotu odozvy najmenej 10 %. Ak je táto maximálna koncentrácia vyššia ako najvyššia koncentrácia použitá v rámci $+Irr$ experimentu, zvyšná časť $+Irr$ krivky sa nastaví na hodnotu odozvy „0“. V závislosti od toho, či je, alebo nie je MPE hodnota vyššia ako riadne zvolená hraničná hodnota ($MPE_C 0,15$), chemická látka je alebo nie je klasifikovaná ako fototoxická.

Program na výpočet PIF a MPE je dostupný v (20).

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Na základe validačnej štúdie (8) sa pri testovanej látke s $PIF < 2$ alebo $MPE < 0,1$ predikuje: „žiadna fototoxická“. $PIF > 2$ a < 5 alebo $MPE > 0,1$ a $< 0,15$ predikuje: „pravdepodobná fototoxická“ a $PIF > 5$ alebo $MPE > 0,15$ predikuje: „fototoxická“.

Pre každé laboratórium zavádzajúce po prvýkrát túto skúšku by sa mali referenčné materiály uvedené v tabuľke 1 testovať pred testovaním testovaných chemických látok na posúdenie fototoxicity. Hodnoty PIF alebo MPE by sa mali približovať hodnotám uvedeným v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Chemický názov	Číslo EINECS	Číslo CAS	PIF	MPE	Najvyššia úroveň absorpcie	Rozpúšťadlo ⁽¹⁾
aminodaron HCL	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (rameno)	etanol
chloropromazín HCL	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
protoporfyrín IX, dvojsodný	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-histidín		[7006-35-1]	bez PIF	0,05-0,10	211 nm	voda
hexachlorofén	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (rameno)	etanol
laurylsulfát sodný	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00-0,05	bez absorpcie	voda

⁽¹⁾ Rozpúšťadlo použité na meranie absorpcie.

2.4. INTERPRETÁCIA ÚDAJOV

Ak sa fototoxické účinky pozorujú iba pri najvyššej testovacej koncentrácii, (najmä v prípade testovaných chemických látok rozpustných vo vode) na posúdenie nebezpečnosti môžu byť potrebné ďalšie odhady. Tie sa môžu týkať údajov o absorpcii kožou a akumulácii chemikálie v koži a/alebo údajov z iných testov, napr. z testovania chemickej látky na zvieracej alebo ľudskej koži *in vitro*, alebo na modeloch kože.

Ak sa nepreukáže toxicita (+Irr a –Irr) a ak sú koncentrácie, ktoré sa mohli testovať, obmedzené malo rozpustnosťou, tak sa môže spochybniť kompatibilita testovanej látky s testom a malo by sa uvažovať o potvrdzujúcom testovaní s použitím napr. iného modelu.

3. SPRÁVY**SPRÁVA O TESTE**

Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

- identifikačné údaje, bežné generické názvy a čísla IUPAC a CAS, ak sú známe,
- fyzikálna povaha a čistota,
- fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie,
- absorpčné spektrum UV/vis,
- stabilita a fotostabilita, ak sú známe.

Rozpúšťadlo:

- zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,
- rozpustnosť testovanej chemickej látky v rozpúšťadle,
- percentuálny podiel rozpúšťadla prítomného v aplikačnom médiu.

Bunky:

- typ a zdroj buniek,
- neprítomnosť mykoplazmy,
- počet bukových pasáží, ak je známy,
- radiačná citlivosť buniek stanovená ožarovacím zariadením použitým pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

Testovacie podmienky (1); *inkubácia pred aplikáciou a po nej*:

- typ a zloženie kultivačného média,
- inkubačné podmienky (koncentrácia CO₂; teplota; vlhkosť),
- trvanie inkubácie (predinkubačné kroky; poinkubačné kroky).

Testovacie podmienky (2); *aplikácia chemickej látky*:

- zdôvodnenie výberu koncentrácií testovaných chemických látok používaných pri ožarovaní a bez neho,
- v prípade obmedzenej rozpustnosti testovanej chemickej látky a pri neprítomnosti cytotoxicity: zdôvodnenie najvyššej testovanej koncentrácie,
- typ a zloženie aplikačného média (pufrovaný solný roztok),

- trvanie aplikácie chemickej látky.

Testovacie podmienky (3); ožarovanie:

- zdôvodnenie výberu použitého svetelného zdroja,
- výrobca a typ svetelného zdroja a rádiometra,
- spektrálna charakteristika žiarenia svetelného zdroja,
- transmisné a absorpčné charakteristiky použitého filtra (použitých filtrov),
- charakteristiky rádiometra a podrobnosti o jeho kalibrácii,
- vzdialenosť svetelného zdroja od testovacieho systému,
- intenzita UVA ožiarovania v tejto vzdialenosti, vyjadrená v mW/cm^2 ,
- trvanie expozície UV/vis svetlu,
- dávka UVA (ožiarenie x čas) vyjadrená v J/cm^2 ,
- teplota bunkových kultúr počas ožarovania a bunkových kultúr súbežne uchovávaných v tme.

Testovacie podmienky (4); test životaschopnosti príjmom neutrálnej červene:

- zloženie pôsobiaceho média neutrálnej červene,
- trvanie inkubácie neutrálnej červene,
- inkubačné podmienky (koncentrácia CO_2 ; teplota; vlhkosť),
- podmienky extrakcie neutrálnej červene (extrakčné činidlo; trvanie),
- vlnová dĺžka použitá na spektrofotometrické odčítanie optickej hustoty neutrálnej červene,
- druhá vlnová dĺžka (referenčná), ak sa použije,
- obsah slepého roztoku pre spektrofotometriu, ak sa použije.

Výsledky:

- životaschopnosť bunky získaná pri každej koncentrácii testovanej chemickej látky, vyjadrená v percentách strednej životaschopnosti súbežných kontrolných vzoriek rozpúšťadla,
- krivky koncentračnej závislosti odozvy (koncentrácia testovanej chemickej látky proti relatívnej životaschopnosti bunky) získané pri súbežných +Irr a -Irr pokusoch,
- analýza kriviek koncentračnej závislosti odozvy: ak je to možné, tak približný výpočet hodnôt IC_{50} (+Irr) a IC_{50} (-Irr),
- porovnanie obidvoch kriviek koncentračnej závislosti na odozvu získaných s ožarovaním a bez neho, a to buď vypočítaním koeficientu svetelnej dráždivosti (PIF), alebo vypočítaním stredného svetelného účinku (MPE),

- kritériá prijateľnosti testu; súbežná kontrola rozpúšťadlom,
- absolútna životaschopnosť (optická hustota extraktu neutrálnej červene) ožiarených a neožiarených buniek,
- doterajšie údaje pre negatívnu kontrolnú vzorku a kontrolnú vzorku rozpúšťadla; stredné hodnoty a smerodajné odchýlky,
- kritériá prijateľnosti testu; súbežná pozitívna kontrola,
- IC₅₀ (+Irr) a IC₅₀ (–Irr) a PIF/MPE pozitívnej kontrolnej chemickej látky,
- doterajšie údaje pozitívnej kontrolnej chemickej látky: IC₅₀ (+Irr) a IC₅₀ (–Irr) a PIF/MPE; stredné hodnoty a smerodajné odchýlky.

Rozbor výsledkov

Záver

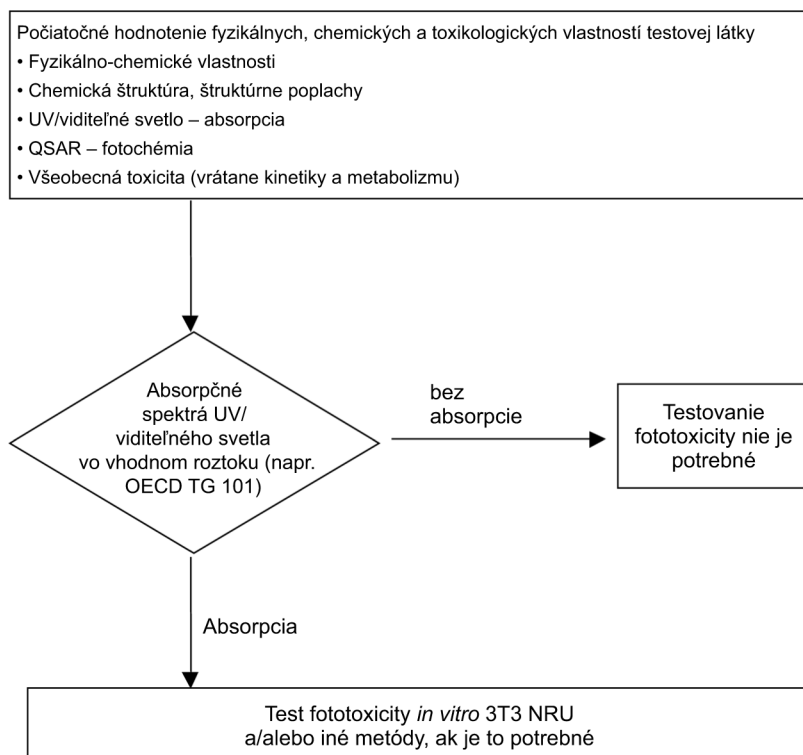
4. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (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., Pfannenbecker, 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-31st October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
- (10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119 – 124.

-
- (11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225 – 237.
- (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 Illumination, 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.htm 1

Príloha 1

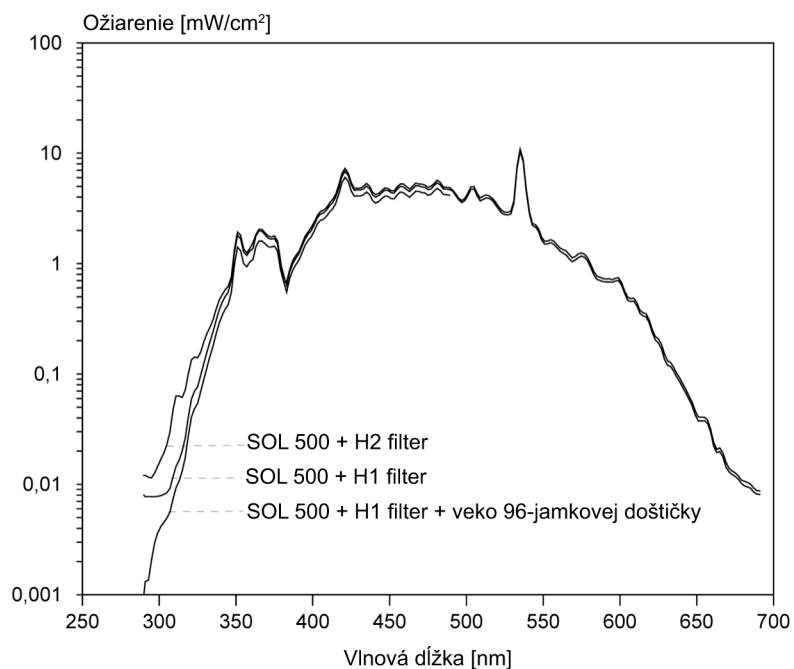
Úloha testu fototoxicity 3T3 NRU v sekvenčnom prístupe na testovanie fototoxicity chemických látok



Príloha 2

Obrázok 1

Spektrálna distribúcia výkonu solárneho simulátora s filtrom



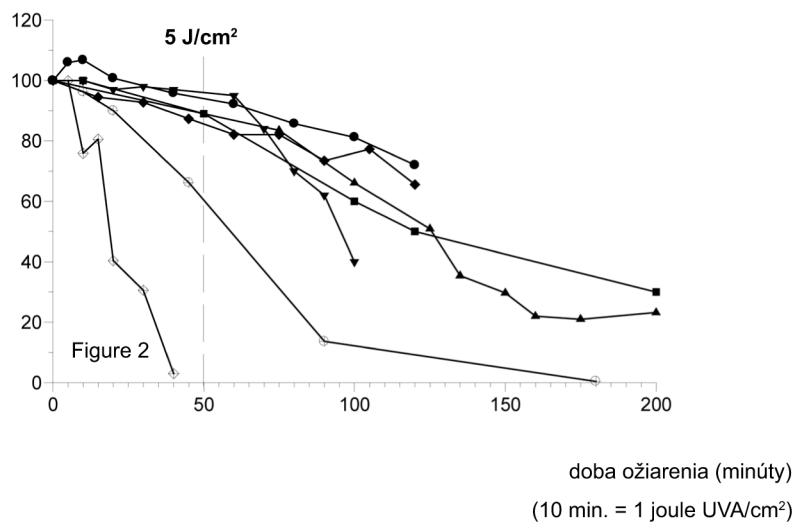
(pozri časť 1.4.1.5 druhý odsek)

Na obrázku 1 je uvedený príklad prijateľnej spektrálnej distribúcie intenzity žiarenia solárneho simulátora s filtrom. Je zo zdroja dopovaného kovovým halogenidom, použitého pri validačnej štúdii skúšky fototoxicity 3T3 NRU (6), (8), (17). Je znázornený účinok dvoch rôznych filtrov a účinok ďalšieho filtrovania veka 96-jamkovej doštičky na bunkové kultúry. Filter H2 sa použil iba pri testovacích systémoch tolerantných k vyššej dávke UVB (test na modeli kože a foto-hemolytický test červených krviniek). Pri teste 3T3 NRU sa použil filter H1. Na obrázku je znázornené, že dodatočný filtrovací účinok veka doštičky je pozorovaný predovšetkým v oblasti UVB, pričom vekom preniká ešte stále dostatočné množstvo UVB zo spektra intenzity žiarenia na excitovanie chemických látok absorbujúcich v oblasti UVB, ako je amiodarón (pozri tabuľku 1).

Obrázok 2

Citlivosť buniek Balb/c 3T3 na ožiarenie (meraná v oblasti UVA)

Životaschopnosť buniek (% absorpcie neutrálnej červene v porovnávacích vzorkách bez svetla)



(pozri časť 1.4.1.5.2 druhý odsek, 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Citlivosť buniek Balb/c 3T3 na ožiarenie solárnym simulátorom použitým pri validačnom pokuse testu fototoxicity 3T3 NRU, nameraná v oblasti UVA. Na obrázku sú znázornené výsledky získané v rámci predvalidačnej štúdie v siedmich rôznych laboratóriách (1). Zatiaľ čo dve krivky označené neplnými symbolmi boli získané so staršími bunkami (s vysokým počtom pasáží), ktoré sa museli nahradiť novými bunkovými materiálmi, krivky s plnými symbolmi znázorňujú bunky s prijateľnou toleranciou k ožiareniu.

Z týchto údajov bola odvodená najvyššia necytotoxická dávka ožiarenia 5 J/cm² (vertikálna prerušovaná čiara). Horizontálna prerušovaná čiara predstavuje popritom maximálny prijateľný účinok ožiarenia uvedený v časti 1.4.2.2.

B.42. SENZIBILIZÁCIA POKOŽKY: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN**1. METÓDA**

Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 429 (2002).

1.1. ÚVOD

Lokálna skúška lymfatických uzlín [Local Lymph Node Assay (LLNA)] je dostatočne validovaná a uznávaná, aby sa mohla uznať ako nová metóda (1), (2), (3). Je to druhá metóda na stanovenie potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Prvá metóda (B.6) využíva testy s morčatami, a to maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (4).

LLNA poskytuje alternatívnu metódu na identifikáciu chemikálií senzibilizujúcich kožu a na potvrdenie, že chemikália nemá významný potenciál spôsobiť senzibilizáciu kože. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA namiesto testu s morčatami, ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie.

LLNA poskytuje určité výhody, pokiaľ ide o vedecký pokrok a aj starostlivosť o zvieratá. Skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na vyhodnotenie reakcie na podanie látky. Údaje o validácii LLNA a prehľad prác v tejto oblasti boli uverejnené (5), (6), (7), (8). Okrem toho je potrebné poznamenať, že ľahké/mierne senzibilizátory, ktoré sa odporúčajú ako vhodné látky na pozitívnu kontrolu pre testovacie metódy na morčatách, sú tiež vhodné na použitie s LLNA (6), (8), (9).

LLNA je *in vivo* metóda a to znamená, že sa neeliminuje používanie zvierat pri hodnotení aktivity kontaktnej senzibilizácie. Môže však umožniť zníženie počtu zvierat potrebných na tento účel. Okrem toho LLNA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy kontaktnej senzibilizácie. LLNA sa zakladá na posudzovaní imunologických reakcií vyvolaných chemikáliami počas indukčnej fázy senzibilizácie. Na rozdiel od testov s morčatami LLNA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Okrem toho LLNA nevyžaduje použitie adjuvansu ako v prípade maximalizačného testu morčiat. Tým LLNA znižuje utrpenie zvierat. Napriek výhodám, ktoré LLNA má pred tradičnými testami s morčatami, je potrebné uznať, že existujú určité obmedzenia, pre ktoré je potrebné používať tradičné testy s morčatami (napr. falošné negatívne zistenia v LLNA s určitými kovmi, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými iritantami) (10).

Pozri tiež úvodnú časť B.

1.2. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Základným princípom, na ktorom sa LLNA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú primárnu proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie chemikálie. Táto proliferácia je úmerná aplikovanej dávke (a účinnosti alergénu) a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie objektívneho, kvantitatívneho merania senzibilizácie. LLNA hodnotí túto proliferáciu ako vzťah medzi dávkou a reakciou, keď sa proliferácia v pokusných skupinách porovnáva s kontrolnou skupinou, ktorej sa podáva nosič. Určí sa pomer proliferácie v ošetrenej skupine k proliferácii v kontrolách s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index, a musí mať hodnotu aspoň tri pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora. Tu uvedené metódy sa zakladajú na používaní rádioaktívneho označenia na meranie proliferácie buniek. Môžu sa však použiť iné konečné body na hodnotenie proliferácie za predpokladu, že to bude zdôvodnené a príslušne vedecky doložené, vrátane úplných citácií a popisu metodológie.

1.3. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.3.1. Prípravky****1.3.1.1. Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie**

Zvieratá by sa mali umiestniť jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C ($\pm$ 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

1.3.1.2. *Príprava zvierat*

Zvieratá sú náhodne vybraté, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek) a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrovania sa všetky zvieratá vyšetrí, aby sa získala istota, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

1.3.2. **Testovacie podmienky****1.3.2.1. *Experimentálne zvieratá***

Vybratým druhom pre tento test je myš. Použijú sa mladé dospelé panenské a negravídne samice myši kmeňa CBA/Ca alebo CBA/J. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Iné kmene a samce sa môžu použiť, ak sa na základe údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v reakcii na LLNA.

1.3.2.2. *Kontrola spoľahlivosti*

Na základe pozitívnych kontrol sa dokazuje riadne vykonanie testu a kompetencia laboratória na úspešné vykonanie testu. Pozitívna kontrola má spôsobiť pozitívnu reakciu na LLNA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 3 v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou. Dávka pozitívnej kontroly sa zvolí tak, aby spôsobila zreteľnú, ale nie nadmernú indukciu. Vhodnými látkami sú 3-fenyl-2-hexylpropanál (č. CAS 101-86-0, č. EINECS 202-983-3) a benzotiazol-2-tiol (č. CAS 149-30-4, č. EINECS 205-736-8). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné kontrolné látky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá. Hoci sa zvyčajne vyžaduje v každom teste pozitívna kontrolná skupina, môžu sa vyskytnúť situácie, keď testovacie laboratória budú mať k dispozícii údaje z predchádzajúcich kontrol na preukázanie konzistencie uspokojivej reakcie v priebehu najmenej šiestich mesiacov alebo v dlhšom období. V týchto situáciách môže byť postačujúce menej časté testovanie s pozitívnymi kontrolami v intervaloch najviac 6 mesiacov. Hoci látka na pozitívnu kontrolu sa má testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú reakciu (napr. acetón: olivový olej), môžu sa vyskytnúť určité regulačné opatrenia, keď bude potrebné aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúci prípravok). Za takýchto okolností sa otestuje možná interakcia pozitívnej kontroly s týmto nezvyčajným nosičom.

1.3.2.3. *Počet zvierat, veľkosť dávky a výber nosiča*

Aspoň štyri zvieratá sa používajú na dávkovú skupinu, aspoň tri koncentrácie testovanej látky, a k tomu negatívna kontrolná skupina, ošetrovaná iba nosičom pre testovanú látku, a prípadne pozitívna kontrola. V tých prípadoch, keď sa majú získať údaje o jednotlivých zvieratách, použije sa aspoň päť zvierat na dávkovú skupinu. S výnimkou absencie ošetrovania s testovanou dávkou sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v ošetrovaných skupinách a ošetrujú sa rovnakým spôsobom ako zvieratá v ošetrovaných skupinách.

Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaní uvedených v odkaze (1). Dávky sa vyberú z odstupňovaných koncentrácií 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Existujúce údaje o akútnej toxicite a podráždení kože, ak sú k dispozícii, sa posúdia výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a rozsiahlemu lokálnemu podráždeniu kože (2), (11).

Nosič sa vyberie tak, aby testované koncentrácie a rozpustnosť boli maximálne, pričom vznikne roztok/suspénzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče, zoradené podľa vhodnosti, sú acetón/olivový olej (4:1 v/v), dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (2), (10), ale môžu sa použiť aj iné, ak sa uvedie uspokojivé zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva, ako ďalšiu kontrolu. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu, aby sa hydrofilné materiály zabudovali do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli. V dôsledku toho je potrebné sa vyhýbať použitiu vodných nosičov.

1.3.3. Postup testu**1.3.3.1. Priebeh pokusu**

Priebeh pokusu je takýto:

Deň 1:

Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť. Začnite s aplikáciou 25 μ l z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (podľa potreby) na zadnú stranu každého ucha.

Dni 2 a 3:

Zopakujte aplikačný postup uskutočnený v deň 1.

Dni 4 a 5:

Žiadne ošetrovanie.

Deň 6:

Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa. Podajte injekciou 250 μ l fosfátového fyziologického roztoku (PBS) obsahujúceho 20 μ Ci (7,4e + 8 Bq) ^3H -metyltymidínu do všetkých pokusných a kontrolných myší cez chvostovú žilu. Alebo podajte injekciou 250 μ l PBS obsahujúceho 2 μ Ci (7,4e + 7 Bq) ^{125}I -jódodeoxyuridínu a 10^{-5} M fluorodeoxyuridínu všetkým myšiam cez chvostovú žilu.

O päť hodín sa zvieratá usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha a pooled v PBS pre každú pokusnú skupinu (metóda pooled ošetrovanej skupiny); alebo sa môžu odobrať dvojice lymfatických uzlín z jednotlivých zvierat a pooled v PBS pre každé zviera (metóda jednotlivých zvierat). Údaje a diagramy identifikácie uzlín a disekcii je možné nájsť v prílohe I odkazu 10.

1.3.3.2. Príprava bunkových suspenzií

Jednotlivá suspenzia buniek lymfatických uzlín (BLU) buď z pooled ošetrovaných skupín alebo bilaterálne z jednotlivých zvierat sa pripravuje jemným mechanickým pretlačením cez nerezové sitko s 200 μ m otvormi. Bunky lymfatických uzlín sa dvakrát premyjú v nadbytku PBS a zrážajú s 5 % trichlóroctovou kyselinou (TCA) 18 hod. pri 4 °C (2). Pelety sa buď opätovne suspendujú v 1 ml TCA a prenesú do scintilačných fľaštičiek obsahujúcich 10 ml scintilačnej kvapaliny pre meranie ^3H , alebo sa prenesú priamo gamma meracích túb na meranie ^{125}I .

1.3.3.3. Stanovenie proliferácie buniek (naviazaná rádioaktivita)

Naviazanie ^3H -metyltymidínu sa meria β -scintilačným meraním ako (dezintegrácia za minútu (DPM)). Naviazanie ^{125}I -jódodeoxyuridínu sa meria ^{125}I -meraním a tiež sa vyjadruje ako DPM. V závislosti od použitej metódy sa naviazanie vyjadrí ako DPM/ošetrovanú skupinu (pooled metóda) alebo DPM/zviera (metóda jednotlivých zvierat).

1.3.3.4. Pozorovania**1.3.3.4.1. Klinické vyšetrenia**

Zvieratá sa starostlivo vyšetrí jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, buď lokálneho podráždenia v mieste aplikácie, alebo systémovej toxicity. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam.

1.3.3.4.2. Telesné hmotnosti

Ako je uvedené v časti 1.3.3.1, hmotnosti jednotlivých zvierat by mali zmerať na začiatku testu a pri naplánovanom usmrtení zvierat.

1.3.4. Výpočet výsledkov

Výsledky sa vyjadrujú ako stimulačný index (SI). Pri použití pooled metódy sa SI získa delením podávania rádioaktívneho začlenenia, pre každú ošetrovanú skupinu začlenením do pooled nosiča kontrolnej skupiny; tým sa získa priemerný SI. Pri použití metódy jednotlivých zvierat sa SI získa vydelením strednej DPM/zviera v rámci každej pokusnej skupiny, ktorej sa podávala testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny pri obsahu DPM/zviera kontrolnej skupiny, ktorej sa podávalo rozpúšťadlo/nosič. Priemerná hodnota SI pre kontroly ošetrované nosičom je potom 1.

Použitie metódy jednotlivých zvierat na výpočet SI umožní vykonať štatistickú analýzu údajov. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si mal experimentátor uvedomiť možné rozdiely zmien a ostatné súvisiace problémy, ktoré môžu vyžadovať transformáciu údajov alebo neparametrickú štatistickú analýzu. Vhodnou metódou na interpretáciu údajov je vyhodnotenie jednotlivých údajov ošetrovaných a nosičových kontrol a z nich odvodiť najviac zodpovedajúcej krivky reakcie na dávku pri zohľadnení hraníc spoľahlivosti (8), (12), (13). Experimentátor si však musí dávať pozor na možné „hraničné“ reakcie v prípade jednotlivých zvierat v skupine, na základe ktorých môže vzniknúť potreba použiť alternatívne meranie reakcie (napr. medián skôr ako stredná hodnota) alebo elimináciu hraníc.

Rozhodovací proces, pokiaľ ide o pozitívnu reakciu, zahrnuje stimulačný index ≥ 3 spolu s posúdením reakcie na dávku a v prípade potreby štatistickú významnosť (3), (6), (8), (12), (14).

Ak je potrebné vysvetliť získané výsledky, mala by sa venovať pozornosť rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam so známymi senzibilizátormi, či spôsobuje nadmerné podráždenie kože a charakter pozorovanej reakcie na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú na inom mieste (7).

2. ÚDAJE

Údaje by sa mali zhrnúť v podobe tabuliek, kde sa uvedú stredné a individuálne DMP hodnoty a stimulačné indexy pre každú dávkovú skupinu (vrátane kontrolnej skupiny, ktorej sa podával nosič).

3. PODÁVANIE SPRÁV

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

- identifikačné údaje (napr. číslo CAS, ak je k dispozícii; zdroj; čistota; známe nečistoty; číslo šarže),
- fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),
- v prípade zmesi, zloženie a vzájomný percentuálny podiel zložiek.

Nosič:

- identifikačné údaje [čistota; koncentrácia (v prípade potreby), použitý objem],
- zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

- použitý kmeň myší,
- mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,
- zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

- počet, vek a pohlavie zvierat.

Podmienky testu:

- informácie o príprave testovanej látky a aplikácii,
- zdôvodnenie výberu dávky, vrátane výsledkov zo štúdie na zistenie rozsahu dávkovania, ak sa uskutočnila; použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej látky,
- údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu krmiva/zdroja, zdroja vody).

Kontrola spoľahlivosti:

- zhrnutie výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o použitej látke, koncentracii a nosiči,
- paralelné a/alebo predchádzajúce pozitívne a negatívne kontrolné údaje pre testovacie laboratórium.

Výsledky:

- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku podávania látky a pri naplánovanom usmrtení,
- tabuľka stredných (pooled metóda) a jednotlivých (metóda jednotlivých zvierat) DPM hodnôt, ako aj rozsah hodnôt pre obe metódy a stimulačné indexy pre každú dávkovú (vrátane kontrolnej skupiny, ktorej sa podával nosič) skupinu,
- štatistická analýza v prípade potreby,
- časový priebeh nástupu a príznakov toxicity, vrátane podráždenia kože na mieste podania, ak sa vyskytne, pre každé zviera.

Diskusia k výsledkom:

- Stručný komentár k výsledkom, analýza reakcie na dávku a štatistické analýzy v prípade potreby so záverom, pokiaľ ide o to, či sa testovaná látka má pokladať za senzibilizátor kože.

4. ODKAZY

- (1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. Food and Chemical Toxicology 30, 165 – 169.
- (2) Kimber, I., Derman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. Toxicology, 93, 13 – 31.
- (3) 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., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. Journal of Toxicology and Environmental Health, 53, 563 – 79.
- (4) Testing Method B.6.
- (5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. Food and Chemical Toxicology, 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 and Chemical Toxicology, 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 and Chemical Toxicology*, 36, 327 – 33.
- (8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., 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. *Toxicology*, 146, 49 – 59.
- (9) 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. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281 – 4.
- (10) National Institute of Environmental Health Sciences (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. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- (11) Testing method B.4.
- (12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63 – 67.
- (13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate L, Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261 – 266.
- (14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42 ,344 – 48.

B.43. ŠTÚDIA NEUROTOXICITY U HLODAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 424 (1997).

Táto testovacia metóda bola vyvinutá na získanie informácií, ktoré sú potrebné na potvrdenie potenciálnej neurotoxicity chemikálií u dospelých zvierat alebo jej ďalšiu charakterizáciu. Môže sa buď kombinovať s existujúcimi testovacími metódami pre štúdie toxicity pri opakovanej dávke, alebo sa môže vykonať ako samostatná štúdia. Pri plánovaní štúdií, ktoré sú založené na tejto testovacej metóde, sa odporúča, aby sa na pomoc nahliadlo do OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1). Toto je dôležité najmä, keď sa zvažujú modifikácie vyšetrení a testovacích postupov odporúčaných pre bežné používanie tejto metódy. The Guidance Document bol pripravený, aby uľahčil výber iných testovacích postupov na použitie za špecifických podmienok.

Posúdenie vývojovej neurotoxicity nie je predmetom tejto metódy.

1.1. ÚVOD

Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností chemikálií je dôležité posúdiť potenciál vyvolať neurotoxické účinky. Práve testovacia metóda pre systémovú toxicitu pri opakovanej dávke zahŕňa vyšetrenia, ktoré skúmajú potenciálnu neurotoxicitu. Táto testovacia metóda sa môže použiť na zostavenie štúdie, ktorou sa získajú alebo potvrdia ďalšie informácie o neurotoxických účinkoch v štúdiách systémovej toxicity pri opakovanej dávke. Posúdenie potenciálnej neurotoxicity určitých tried chemikálií by však mohlo viesť k tomu, že sa môžu lepšie posudzovať s použitím tejto metódy bez predchádzajúcej indikácie potenciálnej neurotoxicity zo štúdií systémovej toxicity pri opakovanej dávke. Takéto posudzovanie zahŕňa napríklad:

- pozorovanie neurologických príznakov alebo neuropatologických lézií v iných štúdiách toxicity ako sú štúdie systémovej toxicity pri opakovanej dávke, alebo
- štrukturálnu príbuznosť alebo iné informácie, ktoré ich spájajú so známymi neurotoxikantami.

Okrem toho sa môžu vyskytnúť aj iné príklady, keď je vhodné použitie tejto testovacej metódy; ďalšie informácie pozri v odkaze (1).

Táto metóda bola vyvinutá tak, aby sa dala prispôsobiť osobitným potrebám na potvrdenie špecifickej histopatologickej a behaviorálnej neurotoxicity chemikálie, ako aj na umožnenie charakterizácie a kvantifikácie neurotoxických reakcií. V minulosti sa neurotoxická stotožňovala s neuropatiou, ktorá zahŕňa neuropatologické lézie alebo neurologické dysfunkcie, ako sú záchvat, paralýza alebo triaška.

Aj keď neuropatia je dôležitým prejavom neurotoxicity, teraz je zrejmé, že existuje mnoho ďalších príznakov nervovej systémovej toxicity (napr. strata motorickej koordinácie, senzorické deficity, dysfunkcie týkajúce sa schopnosti sa učiť a pamäť), ktoré sa nemôžu prejaviť v štúdiách neuropatie alebo iných typoch štúdií.

Táto testovacia metóda na dôkaz neurotoxicity je vyvinutá na stanovenie hlavných neurobehaviorálnych a neuropatologických účinkov u dospelých hlodavcov. Hoci účinky na správanie, aj keď pri neprítomnosti morfológických zmien, môžu odrážať nepriaznivý vplyv na organizmus, nie všetky zmeny v správaní sú špecifické pre nervový systém. Preto je potrebné všetky pozorované zmeny hodnotiť v súvislosti s korelačnými histopatologickými, hematologickými alebo biochemickými údajmi, ako aj údajmi o iných typoch systémovej toxicity. Testovanie uvádzané v tejto metóde na umožnenie charakterizácie a kvantifikácie neurotoxických reakcií zahŕňa špecifické histopatologické a behaviorálne postupy, ktoré sa môžu ďalej opierať o elektrofyziologické a/alebo biochemické vyšetrenia (1), (2), (3), (4).

Neurotoxikanty môžu pôsobiť na množstvo cieľov v nervovom systéme a rozličnými mechanizmami. Keďže žiadny samostatný súbor testov nie je schopný dôkladne posúdiť neurotoxický potenciál všetkých látok, môže byť potrebné využiť iné *in vivo* alebo *in vitro* testy, ktoré sú špecifické pre zistený alebo predpokladaný typ neurotoxicity.

Táto testovacia metóda sa môže tiež použiť v spojení s usmernením uvedeným v OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) na zostavenie štúdií určených na ďalšiu charakterizáciu alebo zvýšenie citlivosti kvantifikácie reakcie na dávku, na lepšie stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku alebo na dokázanie známych alebo podozrivých rizík chemikálie. Napríklad sa môžu zostaviť štúdie na identifikáciu a posúdenie neurotoxického(-ých) mechanizmu(-ov) alebo na doplnenie údajov,

ktoré sú už k dispozícii z použitých základných neurobehaviorálnych a neuropatologických vyšetровacích postupov. Takéto štúdie nevyžadujú opakované údaje, ktoré by sa získali na základe použitia štandardných postupov odporúčaných v tejto metóde, ak sú už takéto údaje k dispozícii a nepokladajú sa za potrebné pre interpretáciu výsledkov štúdie.

Táto štúdia neurotoxicity, použitá samostatne alebo v kombinácii, poskytuje informácie, ktoré môžu:

- identifikovať, či nervový systém je permanentne alebo reverzibilne ovplyvnený testovanou chemikáliou,
- prispieť ku charakterizácii zmien nervového systému spojených s vystavením sa pôsobeniu chemikálie a k pochopeniu príslušného mechanizmu,
- určiť vzťahy medzi dávkou a reakciou v závislosti od času na stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (ktorá sa môže použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií pre chemikáliu).

Pri tejto metóde testovania sa testovaná látka podáva orálne. Iné cesty podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) môžu byť vhodnejšie a môžu vyžadovať úpravu odporúčaných postupov. Rozhodnutie o tom akou cestou sa látka bude podávať závisí na profile expozície ľudí a na dostupných toxikologických alebo kinetických informáciách.

1.2. DEFINÍCIE

Nepriaznivý účinok: každá zmena v súvislosti s ošetrovaním od normálneho stavu, ktorá znižuje schopnosť organizmu prežiť, reprodukovať sa alebo prispôbiť sa prostrediu.

Dávka: je množstvo podanej testovanej látky. Dávka sa vyjadruje ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti testovaného zvieratá (napr. mg/kg) alebo ako konštantné koncentrácie v krmive (ppm).

Dávkovanie: je všeobecný termín zahrnujúci podávanie látky, jej frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Neurotoxicita: nepriaznivá zmena v štruktúre alebo funkcii nervového systému, ktorá vzniká v dôsledku vystavenia chemickému, biologickému alebo fyzikálnemu činiteľu.

Neurotoxikant: je každý chemický, biologický alebo fyzikálny činiteľ, ktorý môže spôsobiť neurotoxicitu.

NOAEL: je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku a je to najvyššia dávka, pri ktorej sa nepozorujú žiadne nepriaznivé zistenia v súvislosti s ošetrovaním.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná chemikália sa podáva orálnou cestou v rade dávok niekoľkým skupinám laboratórnych hlodavcov. Zvyčajne sa vyžadujú opakované dávky a režim podávania dávok môže byť 28 dní, pre subchronickú (90 dní) alebo chronickú toxicitu (1 rok alebo viac). Postupy uvedené v tejto testovacej metóde sa môžu použiť aj pre štúdiu akútnej neurotoxicity. Zvieratá sa testujú na umožnenie detekcie alebo charakterizácie behaviorálnych a/alebo neurologických abnormalít. V priebehu každého obdobia pozorovania sa hodnotí rozsah behaviorálnych aspektov, ktoré by mohli byť ovplyvnené neurotoxikantami. Na konci testu sa časť zvierat každého pohlavia z každej skupiny pomocou perfúzie fixuje in situ a rezy tkaniva mozgu, miechy a periférnych nervov sa pripravujú a vyšetria.

Keď sa štúdia uskutočňuje ako samostatná štúdia na zistenie neurotoxicity alebo na charakterizáciu neurotoxických účinkov, zvieratá v každej skupine, ktoré sa nepoužili na perfúziu a následnú histopatológiu (pozri tabuľku 1), sa môžu použiť na špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy, ktoré môžu doplniť údaje získané pri štandardných vyšetreniach vyžadovaných touto metódou (1). Tieto dodatočné postupy môžu byť osobitne užitočné, keď empirické pozorovania alebo očakávané účinky indikujú špecifický typ alebo cieľové tkanivo v prípade neurotoxicity spôsobenej chemikáliou. Alternatívne sa môžu zvýšené zvieratá použiť na také hodnotenie, ako sa vyžaduje v testovacích metódach pre štúdie toxicity pri opakovanej dávke u hlodavcov.

Ak sa postupy tejto testovacej metódy kombinujú s postupmi iných testovacích metód, je potrebný dostatočný počet zvierat na splnenie požiadaviek pre vyšetrenia v oboch štúdiách.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.4.1. Výber druhu zvierat**

Spomedzi druhov hlodavcov sa prednostne používa potkan, aj keď je možné použiť aj iný druh hlodavca. Použijú sa mladé dospelé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice by mali byť panenské a negravidné. Dávkovanie by sa malo začať čo najskôr po odstavení, pokiaľ možno nie neskôr ako vo veku šesť týždňov, a v každom prípade pred dosiahnutím deviatich týždňov. Keď sa však táto štúdia kombinuje s inými štúdiami, môže byť potrebné túto vekovú požiadavku upraviť. Na začiatku štúdie rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat nemá byť vyšší ako $\pm 20\%$ priemernej hmotnosti každého pohlavia. Keď sa uskutoční predbežná krátkodobá štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť zvieratá z rovnakého kmeňa a zdroja.

1.4.2. Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30% , a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70% , okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať $50 - 60\%$. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Je potrebné obmedziť na minimum krátkodobý silný hluk. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej látky, keď sa podáva týmto spôsobom. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v kliebkach.

1.4.3. Príprava zvierat

Zdravé mladé zvieratá sa náhodne rozdelia do ošetrovanej a kontrolnej skupiny. Kliebky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu kliebok. Zvieratá sa jednoznačne označia a držia vo svojich kliebkach aspoň (5) päť dní pred začiatkom štúdie, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky.

1.4.4. Cesta podávania a príprava dávok

Pri tejto metóde testovania sa testovaná látka podáva výlučne orálne. Orálne podávanie môže byť cez sondu, v krmive, v pitnej vode alebo kapsulami. Iné cesty podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) sa môžu použiť, ale môže byť potrebné upraviť odporúčané postupy. Rozhodnutie o tom akou cestou sa látka bude podávať závisí na profile expozície ľudí a dostupných toxikologických alebo kinetických informáciách. Je potrebné uviesť zdôvodnenie výberu cesty podávania, ako aj výsledné modifikácie postupov tejto testovacej metódy.

V prípade potreby sa testovaná látka môže rozpustiť alebo rozptýliť vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku/suspenzie v inom nosiči. Toxické vlastnosti nosiča musia byť známe. Okrem toho je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám nosiča: vplyv nosiča na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej látky, ktoré môžu zmeniť jej toxické vlastnosti; a vplyv na spotrebu potravy alebo vody alebo nutričný stav zvierat.

1.5. POSTUPY**1.5.1. Počet a pohlavie zvierat**

Keď sa štúdia uskutočňuje ako samostatná štúdia, je potrebné použiť aspoň 20 zvierat (10 samíc a 10 samcov) v každej dávkovej a kontrolnej skupine na vyhodnotenie klinických a funkčných vyšetrení. Aspoň päť samcov a päť samíc, vybraných z týchto 10 samcov a 10 samíc, sa pomocou perfúzie fixuje in situ a použije na podrobnú neurohistopatológiu na konci štúdie. V prípade, keď sa iba obmedzený počet zvierat v danej dávkovej skupine vyšetrí na príznaky neurotoxických účinkov, je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa tieto zvieratá zahrnuli k tým, ktoré boli vybrané na perfúziu. Ak sa štúdia uskutočňuje v kombinácii so štúdiou toxicity pri opakovanej dávke, použijú sa vhodné počty zvierat, aby zodpovedali cieľom oboch štúdií. Minimálny počet zvierat na skupinu pre rôzne kombinácie štúdií je uvedený v tabuľke 1. Ak sa po ošetrení plánuje predčasné usmrtenie, alebo sa plánujú skupiny na regeneráciu, aby sa pozorovala reverzibilita, pretrvávajúce alebo oneskorené výskyt toxických účinkov, alebo keď sa zvažujú dodatočné vyšetrenia, potom by sa počet zvierat mal zvýšiť, aby sa zabezpečilo, že je k dispozícii potrebný počet zvierat na vyšetrenie a histopatológiu.

1.5.2. Ošetrovaná a kontrolná skupina

Zvyčajne sa použijú aspoň tri dávkové skupiny a kontrolná skupina, ale ak sa na základe hodnotenia ďalších údajov neočakávajú žiadne účinky pri opakovanej dávke $1\,000\text{ mg/kg}$ telesnej hmotnosti/deň, môže sa vykonať

limitný test. Ak nie sú k dispozícii vhodné údaje, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu dávkovania, aby umožnila stanoviť dávky, ktoré sa majú použiť. Okrem ošetrovania s testovanou látkou sa zvieratá v kontrolnej skupine ošetrí rovnakým spôsobom ako zvieratá v pokusnej skupine. Ak sa používa nosič pri podávaní testovanej látky, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

1.5.3. **Kontrola spoľahlivosti**

Laboratórium, ktoré vykonáva štúdiu, predloží údaje, ktoré dokazujú jeho spôsobilosť vykonať túto štúdiu a citlivosť použitých postupov. Takéto údaje poskytnú dôkaz schopnosti zisťovať a kvantifikovať podľa potreby zmeny v rozličných konečných bodoch, odporúčaných pre pozorovanie, ako napr. autonómne príznaky, senzorická reaktivita, sila uchopenia končatín a motorická aktivita. Informácie o chemikáliách, ktoré spôsobujú rôzne typy neurotoxických reakcií a ktoré by sa mohli použiť ako pozitívne kontrolné látky je možné nájsť v odkazoch 2 až 9. Môžu sa použiť predchádzajúce údaje, ak základné aspekty experimentálnych postupov zostávajú rovnaké. Odporúča sa pravidelná aktualizácia predchádzajúcich údajov. Ak vykonávacie laboratórium zmenilo určitý základný prvok pri uskutočňovaní testu alebo postupov, je potrebné zistiť nové údaje potvrdzujúce nezmenenú citlivosť postupov.

1.5.4. **Výber dávky**

Veľkosti dávok sa zvolia na základe posúdenia každej už zistenej toxicity a dostupných kinetických údajov pre testovanú látku alebo príbuzné materiály. Najvyššia dávka sa zvolí s cieľom vyvolať neurotoxické účinky alebo jasné účinky systémovej toxicity. Potom sa klesajúca postupnosť hladín dávok zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia súvisiaca s dávkou a najnižšia hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). V zásade sa hladiny dávok stanovujú tak, aby sa primárne toxické účinky na nervový systém dali odlíšiť od účinkov súvisiacich so systémovou toxicitou. Intervaly dávkovania s faktorom dva až tri sú často optimálne a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. Ak existuje realistický odhad expozície ľudí, tiež sa zohľadní.

1.5.5. **Limitný test**

Ak sa na základe štúdie s jednou dávkou aspoň 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s použitím postupov, uvedených pre túto štúdiu, nezistia žiadne pozorovateľné neurotoxické účinky a ak sa neočakáva toxicita na základe údajov o štrukturálne príbuzných látkach, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím troch dávok. Z očakávanej expozície ľudí môže vyplývať potreba, aby sa v limitnom teste použili vyššie orálne dávky. V prípade iných druhov podávania, ako je napr. inhalácia alebo dermálna aplikácia, fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky často môžu určovať maximálnu prípustnú úroveň expozície. Pre uskutočnenie orálnej akútnej štúdie má byť dávka pre limitný test minimálne 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Podávanie dávok**

Zvieratám sa podáva testovaná dávka každý deň, 7 dní v týždni počas obdobia minimálne 28 dní; použitie päťdňového režimu dávkovania alebo kratšiu dobu expozície je potrebné zdôvodniť. Ak sa testovaná látka podáva cez sondu, podáva sa ako jednorazová dávka s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý sa môže jednorazovo podať závisí od veľkosti pokusných zvierat. Objem nebude vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti. V prípade vodných roztokov sa však môže uvážiť použitie do 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobujú zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravujú tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

Pre látky podávané v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej látky neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Keď sa testovaná látka podáva v krmive, môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm) alebo stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvierat; iné možnosti sa musia špecifikovať. V prípade, keď sa látka podáva sondou, látka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôbi sa podľa potreby, aby sa zachovala stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Ak sa uskutočnia predbežná štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť podobné krmivo. V prípade akútnej štúdie, keď nie je možná jednorazová dávka, sa dávka môže podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

1.6. **POZOROVANIE**

1.6.1. **Frekvencia vyšetrení a testy**

V štúdiách pri opakovaných dávkach vymedzený čas pozorovania pokrýva obdobie dávkovania. V štúdiách akútnej toxicity sa sleduje 14-denné obdobie po ošetrovaní. V prípade zvierat vo vedľajších skupinách, ktoré sa držia bez expozície počas obdobia po ošetrovaní, vymedzený čas pozorovania pokrýva aj toto obdobie.

Výšetrenia sa uskutočnia dostatočne často, aby sa dosiahla maximálna pravdepodobnosť zistenia všetkých behaviorálnych a/alebo neurologických abnormalít. Výšetrenia sa uskutočnia pokiaľ možno v rovnaký čas každý deň pri zohľadnení obdobia, keď sa predpokladajú maximálne účinky po dávkovaní. Frekvencia klinických výšetrení a funkčných testov je zosumarizovaná v tabuľke 2. Ak z kinetických alebo iných údajov z predchádzajúcich štúdií vyplýva potreba použiť odlišné časové body pre výšetrenia, testy alebo obdobia po výšetrení, prijme sa alternatívny harmonogram, aby sa získalo maximálne množstvo informácií. Uvedie sa zdôvodnenie zmien harmonogramu.

1.6.1.1. *Pozorovania všeobecného zdravotného stavu a mortality/morbidity*

Zdravotný stav všetkých zvierat sa pozorne vyšetrí aspoň raz denne, morbidita a mortalita sa zisťuje aspoň dvakrát denne.

1.6.1.2. *Podrobné klinické výšetrenia*

Všetky zvieratá vybrané na tento účel sa podrobne klinicky vyšetrí (pozri tabuľku 1), jedenkrát pred prvou expozíciou (na umožnenie porovnaní medzi pokusnými zvieratami) a potom v rôznych intervaloch v závislosti na trvaní štúdie (pozri tabuľku 2). Podrobné klinické výšetrenia vedľajších skupín na regeneráciu sa vykonávajú na konci obdobia regenerácie. Podrobné klinické výšetrenia sa vykonávajú mimo domácej kletky v zvyčajnej vyšetrovacej miestnosti. Starostlivo sa zaznamenajú s použitím systému hodnotenia, ktorý zahŕňa kritériá alebo stupnicu hodnotenia pre každé meranie pri výšetreniach. Použité kritériá alebo stupnice explicitne definuje testovacie laboratórium. Je potrebné vynaložiť úsilie na zabezpečenie, aby zmeny testovacích podmienok boli minimálne (nie systematicky súvisiace s ošetrením) a aby pozorovania vykonávali vyškolení pracovníci, ktorí nie sú oboznámení o prebiehajúcom ošetrení.

Odporúča sa, aby sa pozorovania vykonávali štruktúrovanej podobe, pri ktorej sa presne definované kritériá (vrátane definície normálneho „rozsahu“) systematicky uplatňujú na každé zviera v každom čase pozorovania. „Normálny rozsah“ sa príslušne zdokumentuje. Všetky pozorované príznaky sa zaznamenajú. Vždy, keď je to možné, zaznamená sa aj závažnosť pozorovaných príznakov. Klinicky sa pozorujú okrem iného zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a sekrétov a autonómnou aktivitu (napr. slzenie, zjezenie, veľkosť zreničky, nezvyčajný priebeh dýchania a/alebo dýchanie ústami, všetky nezvyčajné príznaky pri močení alebo vyprázdňovaní a bezfarebný moč).

Všetky nezvyčajné reakcie, pokiaľ ide o polohu tela, stupeň aktivity (napr. zvýšený alebo znížený záujem o preskúmanie zvyčajného priestoru) a koordinácia pohybu, sa tiež zaznamenajú. Zmeny chôdze (napr. tackavá chôdza, ataxia), poloha (napr. zhrbená) a reaktivita na zaobchádzanie, premiestnenie alebo iné podnety z prostredia, ako aj výskyt klonických alebo tonických pohybov, kŕče alebo triaška, stereotypy (napr. nadmerná starostlivosť o srst, nezvyčajné pohyby hlavou, opakovaný beh dokola) alebo zvláštne správanie (napr. hryzenie alebo nadmerné olizovanie, sebamrzačenie, chôdza dozadu, vydávanie zvukov) alebo agresia sa zaznamenajú.

1.6.1.3. *Funkčné testy*

Podobne ako pri podrobných klinických pozorovania, uskutočnia sa funkčné testy raz pred expozíciou a opakovane potom u všetkých zvierat, vybraných na tento účel (pozri tabuľku 1). Frekvencia funkčných testov závisí aj od trvania štúdie (pozri tabuľku 2). Okrem období pozorovania, ako je uvedené v tabuľke 2, sa vykonávajú funkčné výšetrenia vedľajších regenerujúcich skupín čo možno najbližšie k času konečného usmrtenia. Funkčné testy by mali zahŕňať senzorickú reaktivitu na rôznorodé podnety [napr. sluchové, vizuálne a propioceptívne podnety (5), (6), (7)], hodnotenie sily uchopenia končatín (8) a hodnotenie motorickej aktivity (9). Motorická aktivita sa zmeria automatickým prístrojom, ktorým je možné stanoviť poklesy aj nárasty aktivity. Ak sa použije iný definovaný systém, je potrebné, aby bol kvantitatívny a jeho citlivosť a spoľahlivosť preukázaná. Každý prístroj by mal byť testovaný, aby sa zaručila dlhodobá spoľahlivosť a porovnateľnosť prístrojov. Ďalšie údaje o postupoch, ktoré je možné použiť, sú uvedené v príslušných odkazoch. Ak neexistujú žiadne údaje (napr. štrukturálna aktivita, epidemiologické údaje, iné toxikologické štúdie), z ktorých by vyplývali potenciálne neurotoxické účinky, je potrebné zvážiť zahrnutie špecializovanej sít ch testov citlivosti a motorickej funkcie alebo schopnosti učiť sa a pamätať si na podrobnejšie preskúmanie týchto možných účinkov. Viac informácií o špecializovanejších testoch a ich používaní sa nachádza v odkaze (1).

Vo výnimočných prípadoch sa zvieratá, ktoré vykazujú príznaky toxicity v miere, ktorá by mohla významne ovplyvniť funkčný test, môžu vylúčiť z takeého testu. Uvedie sa zdôvodnenie v prípade vylúčenia zvierat z funkčného testu.

1.6.2. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody**

Pri štúdiách s trvaním do 90 dní by sa všetky zvieratá mali odvážiť aspoň raz za týždeň a spotreba potravy (spotreba vody, keď sa testovaná látka podáva cez toto médium) by sa mala zmerať aspoň raz za týždeň. Pri dlhodobých štúdiách by sa všetky zvieratá mali odvážiť aspoň raz za týždeň v prvých 13 týždňoch a potom

aspoň raz za každé 4 týždne. Spotreba potravy (spotreba vody, keď sa testovaná látka podáva cez toto médium) by sa mala zmerať aspoň raz za týždeň v prvých 13 týždňoch a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ sa nevyžaduje inak na základe zdravotného stavu alebo telesnej hmotnosti.

1.6.3. Oftalmológia

Pri štúdiách, ktoré trvajú viac ako 28 dní, sa oftalmologicky vyšetria s použitím oftalmoskopu, alebo porovnateľného prístroja, pred podaním testovanej látky a pri ukončení štúdie pokiaľ možno všetky zvieratá alebo aspoň zvieratá v skupinách s vysokými dávkami a kontrolných skupinách. Ak sa zistia zmeny na očiach, alebo ak je to potrebné na základe klinických príznakov, vyšetria sa všetky zvieratá. Pri dlhodobých štúdiách sa oftalmologické vyšetrenie vykoná aj po 13 týždňoch. Oftalmologické vyšetrenia nie je potrebné vykonať, ak sú už tieto údaje dostupné z iných štúdií, ktoré majú podobné trvanie a podobné veľkosti dávok.

1.6.4. Hematológia a klinická biochémia

Ak sa štúdia neurotoxicity uskutočňuje v kombinácii so štúdiou systémovej toxicity pri opakovanej dávke, vykonávajú sa hematologické a klinicko-biochemické vyšetrenia, ako je uvedené v príslušnej metóde štúdie systémovej toxicity. Vzorky sa získajú tak, aby sa minimalizovali akékoľvek prípadné účinky na neurologické správanie.

1.6.5. Histopatológia

Neuropatologické vyšetrenie sa zameria na doplnenie a rozšírenie pozorovaní uskutočnených počas *in vivo* fázy štúdie. Tkanivá od aspoň 5 zvierat/pohlavie/skupinu (pozri tabuľku 1 a ďalší odsek) sa fixujú *in situ* s použitím všeobecne uznaných perfúzných a fixačných techník (pozri odkaz 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Všetky viditeľné makroskopické zmeny sa zaznamenávajú. Keď sa štúdia uskutoční ako samostatná štúdia na zistenie neurotoxicity alebo na charakterizáciu neurotoxických účinkov, zvyšné zvieratá sa môžu použiť buď na špecifické neurobehaviorálne (10), (11), neuropatologické (10), (11), (12), (13), neurochemické (10), (11), (14), (15) alebo elektrofyziológické (10), (11), (16), (17) vyšetrenia, ktoré môžu doplniť postupy a vyšetrenia uvedené v tomto materiáli, alebo na zvýšenie počtu histopatologicky vyšetrených jedincov. Tieto dodatočné postupy môžu byť osobitne užitočné, keď empirické pozorovania alebo očakávané účinky indikujú špecifický typ alebo cieľové tkanivo v prípade neurotoxicity (2), (3). Podobne sa zvyšné zvieratá môžu použiť aj na bežné patologické hodnotenia, ako je uvedené v metóde pre štúdie pri opakovaných dávkach.

Všetky vzorky tkanív zaliate v parafíne sa zafarbia zvyčajnou metódou, ako je hematoxylín a eozín (H&E), a mikroskopicky vyšetria. Ak sa zistia alebo predpokladajú príznaky periférnej neuropatie, vyšetria sa vzorky periférnych nervov zaliate v umelej hmote. Klinické príznaky môžu tiež poukázvať na ďalšie miesta, ktoré je potrebné vyšetriť, alebo na použitie špeciálneho postupu farbenia. Usmernenie o ďalších miestach, ktoré je potrebné vyšetriť, je možné nájsť v odkazoch (3), (4). Vhodné špeciálne farbivá na dôkaz špecifických typov patologických zmien môžu byť tiež užitočné (18).

Reprezentatívne rezy tkanív centrálného a periférneho nervového systému sa histologicky vyšetria (pozri odkaz 3, kapitola 5, a odkaz 4, kapitola 50). Zvyčajne sa vyšetria tieto oblasti: predný mozog, stred veľkého mozgu vrátane rezu cez hipokampus, stredný mozog, malý mozog, most, predĺžená miecha, oko s očným nervom a sietnica, zväčšenie miechy na krčných a bedrových častiach, chrbtové koreňové uzliny, tkanivá chrbtové a dutiny, proximálny sedací nerv, proximálny tibiálny nerv (na kolene) a tibiálne vetvy nervu lýtkového svalu. Rezy tkanív miechy a periférnych nervov budú obsahovať ako krížové, tak aj priečne a pozdĺžne rezy. Je potrebné venovať pozornosť cievnatosti nervového systému. Vzorka kostrového svalu, predovšetkým lýtkového svalu sa tiež vyšetrí. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať oblastiam s bunkovou a vláknitou štruktúrou a vzorku v CNS a PNS, o ktorých je známe, že sú osobitne náchylné na neurotoxikanty.

Poznámky o neuropatologických zmenách, ktoré sú typické na základe expozície toxikologickej látky, je možné nájsť v odkazoch (3), (4). Odporúča sa postupné vyšetrenie vzoriek tkanív, pri ktorých sa rezy zo skupiny s vysokou dávkou najskôr porovnajú s rezmi z kontrolnej skupiny. Ak sa nezistia žiadne neuropatologické zmeny vo vzorkách z týchto skupín, nie je potrebná ďalšia analýza. Ak sa neuropatologické zmeny zistia v skupine s vysokou dávkou, vzorka z každého potenciálne zasiahnutého tkaniva zo skupín so strednými a nízkymi dávkami sa potom zakóduje a následne vyšetrí.

Ak sa zistí akýkoľvek dôkaz neuropatologických zmien pri kvalitatívnom vyšetrení, vykoná sa druhé vyšetrenie všetkých oblastí nervového systému, kde sa tieto zmeny vyskytnú. Rezy zo všetkých dávkových skupín zo všetkých potenciálne zasiahnutých oblastí sa zakódujú a náhodne vyšetria bez informácií o kóde. Zaznamená sa frekvencia a závažnosť každého poškodenia. Po posúdení všetkých oblastí zo všetkých dávkových skupín sa môže kódovanie zrušiť a môže sa vykonať štatistická analýza na vyhodnotenie vzťahov medzi dávkou a reakciou. Je potrebné opísať príklady rôznych stupňov závažnosti každého poškodenia.

Neuropatologické zistenia by sa mali vyhodnocovať v súvislosti s pozorovaniami a meraniami správania, ako aj s inými údajmi z predchádzajúcich a súčasných štúdií systémovej toxicity testovanej látky.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Je potrebné uviesť jednotlivé údaje. Okrem toho by sa všetky údaje mali zhrnúť v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú a kontrolnú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo sa usmrtili z humanných dôvodov, čas každého uhynutia alebo humanného usmrtenia, popis príznakov zistenej toxicity, vrátane času nástupu, trvania, typu a závažnosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenia, vrátane typu a závažnosti poškodení.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Zistenia zo štúdie sa vyhodnocujú na základe výskytu, závažnosti a vzájomného vzťahu medzi neurobehaviorálnymi a neuropatologickými účinkami (aj neurochemické alebo elektrofyziologické účinky, ak sa vykonali aj ďalšie vyšetrenia) a všetky ostatné zistené nepriaznivé účinky. Ak je to možné číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne akceptovateľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy by sa mali vybrať počas prípravnej fázy štúdie.

3. PODÁVANIE SPRÁV

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

- fyzikálny charakter (vrátane izomerizácie, čistoty a fyzikálno-chemických vlastností),
- identifikačné údaje.

Nosič (v prípade potreby):

- zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

- použitý druh/kmeň,
- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj, podmienky umiestnenia, aklimatizácia, krmivo atď.,
- hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Testovacie podmienky:

- údaje o príprave testovanej látky/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,
- špecifikácia podávaných dávok, vrátane údajov o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávaného materiálu,

- údaje o podávaní testovanej látky,
- zdôvodnenie výberu veľkosti dávok,
- zdôvodnenie cesty podávania a trvania expozície,
- prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,
- údaje o kvalite krmiva a vody.

Pozorovania a postupy testovania:

- údaje o zaradení zvierat v jednotlivých skupinách do podskupín na perfúzne fixovanie,
- údaje o systémoch hodnotenia, vrátane kritérií a stupníc hodnotenia pre každé meranie v podrobných klinických vyšetreniach,
- údaje o funkčných testoch na senzorickú reaktivitu na rôznorodé podnety (napr. sluchové, vizuálne a proprioceptívne podnety); na hodnotenie sily uchopenia končatín a na hodnotenie motorickej aktivity (vrátane údajov o automatických prístrojoch na zistenie aktivity) a iné použité postupy,
- údaje o oftalmologických vyšetreniach a v prípade potreby hematologických vyšetreniach a klinicko-biochemických testoch s príslušnými základnými hodnotami,
- údaje pre špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy.

Výsledky:

- telesná hmotnosť/zmeny telesnej hmotnosti, vrátane telesnej hmotnosti v čase usmrtenia,
- spotreba potravy a vody, podľa potreby,
- údaje o toxickej reakcii podľa pohlavia a dávky, vrátane príznakov toxicity alebo mortality,
- charakter, závažnosť a trvanie (čas nástupu a následný priebeh) podrobných klinických vyšetrení (s údajmi o reverzibilitate),
- podrobný popis všetkých výsledkov funkčných testov,
- nálezy z autopsie,
- podrobný popis všetkých neurobehaviorálnych, neuropatologických a neurochemických alebo elektrofyziologických nálezov, ak sú k dispozícii,
- údaje o absorpcii a metabolizme, ak sú k dispozícii,
- štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Diskusia k výsledkom:

- informácie o reakcii na dávku,
- vzťah medzi inými toxickými účinkami pre výsledné posúdenie neurotoxického potenciálu testovanej chemikálie,

- hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku.

Záveru:

- potrebné je konkrétne stanovisko k celkovej neurotoxícite testovanej chemikálie.

4. ODKAZY

- (1) OECD Guidance 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.
- (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, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.
- (11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.
- (12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689 – 695.
- (13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343 – 352.
- (14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, 445 – 452.
- (15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368 – 378.

-
- (16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299 – 335.
- (17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, pp. 726 – 742.
- (18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

Tabuľka 1

Minimálny počet zvierat potrebných na skupinu, keď sa štúdia neurotoxicity uskutočňuje samostatne alebo v kombinácii s inými štúdiami

	ŠTÚDIA NEUROTOXICITY SA USKUTOČŇUJE AKO:			
	Samostatná štúdia	Kombinovaná štúdia s 28-dennou štúdiou	Kombinovaná štúdia s 90-dennou štúdiou	Kombinovaná štúdia so štúdiou chronickej toxicity
Celkový počet zvierat na skupinu	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	15 samcov a 15 samíc	25 samcov a 25 samíc
Počet zvierat vybratých na funkčné testovanie, vrátane podrobných klinických vyšetrení	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc
Počet zvierat vybratých na perfúziu fixáciu <i>in situ</i> a neurohistopatológiu	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc
Počet zvierat vybratých na vyšetrovania toxicity pri opakovanej dávke/subchronickej/chronickej toxicity, hematológiu, klinickú biochémiu, histopatológiu atď., ako sa uvádza v príslušných usmerneniach (<i>Guidelines</i>)		5 samcov a 5 samíc	10 samcov † a 10 samíc †	20 samcov † a 20 samíc †
Doplňujúce vyšetrenia, podľa potreby	5 samcov a 5 samíc			

† Vrátane piatich zvierat vybratých na funkčné testovanie a podrobné klinické vyšetrenia ako súčasť štúdie neurotoxicity.

Tabuľka 2

Frekvencia klinických vyšetrení a funkčné testy

Typ vyšetrení		Trvanie štúdie			
		Akútna	28-denná	90-denná	Chronická
U všetkých zvierat	Všeobecný zdravotný stav	denne	denne	denne	denne
	Mortalita/morbidita	dvakrát denne	dvakrát denne	dvakrát denne	dvakrát denne
U zvierat vybraných na funkčné vyšetrenia	Podrobné klinické vyšetrenia	— pred prvou expozíciou — počas 8 hodín po podaní dávky v čase očakávaného maximálneho účinku — v deň 7 a 14 po podaní dávky	— pred prvou expozíciou — potom jedenkrát týždne	— pred prvou expozíciou — počas prvého alebo druhého týždňa expozície — potom mesačne	— pred prvou expozíciou — jedenkrát na konci prvého mesiaca expozície — potom každé tri mesiace
	Funkčné testy	— pred prvou expozíciou — počas 8 hodín po podaní dávky v čase očakávaného maximálneho účinku — v deň 7 a 14 po podaní dávky	— pred prvou expozíciou — počas štvrtého týždňa ošetrovania čo možno najbližšie ku koncu obdobia expozície	— pred prvou expozíciou — jedenkrát počas prvého alebo druhého týždňa expozície — potom mesačne	— pred prvou expozíciou — jedenkrát na konci prvého mesiaca expozície — potom každé tri mesiace

B.44. ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VIVO*

1. METÓDA

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 427 (2004).

1.1. ÚVOD

Mnohé chemické látky pôsobia predovšetkým cez kožu, zatiaľ čo vo väčšine toxikologických štúdií na laboratórnych zvieratách sa používa perorálny spôsob podania. Štúdiá perkutánnej absorpcie *in vivo* stanovená týmto usmernením poskytuje prepojenie potrebné pre extrapoláciu perorálnych štúdií, keď sa vykonáva posudzovanie bezpečnosti po dermálnej expozícii.

Kým sa látka môže dostať do krvného obehu, musí preniknúť cez veľký počet bunkových vrstiev. Vrstva určujúca rýchlosť je pre väčšinu látok *stratum corneum* pozostávajúca z mŕtvych buniek. Priepustnosť cez kožu závisí tak od lipofility chemickej látky, ako aj od hrúbky vonkajšej vrstvy epidermy a od faktorov, ako sú napríklad molekulová hmotnosť a koncentrácia látky. Vo všeobecnosti je koža potkanov a králikov priepustnejšia ako koža človeka, kým priepustnosť kože morčiat a opíc sa väčšmi podobá priepustnosti ľudskej kože.

Metódy merania perkutánnej absorpcie možno rozdeliť do dvoch kategórií; *in vivo* a *in vitro*. Metóda *in vivo* dokáže poskytnúť dobré informácie o absorpcii kožou pri rôznych druhoch laboratórnych zvierat. Nedávno sa vyvinuli metódy *in vitro*. Tieto metódy využívajú transport cez celú alebo čiastočnú hrúbku kože zvierata alebo človeka do zásobníka tekutiny. Metóda *in vitro* je opísaná v samostatnej testovacej metóde (1). Na pomoc pri výbere najvhodnejšej metódy v danej situácii sa odporúča preštudovať *OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies* (2), pretože uvádza sa tam viac podrobností o vhodnosti metód *in vivo*, ako aj *in vitro*.

Pri metóde *in vivo*, ktorá sa tu opisuje, je možné určiť prienik testovanej látky cez kožu do krvného obehu. Táto technika sa široko používa mnoho rokov (3), (4), (5), (6), (7). Hoci štúdie perkutánnej absorpcie *in vitro* môžu byť v mnohých prípadoch vhodné, môžu sa vyskytnúť situácie, keď potrebné údaje môže poskytnúť iba štúdia *in vivo*.

Výhody metódy *in vivo* sú, že používa fyziologický a metabolicky nedotknutý systém, používa živočíšne druhy spoločné mnohým štúdiám toxicity a možno ju modifikovať na použitie s inými živočíšnymi druhmi. Nevýhodami sú používanie živých zvierat, potreba rádioaktívne označeného materiálu na dosiahnutie spoľahlivých výsledkov, ťažkosti pri stanovovaní počiatočnej fázy absorpcie a rozdiely v priepustnosti kože uprednostňovaných druhov (potkan) a ľudskej kože. Zvieracia koža je vo všeobecnosti priepustnejšia, a preto v prípade človeka môže dôjsť k nadhodnoteniu perkutánnej absorpcie (6), (8), (9). Leptavé/žieravé látky by sa nemali testovať na živých zvieratách.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Neabsorbovaná dávka: predstavuje dávku zmytú z povrchu kože po expozícii a akékoľvek množstvo prítomné na neokluzívnom krycom materiáli, vrátane akejkoľvek dávky, ktorá sa preukázateľne odparila z kože počas expozície.

Absorbovaná dávka(*in vivo*): dávka prítomná v moči, vo zvyškoch v kletke, výkaloch, vydychovanom vzduchu (ak sa meria), krvi, tkanivách (ak sa odoberajú) a v zostávajúcich častiach mŕtveho tela po odstránení kože z miesta aplikácie.

Absorbovateľná dávka: je dávka, ktorá je prítomná na koži alebo v koži po omytí.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka, prednostne rádioaktívne označená, sa nanesie na ostrihanú kožu zvierat v jednej úrovni dávky alebo vo viacerých primeraných úrovniach dávok v podobe reprezentatívnej vzorky používaného prípravku. Testovací prípravok možno ponechať v styku s kožou na vopred určený čas pod vhodným krycím materiálom (neokluzívnym, polookluzívnym alebo okluzívnym), aby sa zabránilo požitiu testovacieho prípravku. Po uplynutí času pôsobenia sa krycí materiál odstráni a koža sa vyčistí vhodným čistiacim činidlom, krycí materiál a čistiaci materiál sa uchovávajú na analýzu a aplikuje sa nový krycí materiál. Zvieratá sú pred dobou expozície, počas nej a po nej umiestnené v jednotlivých metabolických kletkách a exkrementy a vydychovaný vzduch sa počas tejto doby odoberajú na analýzu. Zber vydýchaného vzduchu možno vynechať, ak sú dostatočné

informácie o tom, že sa vytvára málo prchavý rádioaktívny metabolit alebo sa nevytvára. Každá štúdia bude zvyčajne obsahovať niekoľko skupín zvierat, ktoré budú exponované testovaciemu prípravku. Jedna skupina bude na konci expozičnej doby usmrtená. Ostatné skupiny budú usmrtené v naplánovaných časových intervaloch (2). Po uplynutí času odberu vzoriek sa usmrtnia ostatné zvieratá, na analýzu sa odoberie ich krv, miesto aplikácie sa odoberie na analýzu a mŕtve telá sa analyzujú so zreteľom na prítomnosť nevyčisteného materiálu. Vzorky sa analyzujú vhodnými prostriedkami a vykoná sa odhad miery perkutánnej absorpcie (6), (8), (9).

1.4. OPIS METÓDY

1.4.1. Výber živočíšnych druhov

Najčastejšie používaným živočíšnym druhom je potkan, možno však použiť aj kmene bez srsti a druhy zvierat, ktorých absorpcia kožou sa väčšmi podobá absorpcii ľudskej kožou (3), (6), (7), (8), (9). Mali by sa používať mladé dospelé zdravé zvieratá rovnakého pohlavia (automaticky zvoleným pohlavím sú samce) kmeňov bežne využívaných v laboratóriách. Na začiatku štúdie by hmotnostné odchýlky medzi použitými zvieratami nemali prevyšovať priemernú hmotnosť o viac než $\pm 20\%$. Vhodní sú napríklad samce potkanov s hmotnosťou 200 g – 250 g, najmä samce v hornej polovici tohto hmotnostného rozsahu.

1.4.2. Počet zvierat a ich pohlavie

Pre každý testovací prípravok a pre každý stanovený čas skončenia treba použiť skupinu najmenej štyroch zvierat rovnakého pohlavia. Každá skupina zvierat bude usmrtená po inom časovom intervale, napríklad na konci expozície (zvyčajne 6 alebo 24 hodín) a pri následných príležitostiach (napr. 48 a 72 hodín). Ak sú dostupné údaje, ktoré predstavujú podstatné rozdiely v dermálnej toxicite medzi samcami a samicami, malo by sa vybrať pohlavie, ktoré je citlivejšie. Ak takéto údaje nie sú dostupné, možno použiť hociktoré pohlavie.

1.4.3. Podmienky umiestnenia a kŕmenia

Teplota experimentálnej miestnosti, kde sú zvieratá umiestnené, by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a prednostne by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosti. Osvetlenie by malo byť umelé so striedaním 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie možno použiť konvenčnú laboratórnu potravu, ktorá by mala byť voľne dostupná spolu s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Počas vykonávania štúdie a prednostne takisto počas aklimatizácie sa zvieratá umiestnia jednotlivé do metabolických kliebok. Keďže rozsypaná potrava a rozliata voda by mohli ohroziť kvalitu výsledkov, mala by sa minimalizovať pravdepodobnosť takýchto udalostí.

1.4.4. Príprava zvierat

Zvieratá sú označené spôsobom, ktorým sa umožňuje ich individuálna identifikácia, a umiestnia sa do kliebok minimálne päť dní pred začiatkom štúdie, aby sa umožnila ich aklimatizácia na laboratórne podmienky.

Po uplynutí aklimatizačného obdobia a približne 24 hodín pred aplikáciou dávok sa na každom zvierati ostrihá z kože srst v oblasti pliec a chrbta. Vlastnosti priepustnosti poškodené a nepoškodené kože sa líšia a treba dbať na to, aby sa zabránilo odieraniu kože. Po odstránení srsti a približne 24 hodín pred aplikovaním testovanej látky na kožu (pozri oddiel 1.4.7) treba povrch kože utrieť acetónom, aby sa odstránil kožný maz. Ďalšie umytie mydlom a vodou sa neodporúča, pretože akýkoľvek zvyšok mydla by mohol podporiť absorpciu testovanej látky. Plocha aplikácie musí byť dostatočne veľká, aby bolo možné spoľahlivo vypočítať absorbované množstvo testovanej chemickej látky na cm² kože, prednostne najmenej na 10 cm². Takáto plocha je prakticky možná v prípade potkanov s telesnou hmotnosťou 200 – 250 g. Po príprave sú zvieratá vrátené do metabolických kliebok.

1.4.5. Testovaná látka

Testovaná látka je entita, ktorej penetračné vlastnosti sa majú zisťovať. V ideálnom prípade by testovaná látka mala byť rádioaktívne označená.

1.4.6. Testovací prípravok

Príprava testovanej látky (napr. čistý, zriedený alebo podľa receptu pripravený materiál obsahujúci testovanú chemickú látku, ktorá sa aplikuje na kožu) by mala byť rovnaká (alebo by mala byť realistickou náhradkou) ako v prípade látky, ktorej môžu byť exponovaní ľudia alebo iné potenciálne cieľové živočíšne druhy. Akékoľvek odchýlky od „používaného“ prípravku, sa musia zdôvodniť. Ak je to potrebné, testovaná látka sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom prenášači. V prípade prenášačov odlišných od vody by mali byť známe absorpčné charakteristiky a potenciálna interakcia s testovanou látkou.

1.4.7. Aplikácia na kožu

Na povrchu kože sa vymedzí miesto aplikácie so špecifickou veľkosťou povrchu. Potom sa na toto miesto rovnomerne aplikuje známe množstvo testovacieho prípravku. Toto množstvo by zvyčajne malo imitovať množstvo, ktorému je potenciálne exponovaný človek, zvyčajne 1 – 5 mg/cm² pre tuhú látku alebo do 10 µl/cm² pre tekutiny. Akékoľvek iné množstvá by sa mali zdôvodniť predpokladanými podmienkami používania, cieľmi štúdie alebo fyzikálnymi vlastnosťami testovacieho prípravku. Po aplikácii musí byť takto ošetrované miesto chránené pred zotretím. Príklad typického zariadenia je uvedený na obrázku 1. Miesto aplikácie sa zvyčajne chráni neokluzívnym krycím materiálom (napr. krycí materiál z priepustnej nylonovej gázy). Pri neurčitých aplikáciách však treba miesto aplikácie uzavrieť. V prípade, že vyparovaním stredne prchavých testovaných látok sa miera výťažnosti testovanej látky znižuje na neprijateľnú úroveň (pozri tiež oddiel 1.4.10 prvý odsek), vyparenú látku je potrebné zachytiť vo filtri z aktívneho uhlia pokrývajúcim aplikačné zariadenie (pozri obrázok 1). Dôležité je, aby aplikačné zariadenie nepoškodzovalo kožu a aby neabsorbovalo testovací prípravok a nereagovalo s ním. Zvieratá sú vrátené do jednotlivých metabolických klieťok na zber exkrementov.

1.4.8. Trvanie expozície a odber vzoriek

Trvanie expozície predstavuje časový interval medzi aplikáciou a odstránením testovacieho prípravku omytím kože. Mala by sa používať vhodná expozičná doba (zvyčajne 6 alebo 24 hodín) na základe predpokladanej dĺžky expozície človeka. Po expozičnej dobe sa zvieratá držia v metabolických klieťkach až do stanoveného skončenia štúdie. Zvieratá treba pozorovať v pravidelných intervaloch počas celého trvania štúdie, či nevykazujú príznaky toxicity/abnormálnych reakcií. Na konci expozičnej doby by sa ošetrovaná koža mala prehliadnuť, či sú na nej viditeľné znaky podráždenia.

Metabolické klieťky by mali počas štúdie umožňovať samostatný odber moču a fekálií. Mali by tiež umožňovať odber oxidu uhličitého ¹⁴C a prchavých zlúčenín uhlíka ¹⁴C, ktoré by sa mali analyzovať, ak sa vytvárajú vo veľkom množstve (> 5 %). Moč, fekálie a zachytené tekutiny (napr. oxid uhlíka ¹⁴C a prchavé zlúčeniny ¹⁴C) by sa mali jednotlivo zbierať pri každej skupine v každom čase odberu vzoriek. Ak existuje dostatok informácií o tom, že sa vytvára iba málo prchavý rádioaktívny metabolit alebo sa nevytvára, môžu sa použiť otvorené klieťky.

Exkrementy sa zbierajú počas doby pôsobenia do 24 hodín od prvého styku s kožou a potom denne do konca experimentu. Hoci zvyčajne budú stačiť tri intervaly zberu exkrementov, predpokladaný účel testovacieho prípravku alebo existujúce kinetické údaje môžu naznačiť vhodnejšie alebo ďalšie časy pre štúdiu.

Na konci expozičnej doby sa ochranné zariadenie odstráni z každého zvieratá a odloží sa oddelene na vykonanie analýzy. Exponovaná koža všetkých zvierat by sa mala omyť najmenej trikrát čistiacim činidlom s použitím vhodných tampónov. Musí sa postupovať opatrne, aby nedošlo ku kontaminácii ostatných častí tela. Čistiacim činidlom by mal byť prostriedok používaný na bežnú hygienu, napr. vodný roztok mydla. Nakoniec by sa koža mala vysušiť. Všetky tampóny a činidlá použité na omývanie, sa musia odložiť na analýzu. Zvieratám v skupinách, ktoré budú zachované na neskoršie pozorovanie, treba pred ich vrátením do jednotlivých klieťok aplikovať čerstvý kryt na ochranu exponovaného miesta.

1.4.9. Záverečné postupy

Jednotlivé zvieratá z každej skupiny by sa mali usmrtiť v plánovanom čase a mala by sa odobrať krv na analýzu. Ochranné zariadenie alebo krycí materiál treba odobrať na analýzu. Z každého zvieratá by sa na osobitnú analýzu mala odobrať koža z miesta aplikácie a vzorka neošetrenej kože z podobnej oblasti zbavennej srsti. Miesto aplikácie možno rozdeliť oddelením *stratum corneum* od spodnej epidermy, aby sa získalo viac údajov o distribúcii testovanej látky. Stanovenie časovej závislosti tejto distribúcie po expozičnej dobe by malo poskytnúť niektoré údaje o osude testovanej chemickej látky v *stratum corneum*. Na uľahčenie rozdelenia kože (po konečnom omytí kože a usmrtení zvieratá) sa odstránia všetky ochranné kryty. Z potkana sa vyreže koža v mieste aplikácie vrátane kruhového okraja kože a príspeďí sa na dosku. Na povrch kože sa pomocou jemného tlaku pritlačí pružok lepiacej pásky a táto páska sa potom odstráni spolu s časťou *stratum corneum*. Postupne sa aplikujú ďalšie pružky pásky, až kým sa už páska nelepí na povrch kože a celá vrstva *stratum corneum* je odstránená. Pre každé zviera možno všetky pružky pásky vložiť spolu do jedného zásobníka, do ktorého sa pridá činidlo na rozpad tkanív, ktorým sa rozpustí *stratum corneum*. Všetky potenciálne cieľové tkanivá možno odobrať na samostatné meranie skôr, ako sa analyzujú telesné zvyšky so zreteľom na dávku absorbovanú mŕtvym telom. Mŕtve telá jednotlivých zvierat by sa mali odložiť na analýzu. Zvyčajne stačí analýza celkového obsahu. Cieľové orgány sa môžu odobrať na samostatnú analýzu (ak to indikujú iné štúdie). Moč, ktorý sa nachádza v močovom mechúre v čase usmrtenia, by sa mal pridať k moču odobratému predtým. Po zbere exkrementov z metabolických klieťok v plánovanom čase usmrtenia by sa klieťky a ich príslušenstvo mali umyť vhodným rozpúšťadlom. Podobne by sa malo analyzovať ostatné potenciálne kontaminované vybavenie.

1.4.10. Analýza

Vo všetkých štúdiách treba dosiahnuť adekvátnu výťažnosť (t. j. stredné hodnoty $100 \pm 10\%$ rádioaktivity). Výťažnosť mimo tohto rozsahu sa musí zdôvodniť. Množstvo podanej dávky v každej vzorke by sa malo analyzovať pomocou vhodne validovaných postupov.

Štatistické hodnotenie by malo obsahovať mieru rozptylu opakovaných meraní pre každú aplikáciu.

2. ÚDAJE

Na každom zvierati, v každom stanovenom čase odberu vzorky by sa pre testovanú chemickú látku a/alebo metabolity mali vykonať nasledujúce merania. Okrem jednotlivých údajov by sa mali hlásiť stredné hodnoty údajov zoskupených podľa časov odberu vzoriek.

- množstvo spojené s ochrannými prostriedkami,
- množstvo, ktoré možno uvoľniť z kože,
- množstvo v/na koži, ktoré nemožno zmyť z kože,
- množstvo obsiahnuté v odobratej vzorke krvi,
- množstvo obsiahnuté v exkrementoch a vo vydychovanom vzduchu (ak je to relevantné),
- množstvo, ktoré zostalo v mŕtvom tele a vo všetkých orgánoch odobratých na samostatnú analýzu.

Množstvo testovanej látky a/alebo metabolitov v exkrementoch, vydychovanom vzduchu, krvi a v mŕtvom tele umožní stanoviť celkové množstvo absorbované v každom čase odberu vzoriek. Možno urobiť aj výpočet množstva testovanej látky absorbovanej jedným cm^2 kože exponovanej testovanej látke počas expozičnej doby.

3. SPRÁVY**3.1. SPRÁVA O TESTE**

Správa o teste musí zahŕňať požiadavky stanovené v protokole vrátane zdôvodnenia použitého testovacieho systému a mala by obsahovať tieto údaje:

Testovaná látka:

- identifikačné údaje [napr. číslo CAS, ak je k dispozícii; zdroj; čistota (rádiochemická čistota); známe nečistoty; číslo šarže],
- fyzikálna povaha, fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita, molekulová hmotnosť a $\log P_{ow}$).

Testovací prípravok:

- zloženie a zdôvodnenie použitia,
- podrobnosti o testovacom prípravku, aplikované množstvo, dosiahnutá koncentrácia, prenášač, stabilita a homogennosť.

Pokusné zvieratá:

- použitý živočíšny druh/kmeň,

- počet, vek a pohlavie zvierat,
- zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, diéta atď.,
- hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky na vykonanie testu:

- podrobnosti o podaní testovacieho prípravku (miesto aplikácie, analytické metódy, okluzívne/neokluzívne, objem, extrakcia, detekcia,
- podrobnosti o kvalite potravy a vody.

Výsledky:

- všetky príznaky toxicity,
- údaje o absorpcii v tabuľkovej forme (vyjadrené ako rýchlosť, množstvo alebo percentuálny podiel),
- celková výťažnosť experimentu,
- interpretácia výsledkov, porovnanie so všetkými dostupnými údajmi o perkutánnej absorpcii testovacej zlúčeniny.

Rozbor výsledkov

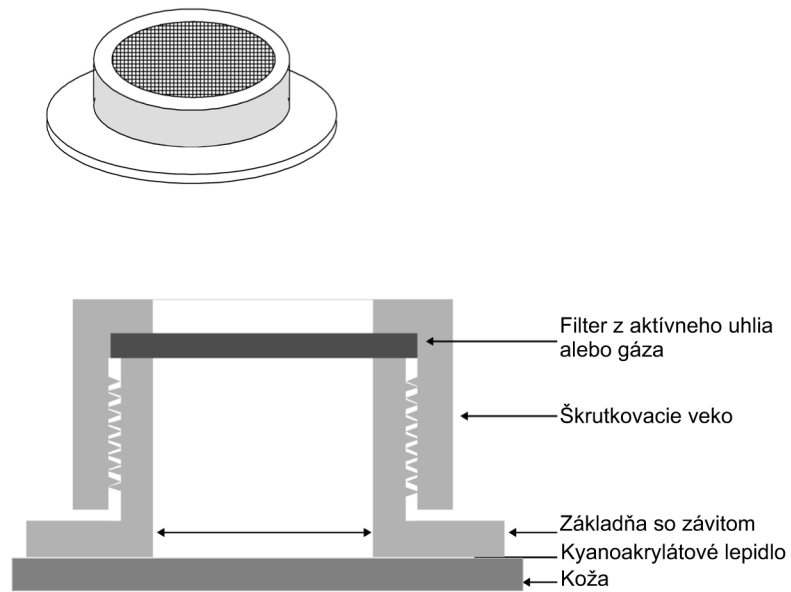
Záver

4. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (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, Pesticides and Toxic Substances.
- (8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus 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.

Obrázok 1

Príklad konštrukčného riešenia typického zariadenia používaného na vymedzenie a ochranu miesta dermálnej aplikácie počas štúdií perkutánnej absorpcie *in vivo*



B.45. ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VITRO*

1. METÓDA

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 428 (2004).

1.1. ÚVOD

Táto metóda je určená na poskytnutie informácií o absorpcii testovanej chemickej látky aplikovanej na vyrezanú kožu. Možno ju kombinovať buď s metódou pre absorpciu kože: metóda *in vivo* (1), alebo sa môže použiť samostatne. Odporúča sa prečítať si Usmerňovací dokument OECD (OECD Guidance Document) pre vykonávanie štúdií kožnej absorpcie (2), ktorý slúži ako pomôcka pri príprave štúdií založených na tejto metóde. Usmerňovací dokument bol pripravený s cieľom uľahčiť výber vhodných postupov *in vitro* na použitie v konkrétnych podmienkach, aby sa zaistila spoľahlivosť výsledkov získaných pomocou tejto metódy.

Metódy určené na meranie kožnej absorpcie a prestupu látky kožou je možné rozdeliť do dvoch kategórií: *in vivo* a *in vitro*. Metódy merania kožnej absorpcie *in vivo* sú dobre zavedené a poskytujú farmakokinetické informácie v rozsahu živočíšnych druhov. Metóda *in vivo* je samostatne opísaná v inej testovacej metóde (1). Metódy *in vitro* sa taktiež používajú mnoho rokov na meranie kožnej absorpcie. Hoci sa formálne validačné štúdie metód *in vitro*, ktoré sú zahrnuté v tejto testovacej metóde, dosiaľ nevykonali, odborníci OECD sa v r. 1999 zhodli, že bolo vyhodnotených dostatočné množstvo údajov na podporu metódy *in vitro* (3). V Usmerňovacom dokumente OECD (2) sú uvedené ďalšie podrobné informácie na podporu metód *in vitro*, vrátane veľkého počtu priamych porovnaní metód *in vitro* a *in vivo*. Existuje veľa monografií zaoberajúcich sa touto problematikou, ktoré poskytujú podrobné základné informácie o používaní metódy *in vitro* (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12). Pri metódach *in vitro* sa meria difúzia chemických látok do kože a ich prienik cez kožu do rezervoáru s tekutinou a môže sa použiť aj neživá koža iba na meranie difúzie, alebo čerstvá metabolicky aktívna koža na súbežné meranie difúzie metabolizmu kože. Tieto metódy našli svoje konkrétne využitie najmä pri porovnávaní prestupu chemických látok do kože a cez kožu z rozličných prípravkov, pričom môžu takisto slúžiť ako užitočné modely na posúdenie perkutánnej absorpcie u človeka.

Táto metóda *in vitro* sa nemôže použiť vo všetkých situáciách a pri všetkých triedach chemických látok. Na úvodné kvalitatívne hodnotenie prieniku látky kožou je možné použiť testovaciu metódu *in vitro*. V niektorých prípadoch môže byť potrebné pokračovať ďalej s údajmi získanými pomocou metódy *in vivo*. Na ďalšie posúdenie situácií, pre ktoré môže byť vhodná metóda *in vitro*, by sa malo postupovať podľa usmerňovacieho dokumentu (2). Ďalšie podrobné informácie na podporu rozhodnutia sú uvedené v (3).

Táto metóda uvádza všeobecné zásady na meranie dermálnej absorpcie a doplnovania testovanej látky s použitím vyrezanej kože. Možno použiť kožu z mnohých cicavcov vrátane človeka. Priepustnosť kože sa zachováva aj po vyrezaní z tela, pretože hlavnou difúznou bariérou je neživá rohovitá vrstva kože (*stratum corneum*); aktívny prenos chemikálií cez kožu sa dosiaľ nedokázal. Ukázalo sa, že koža má schopnosť metabolizovať niektoré chemikálie počas perkutánnej absorpcie (6), ale tento proces nie je limitujúci v zmysle skutočne absorbovanej dávky, aj keď môže mať vplyv na povahu materiálu prechádzajúceho do krvného obehu.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Neabsorbovaná dávka: predstavuje dávku, ktorá sa zmyla z povrchu kože po expozícii, a každú prítomnú na neokluzívnom pokrytí vrátane každej dávky, ktorá sa odparila z kože počas expozície.

Absorbovaná dávka (*in vitro*): hmota testovanej látky, ktorá sa počas určeného času dostala do receptorovej kvapaliny alebo do krvného obehu.

Absorbovateľná dávka (*in vitro*): predstavuje dávku prítomnú na koži alebo v koži po omytí.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka, ktorá môže byť rádioaktívne označená, sa naniesie na povrch vzorky kože oddeľujúcej dve komôrky difúznej bunky. Prv ako sa daná chemická látka odstráni vhodným čistiacim postupom, zostáva na koži počas stanoveného času a za určených podmienok. Počas experimentu sa v stanovených časových bodoch odoberajú vzorky receptorovej kvapaliny a analyzujú z hľadiska prítomnosti testovanej chemickej látky a/alebo metabolitov.

Ak sa používajú metabolicky aktívne systémy, pomocou príslušných metód je možné analyzovať metabolity testovaných chemických látok. Na konci experimentu sa prípadne môže vypočítať distribúcia testovanej chemickej látky a jej metabolitov.

Vo vhodných podmienkach, ktoré sú opísané v tejto metodike a usmerňovacom dokumente (2), sa meria absorpcia testovanej látky počas stanoveného obdobia pomocou analýzy tekutiny v receptorovej kvapaline a ošetrenej kože. Testovaná látka, ktorá zostala v koži, by sa mala pokladať za absorbovanú, ak nemožno preukázať, že absorpciu možno stanoviť na základe hodnôt nameraných v receptorovej kvapaline. Analýza ďalších komponentov (materiál zmytý s kože a zostávajúci vo vrstvách kože) umožňuje vyhodnotenie ďalších údajov, vrátane celkovej distribúcie testovanej látky a percentuálneho podielu výťažnosti testovanej látky.

Na preukázanie funkčnosti a spoľahlivosti testovacieho systému v realizačnom laboratóriu by mali byť dostupné výsledky príslušných referenčných chemických látok a tieto výsledky by mali byť v súlade s uverejnenou literatúrou pre použitú metódu. Túto požiadavku možno splniť testovaním vhodnej referenčnej látky (podľa možnosti s lipofíliou podobnou ako má testovaná látka) súčasne s testovanou látkou alebo poskytnutím adekvátnych údajov z minulosti o mnohých referenčných látkach s rôznou lipofíliou (napr. kofeín, kyselina benzoová a testosterón).

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. Difúzér

Difúzér pozostáva z donorovej komory a receptorovej komory, medzi ktoré sa vkladá koža (príklad typického riešenia difúzéra je zobrazený na obr. 1). Difúzér by mal poskytovať dobré utesnenie okolo kože, umožňovať ľahké odoberanie vzoriek, dobré miešanie receptorového roztoku, ktorý je v kontakte so spodnou stranou kože, a dobrú reguláciu teploty difúzéra a jeho obsahu. Prijateľné sú jednak statické a jednak prietokové difúzéry. Donorové komory sa zvyčajne ponechávajú počas expozície neuzavreté do konečnej dávky testovacieho prípravku. Pri nekonečných aplikáciách a pri niektorých scenároch konečných dávok je však možné donorové komory uzavrieť.

1.4.2. Receptorová kvapalina

Uprednostňuje sa použitie fyziologicky vodivej receptorovej kvapaliny, hoci sa môžu použiť aj iné, ak sa to zdôvodní. Treba uviesť presné zloženie receptorovej kvapaliny. Mala by sa preukázať adekvátne rozpustnosť testovanej chemickej látky v receptorovej kvapaline, aby nepôsobila ako prekážka pre absorpciu. Okrem toho by receptorová kvapalina nemala mať vplyv na integritu kožného preparátu. Rýchlosť prietoku v prietokovom systéme nesmie brániť difúzii testovanej látky do receptorovej kvapaliny. V systéme statického difúzéra by sa kvapalina mala neustále miešať a mali by sa z nej pravidelne odberať vzorky. Ak sa skúma metabolizmus, receptorová kvapalina musí podporovať životaschopnosť kože počas celého experimentu.

1.4.3. Kožné preparáty

Na prípravu kožného preparátu možno použiť kožu človeka alebo iných živočíchov. Je známe, že použitie ľudskej kože je predmetom vnútroštátnych a medzinárodných etických úvah a podmienok. Hoci sa uprednostňuje použitie živej kože, možno použiť neživú kožu za predpokladu, že je možné preukázať integritu kože. Prijateľné sú ako epidermálne membrány (oddelené enzymaticky, teplom alebo chemicky), tak aj koža rozdelená po hrúbke (zvyčajne v hrúbke 200 – 400 µm), získaná pomocou dermatómu. Možno použiť kožu v celej hrúbke, ale malo by sa zabrániť použitiu kože s nadmernou hrúbkou (cca. 1 mm), ak sa to osobitne nevyžaduje na stanovenie testovanej chemickej látky v jednotlivých vrstvách kože. Výber živočíšnych druhov, anatomického miesta a preparačnej techniky sa musí zdôvodniť. Vyžadujú sa prijateľné údaje z minimálne štyroch opakovaných vzoriek na jeden testovací preparát.

1.4.4. Integrita kožného preparátu

Je dôležité, aby koža bola vhodne pripravená. Nevhodná manipulácia môže viesť k poškodeniu rohovitej vrstvy kože (*stratum corneum*), a preto sa musí skontrolovať integrita kožného preparátu. Pri skúmaní metabolizmu kože by sa mala použiť čerstvo vyrezaná koža čo najskôr a za podmienok, o ktorých sa vie, že podporujú metabolickú aktivitu. Všeobecne povedané, čerstvo vyrezaná koža by sa mala použiť v priebehu 24 hodín, ale prijateľná dĺžka času skladovania sa môže líšiť v závislosti od enzymatického systému podieľajúceho sa na metabolizme a od teploty skladovania (13). Ak sa pred použitím kožné preparáty skladujú, je potrebné dokázať, že bariérová funkcia sa zachovala.

1.4.5. Testovaná látka

Testovaná látka je látka, ktorej penetračné vlastnosti sa skúmajú. V ideálnom prípade je testovaná látka rádioaktívne označená.

1.4.6. Testovaný prípravok

Prípravok testovanej látky (napríklad čistý, zriedený alebo vytvorený materiál obsahujúci testovanú látku, ktorá sa aplikuje na kožu) by mal byť rovnaký (prípadne realisticky zástupný) ako prípravok, ktorému môže byť exponovaný človek alebo iný potenciálny živočíšny druh. Každú odchýlku od „používaného“ prípravku je potrebné zdôvodniť.

1.4.7. Koncentrácie a zloženie testovaných látok

Zvyčajne sa používa viac ako jedna koncentrácia testovanej látky obsahujúcej horný rozsah potenciálnych expozícií ľudí. Podobe by sa malo zväziť testovanie rozsahu typických zložení.

1.4.8. Aplikácia na kožu

Pri bežných podmienkach expozície ľudí chemickým látkam sa obvyčajne stretávame s konečnými dávkami. Z tohto dôvodu sa pri teste musí použiť aplikácia, ktorá napodobňuje expozíciu človeka, zvyčajne 1 – 5 mg/cm² pri tuhých látkach a maximálne 10 µl/cm² pri kvapalinách. Množstvo treba zdôvodniť očakávanými podmienkami použitia, cieľmi štúdie či fyzikálnymi charakteristikami testovacieho prípravku. Napríklad aplikácia na povrch kože môže byť nekonečná, ak sa aplikujú veľké množstvá na jednotku plochy.

1.4.9. Teplota

Teplota ovplyvňuje pasívnu difúziu chemikálií (a tým aj ich absorpciu kožou). Difúzna komora a koža by sa mali udržiavať pri konštantnej teplote blízko normálnej teploty kože 32 °C ± 1 °C. Pre rôzne vzhľadové riešenia difuzérov sa vyžadujú rôzne vodné kúpele či teploty nahrievacích blokov na zaistenie toho, že receptor/koža je vo svojej fyziologickej norme. Odporúčaná vlhkosť by mala byť v rozsahu medzi 30 a 70 %.

1.4.10. Dĺžka trvania expozície a odber vzoriek

Expozícia kože testovaciemu prípravku môže trvať počas celého experimentu alebo kratšie (t. j. na napodobnenie špecifického typu expozície človeka). Nadbytočné množstvo testovacieho prípravku sa musí z kože zmyť pomocou vhodného čistiaceho prostriedku a opláchnutá tekutina sa pozbiera na analýzu. Postup odstránenia testovacieho prípravku z kože bude závisieť od očakávaných podmienok použitia a treba ho zdôvodniť. Zvyčajne sa vyžaduje odber vzoriek každých 24 hodín, aby sa umožnila adekvátna charakterizácia absorpčného profilu. Keďže integrita kože sa môže začať po 24 hodinách narušovať, čas odberu vzoriek by zvyčajne nemal presiahnuť 24 hodín. Pri testovaných látkach, ktoré rýchlo prenikajú kožou, to nemusí byť potrebné, ale dlhší časový úsek odberu vzoriek môže byť potrebný v prípade látok, ktoré prenikajú kožou pomaly. Frekvencia odberu vzoriek receptorovej kvapaliny by mala umožniť grafické vyjadrenie absorpčného profilu testovanej látky.

1.4.11. Záverečné postupy

Všetky zložky testovacieho systému sa musia analyzovať, pričom je potrebné stanoviť výťažnosť. To zahŕňa donorovú komoru, oplachovanie povrchu kože, kožný preparát a receptorovú kvapalinu/komoru. V niektorých prípadoch možno kožu rozdeliť na exponovanú oblasť kože a na oblasť kože pod prírubou difuzéra a na *stratum corneum*, epidermu a dermu na účely osobitnej analýzy.

1.4.12. Analýza

Vo všetkých štúdiách je potrebné dosiahnuť adekvátnu výťažnosť (cieľom by malo byť priemerne 100 – 10 % rádioaktivity, pričom všetky odchýlky je potrebné zdôvodniť). Pomocou vhodnej techniky sa analyzuje množstvo testovanej látky v receptorovej kvapaline, kožnom preparáte, tekutine, s ktorou sa opláchla koža, a všetky použité pomôcky.

2. ÚDAJE

Je potrebné zaznamenať analýzu receptorovej kvapaliny, distribúcie testovanej chemickej látky v testovacom systéme a absorpčného profilu látky v čase. Pri použití podmienok konečnej dávky expozície by sa malo vypočítat množstvo látky opláchnutej z kože, množstvo asociované s kožou (a v jednotlivých vrstvách kože, ak sa analyzujú) a množstvo prítomné v receptorovej kvapaline (prietok a množstvo či percentuálny podiel aplikovanej dávky). Absorpcia kožou môže byť niekedy vyjadrená pomocou samotných údajov týkajúcich sa receptorovej kvapaliny. Ak však testovaná látka ostáva na konci štúdie v koži, možno ju bude potrebné zahrnúť do celkového absorbovaného množstva (pozri odsek 66 v odkaze na literatúru 3). Keď sa použijú podmienky konečnej dávky expozície, na základe údajov bude možné vypočítat konštantu priepustnosti (Kp). V tomto prípade nie je dôležitý percentuálny podiel absorbovanej látky.

3. SPRÁVY**3.1. SPRÁVA O TESTE**

Správa o teste musí zahŕňať požiadavky stanovené v protokole vrátane zdôvodnenia použitého testovacieho systému a musí obsahovať tieto údaje:

Testovaná látka:

- fyzikálna povaha, fyzikálno-chemické vlastnosti (aspoň molekulová hmotnosť a pod. a $\log P_{ow}$), čistota (rádiochemická čistota),
- identifikačné údaje (napr. číslo šarže),
- rozpustnosť v receptorovej kvapaline.

Testovací prípravok:

- zloženie a zdôvodnenie použitia,
- homogenita.

Testovacie podmienky:

- zdroje a anatomické miesto odberu kože, spôsob prípravy, podmienky skladovania pred použitím, predchádzajúca expozícia (čistiace látky, antibiotické ošetrenia a pod.), meranie integrity kože, metabolický stav, zdôvodnenie použitia,
- konštrukčné riešenie difuzéra, zloženie receptorovej kvapaliny, rýchlosť prietoku receptorovej kvapaliny či intervaly a postupy odberu vzoriek,
- podrobnosti o aplikácii testovacieho prípravku a kvantifikácia aplikovanej dávky,
- dĺžka expozície,
- podrobnosti o odstraňovaní testovacieho prípravku z kože, napr. oplachovanie kože,
- podrobnosti o analýze kože a všetkých frakčných technikách použitých na preukázanie distribúcie látky v koži,
- postupy umývania difuzéra a zariadenia,
- testovacie metódy, extrakčné techniky, limity detekcie a validácia analytickej metódy.

Výsledky

- celková výťažnosť experimentu (aplikovaná dávka = opláchnutie z kože + koža + receptorová kvapalina + opláchnutia difuzéra),
- zaznamenanie jednotlivých hodnôt výťažnosti z každého oddelenia difuzéra do tabuľky,
- absorpčný profil,
- zaznamenanie údajov o absorpcii do tabuľky (vyjadrené ako rýchlosť, množstvo či percentuálny podiel).

Rozbor výsledkov

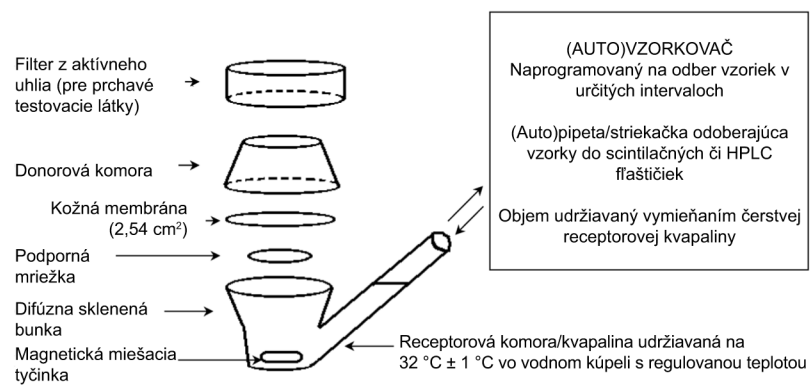
Záver

4. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (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 Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237 – 241.
- (6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- (8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd 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 al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
- (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.

Obrázok 1

Príklad typického riešenia statického difuzéra používaného pri štúdiách perkutánnej absorpcie *in vitro*



ČASŤ C: METÓDY NA STANOVENIE EKOTOXICITY

OBSAH

C.1.	AKÚTNÁ TOXICITA NA RYBÁCH	446
C.2.	TEST AKÚTNEJ IMOBILIZÁCIE DAFNÍÍ (DAPHNIA SP)	456
C.3.	TEST INHIBÍCIE RASTU RIAS	464
C.4.	STANOVENIE „LAHKEJ“ BIODEGRADOVATEĽNOSTI	473
ČASŤ I.	VŠEOBECNÉ ÚVAHY	473
ČASŤ II.	ÚBYTOK ROZPUSTENÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (DOC DIE-AWAY) (metóda C.4-A)	480
ČASŤ III.	MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD (metóda C.4-B)	484
ČASŤ IV.	VÝVOJ OXIDU UHLIČITÉHO (CO ₂) (metóda C.4-C)	488
ČASŤ V.	TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE (metóda C.4-D)	493
ČASŤ VI.	TEST UZAVRETEJ FLAŠE (metóda C.4-E)	497
ČASŤ VII.	TEST M.I.T.I. (metóda C.4-F)	502
C.5.	DEGRADÁCIA – BIOCHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA	514
C.6.	DEGRADÁCIA – CHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA	516
C.7.	DEGRADÁCIA – ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA: HYDROLÝZA AKO FUNKCIA pH	518
C.8.	TOXICITA NA DÁŽĎOVKÁCH	533
C.9.	BIODEGRADÁCIA – ZAHN-WELLENISOV TEST	538
C.10.	BIODEGRADÁCIA – SLMULAČNÉ TESTY NA AKTIVOVANOM KALE	545
C.11.	BIODEGRADÁCIA – TEST RESPIRAČNEJ INHIBÍCIE AKTIVOVANÉHO KALU	559
C.12.	BIODEGRADÁCIA – MODIFIKOVANÝ SCAS-TEST	564
C.13.	BIOKONCENTRÁCIA: PRIETOKOVÝ RYBÍ TEST	571
C.14.	RASTOVÝ TEST MLÁĎAT RÝB	590
C.15.	RYBY, KRÁTKODOBÝ TEST TOXICITY NA EMBRYÁCH A VÝVOJOVOM ŠTÁDIU PLODOVÉHO VAKU	603
C.16.	VČELY OBECNÉ – AKÚTNÝ TEST ORÁLNEJ TOXICITY	618
C.17.	VČELY OBECNÉ – AKÚTNÝ TEST TOXICITY KONTAKTOM	623
C.18.	ADSORPCIA ALEBO DESORPCIA S POUŽITÍM ROVNOVÁŽNEJ METÓDY DÁVKOVANIA	627
C.19.	ODHAD ADSORPČNÉHO KOEFICIENTU (K _{oc}) V PÔDE A V SPLAŠKOVOM KALE ZA POUŽITIA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE (HPLC)	666

C.20.	REPRODUKČNÝ TEST NA <i>DAPHNIA MAGNA</i>	674
C.21.	PÔDNE MIKROORGANIZMY: TEST TRANSFORMÁCIE DUSÍKA	693
C.22.	PÔDNE MIKROORGANIZMY: TRANSFORMAČNÝ TEST UHLÍKA	701
C.23.	AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V PÔDE	709
C.24.	AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V SYSTÉMOCH VODA/SEDIMENT	724

C.1. AKÚTNA TOXICITA NA RYBÁCH

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Účelom tohto testu je stanoviť akútnu letálnu toxicitu látky pre ryby v sladkej vode. Tak ako je to len možné, je výhodné mať informácie o rozpustnosti vo vode, tlaku pár, chemickej stabilite, disociačných konštantách a biodegradabilite látky, aby tieto informácie pomohli pri výbere najvhodnejšej skúšobnej metódy (statická, semistatická alebo prietoková), ktorá uspokojivo zaistí konštantné koncentrácie testovanej látky počas testu.

Ďalšie informácie (napr. štruktúrny vzorec, stupeň čistoty, druh a percentuálne zastúpenie nečistôt, prítomnosť a množstvo aditív a rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda) sa tiež berú do úvahy pri plánovaní testu a pri vyhodnotení výsledkov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Akútna toxicita je rozpoznateľný nepriaznivý účinok indukovaný v organizme počas krátkého času (dni) expozície látky. V tomto teste je akútna toxicita vyjadrená ako stredná letálna koncentrácia (LC_{50}), čo je taká koncentrácia vo vode, pri ktorej uhynie 50 % rýb z testovaného súboru počas kontinuálnej expozície, ktorá musí byť predtým určená.

Všetky koncentrácie testovanej látky sú uvedené v hmotnosti na objem (mg/liter). Môžu byť tiež vyjadrené ako hmotnosť na hmotnosť ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa môžu testovať na účely demonštrovania, že za laboratórnych skúšobných podmienok nedošlo k významnej zmene reakcie testovaných druhov.

Pre tento test nie sú špecifikované žiadne referenčné látky.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Limitný test možno vykonať pri koncentrácii 100 mg/liter na dôkaz, že hodnota LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ryby sú exponované testovanej látke pridanej do vody v rozsahu rôznych koncentrácií počas 96 hodín. Úmrtnosť sa zaznamenáva minimálne v 24-hodinových intervaloch, a ak je to možné, koncentrácie spôsobujúce 50 % úmrtnosť rýb (LC_{50}) sa vypočítajú v každom pozorovacom čase.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Kritériá kvality sa aplikujú pri limitnom teste, ako aj pri úplnej skúšobnej metóde.

Úmrtnosť v kontrolách nesmie presiahnuť 10 % (alebo jednu rybu, ak sa použilo menej ako 10 rýb) na konci testu.

Koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť vyššia ako 60 % z celkovej hodnoty pri saturácii vzduchom.

Koncentrácie testovanej látky sa budú udržiavať v rámci 80 % pôvodných koncentrácií počas celého testu.

Pre látky, ktoré sú ľahko rozpustné v testovacom médiu a ktoré tvoria stabilné roztoky, napríklad tie, ktoré nebudú vo významnej miere prchavé, nebudú sa rozkladať, hydrolyzovať ani adsorbovať, ich počiatočná koncentrácia sa môže považovať za ekvivalentnú k nominálnej koncentrácii. Musí byť dokázané, že koncentrácie sa udržiavali počas celého testu a kritériá kvality sa dodržali.

Pre látky, ktoré sú:

- i) slabo rozpustné v testovacom médiu alebo
- ii) schopné vytvárať stabilné emulzie alebo disperzie, alebo
- iii) nestabilné vo vodných roztokoch,

počiatočná koncentrácia sa bude považovať za koncentráciu meranú v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, meranú vo vodnom stĺpci) na začiatku testu. Koncentrácia sa stanoví až po vytvorení rovnováhy, ale pred použitím testovaných rýb.

Vo všetkých týchto prípadoch sa musia vykonať ďalšie merania počas testu, aby sa potvrdili aktuálne expozičné koncentrácie alebo aby sa dodržali kritériá kvality.

Hodnota pH by sa nemala meniť viac ako v rozsahu jednej jednotky.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Môžu sa použiť tri typy postupov:

Statický test:

Test toxicity, v ktorom nedochádza k žiadnemu toku testovaného roztoku. (Roztoky zostávajú nezmenené počas trvania testu.)

Semistatický test:

Test bez toku testovaného roztoku, ale s pravidelnými obnoveniami testovaných roztokov po určitom období (napr. 24 hodínach).

Prietokový test:

Test toxicity, v ktorom sa voda neustále obnovuje v skúšobných komorách a testovaná látka alebo prípravok sa transportuje vodou používanou na obnovu skúšobného média.

1.6.1. Reagenty

1.6.1.1. Roztoky testovaných látok

Zásobné roztoky požadovanej sily sa pripravujú rozpustením látky v deionizovanej vode alebo vode podľa 1.6.1.2.

Zvolené koncentrácie na testovanie sa pripravujú zriedením zásobného roztoku. Ak sa testujú vysoké koncentrácie, potom sa látka môže rozpustiť priamo vo vode.

Látky by sa normálne mali testovať len po limit rozpustnosti. Pri niektorých látkach (napr. látky s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo vysokou hodnotou P_{OW} alebo tie, ktoré sú schopné tvoriť stabilné disperzie namiesto pravých roztokov vo vode) je prijateľné testovať koncentrácie nad limitom rozpustnosti látky, aby sa zaistilo, že bola dosiahnutá maximálna rozpustná/stabilná koncentrácia. Avšak je dôležité, aby táto koncentrácia nejakým spôsobom nenarušovala testovací systém (napr. film látky na povrchu vody, ktorý bráni oxidácii vody atď.).

Ultrazvuková disperzia, organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo dispergujúce látky možno použiť ako pomôcku pri príprave zásobných roztokov látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo ako pomôcku pri dispergovaní týchto látok v testovacom médiu. Keď sa použijú takéto pomocné látky, potom všetky testované koncentrácie majú obsahovať rovnaké množstvo pomocnej látky a mala by sa vykonať dodatočná kontrola, pri ktorej sú ryby vystavené rovnakej koncentrácii pomocnej látky, aká je použitá v skúšobných sériách. Koncentrácia takýchto pomocných látok by mala byť minimalizovaná, ale v žiadnom prípade by nemala presahovať 100 mg/liter skúšobného média.

Test je potrebné vykonať bez úpravy pH. Ak dochádza k výraznej zmene pH, odporúča sa, aby sa test zopakoval s úpravou pH a výsledky sa zaznamenali. V takomto prípade by sa nemala úprava pH hodnoty zásobného roztoku podľa pH hodnoty vodného roztoku, pokiaľ na to nie je špeciálny dôvod, urobiť. Na tento účel sa odporúča HCl a NaOH. Nadstavenie pH hodnoty je potrebné vykonať takým spôsobom, aby sa koncentrácia testovanej látky v zásobnom roztoku významne nezmenila. Akúkoľvek chemickú reakciu alebo fyzikálnu precipitáciu testovanej látky alebo prípravku počas úpravy hodnoty pH je potrebné uviesť v záznamoch v správe z testu.

1.6.1.2. *Voda pre chov rýb a na riedenie*

Môže sa použiť pitná voda (nekontaminovaná potenciálne škodlivou koncentráciou chlóru, ťažkými kovmi alebo inými látkami), prírodná voda dobrej kvality alebo rekonštituovaná voda (pozri dodatok I). Odporúča sa použiť vodu s celkovou tvrdosťou v rozsahu 10 až 250 mg/liter (ako CaCO_3) a s pH hodnotou v rozmedzí 6,0 až 8,5.

1.6.2. **Prístroje**

Všetky prístroje musia byť vyrobené z chemicky inertného materiálu.

- automatický zriedovací systém (pre prietokový test),
- prístroj na meranie koncentrácie kyslíka,
- zariadenie na stanovenie tvrdosti vody,
- adekvátny prístroj na kontrolu teploty,
- pH meter.

1.6.3. **Testované ryby**

Ryby by mali byť zdravé a bez akýchkoľvek zjavných znetvorení.

Druh rýb sa vyberie len na základe praktických kritérií, ako je ich dobrá dostupnosť počas celého roka, vhodné udržiavanie, vhodnosť na testovanie, relatívna citlivosť na látky alebo prípravky, ako aj každý ekonomický, biologický alebo ekologický faktor, ktorý má nejaký význam. Potrebu porovnateľnosti získaných údajov a existujúcu medzinárodnú harmonizáciu (odkaz 1) je tiež nutné brať do úvahy pri výbere druhu rýb.

Zoznam druhov rýb, ktoré sa odporúčajú pre tento test, je uvedený v dodatku 2; odporúčanými druhmi sú daniel pruhovaný a pstruh dúhový.

1.6.3.1. *Chov*

Testované ryby majú byť z jednej zásoby podobnej dĺžky a veku. Musia sa udržiavať najmenej 12 dní za týchto podmienok:

dávkovanie:

vhodné pre systém (recirkulácia alebo prietok) a druh rýb,

voda:

pozri 1.6.1.2,

svetlo:

12 až 16 hodín osvetlenia denne,

koncentrácia rozpusteného kyslíka:

najmenej 80 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom,

kímenie:

trikrát za týždeň alebo denne, s prerušením 24 hodín pred začiatkom testu.

1.6.3.2. Úmrtnosť (mortalita)

Po 48-hodinovej počiatočnej perióde sa zaznamenáva úmrtnosť, pričom sa aplikujú tieto kritériá:

- viac ako 10 % populácie v priebehu siedmich dní:

zrušenie celej násady,

- medzi 5 % až 10 % populácie:

udržiavacia perióda sa predĺži o ďalších sedem dní.

Ak nedôjde k ďalším úmrtiam, násada je prijateľná, inak sa zruší,

- menej ako 5 % populácie:

násada je prijateľná.

1.6.4. Adaptácia

Predtým, ako sa ryby použijú v teste, musia sa adaptovať aspoň sedem dní na vodu tej istej kvality a teploty, aká sa použije pri teste.

1.6.5. Testovací postup

Definitívnemu testovaniu môže predchádzať vyhľadávací test, aby sa získala informácia o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú v hlavnom teste.

Vykonáva sa jedna kontrola bez testovanej látky, a ak je to možné, tiež sa vykonáva jedna kontrola obsahujúca pomocnú látku, navyše k testovaným sériám.

V závislosti od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej látky alebo prípravku sa vyberie statický, semistatický alebo prietokový test ako vhodný, tak aby spĺňal kritériá kvality.

Ryby sú exponované látke tak, ako je uvedené nižšie:

- trvanie: 96 hodín,
- počet zvierat: aspoň 7 na každú koncentráciu,
- nádrže: vhodnej kapacity vo vzťahu k odporúčenej náplni,
- dávkovanie: maximálne dávkovanie 1 g/liter sa odporúča pre statický a semistatický test, pri prietokovom systéme je prijateľné aj vyššie dávkovanie,
- testovaná koncentrácia: aspoň päť koncentrácií líšiacich sa konštantným faktorom nepresahujúcim 2,2 a tak, ako je to možné, zaberajúcich rozsah od 0 % do 100 % úmrtnosti,
- voda: pozri 1.6.1.2,
- svetlo: 12 až 16 hodín osvetlenia denne,

- teplota: vhodná pre príslušný druh (pozri dodatok 2), ale len v rozsahu ± 1 °C pre každý jednotlivý test,
- koncentrácia rozpusteného kyslíka: nie menej ako 60 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom pri danej teplote,
- kŕmenie: žiadne.

Ryby sa skontrolujú po prvých 2 až 4 hodinách a v 24-hodinových intervaloch. Ryby sa považujú za mŕtve, ak nevykazujú žiadnu reakciu po dotyku na chvostovú stopku a nie sú viditeľné žiadne dýchacie pohyby. Mŕtve ryby sa odstraňujú a zaznamenávajú sa úmrtnosti. Zaznamenávajú sa aj viditeľné abnormality (napr. strata rovnováhy, zmeny v plávaní, zmeny v dýchaní, pigmentácia atď.).

Denne sa musí vykonať meranie pH, rozpusteného kyslíka a teploty.

Limitný test

Pri použití postupov opísaných v tejto metóde limitný test sa môže vykonať pri koncentrácii 100 mg/l, aby sa demonštrovalo, že LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ak sú vlastnosti látky také, že sa nemôže dosiahnuť koncentrácia 100 mg/liter v testovanom roztoku, limitný test sa vykoná pri koncentrácii rovnkej rozpustnosti látky (alebo pri maximálnej koncentrácii, pri ktorej dochádza k tvorbe stabilnej disperzie) v použitom médiu (pozri tiež bod 1.6.1.1).

Limitný test by sa mal vykonať použitím 7 až 10 rýb s rovnakým počtom rýb v kontrole. (Z binomickej teórie vyplýva, že pri použití 10 rýb s nulovou úmrtnosťou je 99,9 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako koncentrácia použitá v limitnom teste. Pri 7, 8 alebo 9 rybách za nulovej úmrtnosti je prinajmenšom 99 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako použitá koncentrácia.)

Pri výskyte úmrtnosti sa musí vykonať kompletná štúdia. Ak sa pozorujú subletálne účinky, tieto by sa mali zaznamenať.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Pre každú periódu expozície, keď boli zapísané pozorovania (24, 48, 72 a 96 hodín), sa zaznamenáva percentuálna úmrtnosť oproti príslušnej koncentrácii na semilogaritmickom papieri.

Keď je to možné, pre každý pozorovací čas by sa mali odhadnúť LC_{50} a limity spoľahlivosti ($p = 0,05$) použitím štandardných postupov, tieto hodnoty sa zaokrúhľia na jedno alebo väčšinou dve platné číslice (príklady zaokrúhlenia na dve číslice: 173,5 na 170, 0,127 na 0,13 a 1,21 na 1,2).

V tých prípadoch, keď sklon krivky koncentrácia/percentá je príliš strmý a neumožňuje výpočet LC_{50} , stačí grafický odhad tejto hodnoty.

Keď v dvoch po sebe nasledujúcich koncentráciách v pomere 2,2 dochádza len k 0 % a 100 % úmrtnosti, tieto dve hodnoty stačia na indikovanie rozsahu, do ktorého patrí LC_{50} .

Ak sa pozoruje, že nemožno udržať stabilitu ani homogenitu testovanej látky, toto by sa malo zaznamenať a výsledky by sa mali interpretovať so zvýšenou pozornosťou.

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- informácie o testovaných rybách (vedecký názov, kmeň, dodávateľ, predbežné ošetrenie, veľkosť a počet rýb použitých pri každej testovanej koncentrácii),
- zdroj vody a jej hlavné chemické charakteristiky (pH, tvrdosť, teplota),

- v prípade látky s nízkou rozpustnosťou metódy prípravy zásobného a skúšobného roztoku,
- koncentráciu všetkých pomocných látok,
- zoznam použitých koncentrácií a všetky dostupné informácie týkajúce sa stability testovanej látky alebo prípravku pri daných koncentráciách v testovanom roztoku,
- použité metódy a získané výsledky, ak sa vykonala analýza látky alebo prípravku,
- výsledky limitného testu, ak sa vykonali,
- dôvody na výber testu a detaily použitého skúšobného postupu (napr. statický, semi-statický, dávkovanie, informácia o prevzdušňovaní, dávkovanie rýb a pod.),
- opis skúšobného zariadenia,
- režim osvetlenia,
- koncentráciu rozpusteného kyslíka, pH hodnoty a teploty skúšobných roztokov každých 24 hodín,
- dôkaz, že boli splnené kritériá kvality,
- tabuľku uvádzajúcu kumulatívnu úmrtnosť pri každej koncentrácii a kontrolu (a tiež kontrolu s pomocnou látkou, ak je to potrebné) pri všetkých odporučených pozorovacích časoch,
- graf závislosti koncentrácia/percentá na konci testu,
- ak je to možné, hodnoty LC_{50} pri každom z odporučených pozorovacích časov (s 95 % limitom spoľahlivosti),
- štatistické postupy použité pri stanovení hodnôt LC_{50} ,
- výsledky získané s referenčnou látkou, ak sa použila;
- najvyššiu testovanú koncentráciu nespôsobujúcu úmrtnosť počas celého testu,
- najnižšiu testovanú koncentráciu spôsobujúcu 100 % úmrtnosť počas celého testu.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- (2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.
- (3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow Through methods – NFT 90-305 June 1985.
- (4) ISO 7346/1, 2 and 3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* 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 (L 1) und L(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, macroinvertebrates 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.
 - (11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
 - (12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWAPCF, 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. Rudolph, 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 bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3 – 32.
 - (19) Stephan, C. E. Method for calculating an LC₅₀ 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 LC₅₀ US EPA.

Dodatok 1

Rekonštituovaná voda*Príklad vhodnej rozpúšťacej vody*

Všetky chemické látky musia byť analytickej čistoty.

Voda má byť destilovaná, dobrej kvality alebo deionizovaná s vodivosťou menej ako $5 \mu\text{Scm}^{-1}$.

Prístroj na destiláciu vody nesmie obsahovať žiadne časti vyrobené z medi.

Zásobné roztoky

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (dihydrát chloridu vápenatého): 11,76 g

Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (heptahydrát síranu horečnatého): 4,93 g

Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

NaHCO_3 (hydrouhličitan sodný): 2,59 g

Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

KCl (chlorid draselný): 0,23 g

Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

Rekonštituovaná rozpúšťacia voda

Zmiešajte 25 ml z každého zo štyroch zásobných roztokov a doplňte do 1 litra vodou.

Prevzdušňujte, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude rovnať koncentrácii nasýtenia vzdušným kyslíkom.

Hodnota pH by mala byť $7,8 \pm 0,2$.

Ak je to potrebné, upravte pH s NaOH (hydroxidom sodným) alebo s HCl (kyselinou chlorovodíkovou).

Takto pripravená rozpúšťacia voda sa nechá stáť asi 12 hodín a nesmie sa ďalej prevzdušňovať.

Celkové množstvo Ca a Mg iónov v tomto roztoku je 2,5 mmol na liter. Pomer Ca: Mg iónov je 4: 1 a pomer Na: K iónov je 10: 1. Celková alkalita roztoku je 0,8 mmol na liter.

Žiadna odchýlka pri príprave rozpúšťacej vody nesmie zmeniť zloženie ani vlastnosti vody.

Dodatok 2

Druhy rýb odporučených na testovanie

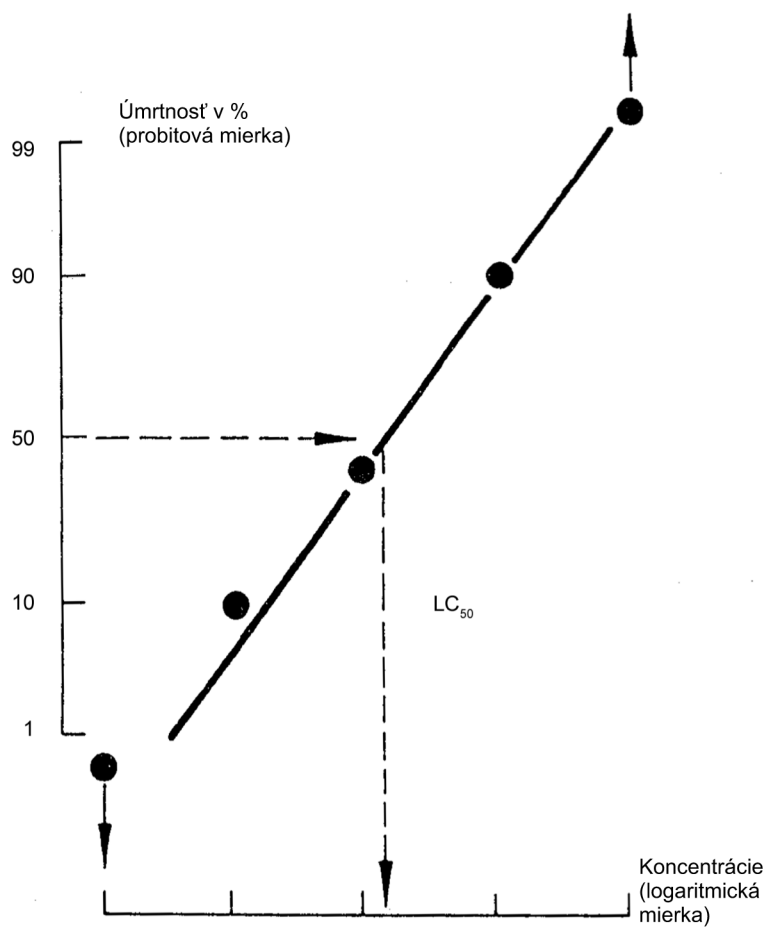
Odporučený druh	Odporučený rozsah teplôt pri teste(° C)	Odporučená celková dĺžka rýb (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton – Buchanan), danio pruhované	20 až 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), Fathead minnow	20 až 24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), kapor obyčajný	20 až 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck a Schlegel 1850), halančík japonský	20 až 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), pávie očko	20 až 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque, Linneaus 1758), slnečnica modrá	20 až 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), pstruh dúhový	12 až 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), jalec zlatý	20 až 24	6,0 ± 2,0

Získavanie rýb

Ryby uvedené v zozname vyššie sa dajú veľmi dobre chovať a sú dostupné počas celého roka. Dajú sa dobre rozmnožovať a chovať na rybárskych farmách alebo v laboratóriu, za kontrolovaných podmienok, čo sa týka ochorení a parazitov, takže testované zvieratá sú zdravé a známeho rodičovského pôvodu. Tieto ryby sú dostupné v mnohých častiach sveta.

Dodatok 3

Príklad krivky závislosti mortality, vyjadrenej v percentách, od koncentrácie

Príklad stanovenia LC_{50} na pravdepodobnostnom logaritmickom papieri

C.2. TEST AKÚTNEJ IMOBILIZÁCIE DAFNÍÍ (DAPHNIA SP.)

1. METÓDA

Táto metóda testu akútnej imobilizácie je ekvivalentná OECD TG 202 (2004).

1.1. ÚVOD

Táto metóda opisuje test akútnej toxicity na posúdenie účinkov chemikálií na dafnie. Existujúce testovacie metódy sa použili v najväčšom možnom rozsahu – pozri (1, 2, 3).

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

V kontexte tejto metódy sa používajú tieto definície:

EC₅₀: je koncentrácia odhadnutá na imobilizovanie 50 % dafnií počas stanovenej expozičnej doby; ak sa použije iná definícia, musí sa to zaznamenať spolu s príslušným odkazom.

Imobilizácia: Tie živočíchy, ktoré nedokážu plávať do 15 sekúnd po jemnom premiešaní testovacej nádoby, sa pokladajú za imobilizované (a to aj keď ešte stále dokážu pohybovať svojimi tykadlami).

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Mladé dafnie, ktoré sú na začiatku testu mladšie ako 24 hodín, sú počas 48 hodín exponované testovanej chemickej látke v rôznych koncentráciách. Imobilizácia sa zaznamenáva po 24 hodinách a 48 hodinách sa porovnáva s kontrolnými hodnotami. Výsledky sa analyzujú, aby sa vypočítali hodnoty EC₅₀ po 48 h (pozri definície uvedené v oddiele 1.2). Stanovenie hodnoty EC₅₀ po 24 hodinách je voliteľné.

1.4. ÚDAJE O TESTOVANEJ CHEMICKEJ LÁTKE

Pre testovanú látku by mala byť známa rozpustnosť vo vode a tlak pary a ďalej by mala byť dostupná spoľahlivá analytická metóda na stanovenie koncentrácie danej látky v testovacom roztoku udanou účinnosťou výťažnosti a mala by byť dostupná medza stanovenia. Medzi užitočné informácie patrí štruktúrny vzorec, čistota látky, stabilita vo vode alebo na svetle, P_{ow} a výsledky testu biodegradácie (pozri metódu C.4).

Poznámka: Usmernenie na testovanie látok, ktorých testovanie je v dôsledku ich fyzikálno-chemických vlastností ťažko uskutočniteľné, sú uvedené v odkazoch na literatúru (4).

1.5. REFERENČNÉ CHEMICKÉ LÁTKY

Ako prostriedok na zaistenie spoľahlivých testovacích podmienok možno referenčnú látku testovať so zreteľom na hodnotu EC₅₀. Na tento účel sa odporúča použiť toxické látky používané pri medzinárodných kruhových testoch – pozri odkazy na literatúru (1, 5) ⁽¹⁾. Test (testy) s referenčnou chemickou látkou by sa mali vykonávať prednostne každý mesiac a najmenej dvakrát ročne.

1.6. KVALITATÍVNE KRITÉRIÁ

Platnosť testu je podmienená splnením týchto kritérií:

- v kontrolných vzorkách, vrátane kontrolnej vzorky obsahujúcej solubilizáčnej činidlo, by nemalo byť imobilizovaných viac ako 10 % dafnií,
- koncentrácia rozpusteného kyslíka na konci testu by mala zodpovedať hodnote > 3 mg/l v kontrolných a testovacích nádobách.

⁽¹⁾ Vo výsledkoch týchto medzilaboratórnych testov a technických korigendách k norme ISO 6341 sa udáva hodnota EC₅₀ po 24 hodinách pre dvojchrómán draselný (K₂Cr₂O₇) v rozsahu od 0,6 mg/l do 1,7 mg/l.

Poznámka: Pri prvom kritériu by viac ako 10 % kontrolných dafnií nemalo vykazovať imobilizáciu ani iné príznaky ochorenia alebo stresu, napríklad zmenu sfarbenia, nezvyčajné správanie, ako je napríklad uviaznutie na hladine vody.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. Aparatúra

Testovacie nádoby a iná aparatura, ktoré prídu do styku s testovacími roztokmi, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Testovacími nádobami sú bežne sklené skúmavky alebo kadičky; pred každým použitím by sa mali vyčistiť štandardnými laboratórnymi postupmi. Testovacie nádoby by sa mali voľne prekryť, aby sa znížili straty vody v dôsledku odparovania a aby sa predišlo vnikaniu prachu do roztokov. Prchavé látky by sa mali testovať v úplne zaplnených a uzavretých nádobách dostatočne veľkých, aby sa zabránilo limitným alebo príliš nízkym koncentráciám kyslíka (pozri oddiel 1.6 a prvý odsek oddielu 1.8.3).

Okrem toho sa budú používať niektoré alebo všetky tieto zariadenia: oxymeter (s mikroelektrodou alebo iným vhodným snímačom na meranie rozpusteného kyslíka vo vzorkách s malým objemom); pH-meter; zodpovedajúca aparatura na kontrolu teploty; vybavenie na stanovenie celkovej koncentrácie organického uhlíka (TOC); vybavenie na stanovenie chemickej spotreby kyslíka (COD); vybavenie na stanovenie tvrdosti atď.

1.7.2. Testovacie organizmy

Preferovaným testovacím druhom *Daphnia magna* Straus, aj keď pri tomto teste možno takisto použiť ďalšie vhodné druhy dafnií (napríklad *Daphnia pulex*). Na začiatku testu by živočíchy mali byť mladšie ako 24 hodín a na zníženie variability sa dôrazne odporúča, aby neboli z prvej generácie potomkov. Mali by pochádzať zo zdravého rodu (t. j. bez príznakov stresu, ako napríklad vysoká mortalita, prítomnosť samcov a epipií, oneskorené liahnutie prvých potomkov, zmena sfarbenia organizmov atď.). Všetky organizmy použité v konkrétnom teste by mali pochádzať z kultúr vypestovaných z rovnakého rodu dafnií. Tento rod živočíchov sa musí uchovávať v kultivačných podmienkach (svetlo, teplota, médium), ktoré sa podobajú podmienkam v použítom teste. Ak sa má v teste použiť kultivačné médium odlišné od rutinného kultivačného média dafnií, je správnu praxou zaradiť predtestové aklimatizačné obdobie. Na tento účel by sa generácia dafnií mala uchovávať v riediacej vode pri testovacej teplote aspoň počas 48 hodín pred začiatkom testu.

1.7.3. Zadrživacia a riediacia voda

Prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako zadrživacia a riediacia voda, ak v nej dafnie prežijú počas celej kultivácie, aklimatizácie a testovania bez príznakov stresu. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatku 1, je vhodná ako testovacia voda. Počas trvania testu by si voda mala mať stále kvalitu. Rekonštituovanú vodu možno vyrobiť pridaním špecifického množstva reagentov uznanej analytickej čistoty do deionizovanej alebo destilovanej vody. Príklady rekonštituovanej vody sú uvedené v odkazoch na literatúru (1), (6) a v dodatku 2. Je dôležité poznamenať, že médiá obsahujúce známe chelačné činidlá, ako sú médiá M4 a M7 v dodatku 2, by sa nemali používať na testovanie látok obsahujúcich kovy. Hodnota pH by mala byť v rozsahu od 6 do 9. Pre *Daphnia magna* sa odporúča tvrdosť vody v rozsahu od 140 do 250 mg/l (ako CaCO_3), pričom pre ostatné druhy dafnií môže byť vhodná aj nižšia tvrdosť vody. Riediacia voda sa pred použitím v teste môže prevzdušňovať, aby sa dosiahla nasýtená koncentrácia rozpusteného kyslíka.

Ak sa používa prírodná voda, parametre kvality by sa mali merať aspoň dvakrát ročne, alebo vždy, keď vznikne podozrenie, že sa tieto parametre mohli výrazne zmeniť (pozri predchádzajúci odsek a prílohu 1). Mal by sa stanoviť aj obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ak sa používa odchlórovaná voda z vodovodu, odporúča sa každodenná analýza obsahu chlóru. Ak riediacia voda pochádza z povrchového alebo podzemného zdroja vody, mali by sa stanoviť jej vodivosť a celkový organický uhlík (TOC) alebo chemického kyslíka (COD).

1.7.4. Testovacie roztoky

Testovacie roztoky so zvolenými koncentraciami sa zvyčajne pripravujú riedením základného roztoku. Zásobné roztoky by sa prednostne mali pripravovať rozpustením testovanej látky v riediacej vode. V najvyššej možnej miere by sa malo zabrániť použitiu rozpúšťadiel, emulgátorov alebo dispergačných činidiel. Tieto činidlá však môžu byť v niektorých prípadoch potrebné na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku. Usmernenie k výberu vhodných rozpúšťadiel, emulgačných a dispergačných činidiel je uvedené v odkaze na literatúru (4). Testovaná látka by rozhodne nemala v testovacích roztokoch presiahnuť hranicu rozpustnosti v riediacej vode.

Test by sa mal vykonať bez úpravy pH. Ak pH nezostane v rozmedzí 6 – 9, potom by sa mohol vykonať druhý test, pri ktorom sa upraví pH základného roztoku na hodnotu, ktorú vykazuje riediaci voda pred pridaním testovanej látky. Úprava hodnoty pH by sa mala vykonať tak, aby sa významne nezmenila koncentrácia zásobného roztoku a aby nedošlo k chemickej reakcii alebo zrážaniu testovanej látky. Prednosť sa dáva použitiu HCl a NaOH.

1.8. POSTUP

1.8.2. **Podmienky expozície**

1.8.1.1. *Testované skupiny a kontrolné vzorky*

Testovacie nádoby sa naplnia príslušným objemom riediacej vody a roztoku testovanej látky. Pomer objemov vzduchu a vody v nádobe by mal byť rovnaký pre testovanú i kontrolnú skupinu. Potom sa do testovacích nádob vložia dafnie. Pre každú testovaciu koncentráciu a pre každú kontrolnú vzorku by sa malo použiť najmenej 20 organizmov, rozdelených prednostne do štyroch skupín po piatich organizmoch. Na každý organizmus by sa malo použiť aspoň 2 ml testovacieho roztoku (to znamená 10 ml pre 5 dafní v každej testovacej nádobe). Ak nebude koncentrácia testovanej látky stála, test sa môže vykonať s použitím polostatickej obnovy alebo prietokového systému.

Okrem testovacej série sa musí vykonať jedna séria kontrol s riediacou vodou, a ak je to relevantné, tak aj kontrolná séria obsahujúca solubilizačné činidlo.

1.8.1.2. *Testovacie koncentrácie*

Ak nie sú dostupné informácie o toxicite testovanej látky, možno rozsah koncentrácií konečného testu stanoviť testom na stanovenie rozsahu. Na tento účel sa dafnie exponujú sérii široko odstupňovaných koncentrácií testovanej látky. Každý testovacej koncentrácií by sa malo exponovať päť dafní počas 48 hodín alebo počas kratšieho času a opakovanie testu nie potrebné. Expozičnú dobu možno skrátiť (napríklad na 24 hodín alebo menej), ak za kratší čas možné získať údaje pre test na zistenie rozsahu.

Malo by sa použiť najmenej päť testovacích koncentrácií. Tieto koncentrácie by mali tvoriť geometrický rad s rozdeľovacím koeficientom, ktorý by nemal presiahnuť 2,2. Použitie menej ako 5 koncentrácií by sa malo zdôvodniť. Podľa možnosti by najvyššia testovaná koncentrácia mala vyvolať 100 % imobilizáciu a najnižšia testovaná koncentrácia by nemala mať pozorovateľné účinky.

1.8.2.3. *Inkubačné podmienky*

Teplota by sa mala byť v rozsahu od 18 °C do 22 °C a pri každom jednotlivom teste by teplota mala byť stála v rozpätí ± 1 °C. Odporúča sa cyklus so 16 hodinami svetla a 8 hodinami tmy. Úplná tma je takisto prijateľná, najmä pre testované látky nestabilné na svetle.

Testovacie nádoby sa počas testu nesmú prevzdušňovať. Test sa vykonáva bez úpravy hodnoty pH. Dafnie by sa počas testu nemali kŕmiť.

1.8.1.4. *Dĺžka trvania testu*

Dĺžka trvania testu je 48 hodín.

1.8.2. **Pozorovania**

V každej testovacej nádobe by sa mal skontrolovať počet imobilizovaných dafní po 24 a 48 hodinách od začiatku testu (pozri definície v oddiele 1.2). Okrem imobility by sa malo zaznamenať aj nezvyčajné správanie alebo vzhľad.

1.8.3. **Analytické merania**

Koncentrácie rozpusteného kyslíka a pH sa merajú na začiatku a na konci testu v kontrolných vzorkách a pri najvyššej koncentrácii testovanej látky. Koncentrácia rozpusteného kyslíka v kontrolných testoch by mala zodpovedať kritériu validity (pozri oddiel 1.6). Za bežných okolností by sa hodnota pH pri žiadnom teste nemala zmeniť o viac ako o 1,5 jednotky. Teplota sa zvyčajne meria v kontrolných nádobách alebo v okolitom vzduchu a mala by sa zaznamenávať prednostne nepretržite počas testu alebo aspoň na jeho začiatku a na konci.

Koncentrácia testovanej látky by sa mala zmerať aspoň pri najvyššej a najnižšej testovacej koncentrácii a na začiatku a na konci testu (4). Odporúča sa, aby výsledky boli založené na zmeraných koncentráciách. Ak je však k dispozícii dôkaz preukazujúci, že počas celého testu bola koncentrácia testovanej látky uspokojivo udržiavaná v rozmedzí $\pm 20\%$ menovitej alebo počiatočnej nameranej koncentrácie, je možné výsledky založiť na menovitých alebo nameraných počiatočných hodnotách.

1.9. LIMITNÝ TEST

Pomocou postupov opísaných v tejto metóde možno vykonať limitný test so 100 mg/l testovanej látky alebo do výšky jej rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia) s cieľom preukázať, že hodnota EC_{50} je vyššia ako táto koncentrácia. Limitný test treba vykonať s použitím 20 dafnií (podľa možnosti rozdelených do štyroch skupín po piatich dafniách), pričom rovnaký počet organizmov je aj v kontrolných testoch. Ak dôjde k imobilizácii, mala by sa vykonať úplná štúdia. Akékoľvek nenormálne správanie organizmov by sa malo zaznamenať.

2. ÚDAJE

Údaje by sa mali zhrnúť v tabuľkovej podobe, pričom pri každej exponovanej skupine a kontrolnom teste je potrebné uviesť počet použitých dafnií a imobilizáciu pri každom pozorovaní. Percentuálny podiel imobilizovaných organizmov za 24 hodín a 48 hodín sa vynesie vzhľadom na testované koncentrácie. Údaje sa analyzujú pomocou vhodných štatistických metód (napríklad probitová analýza atď.) s cieľom vypočítať sklon kriviek a hodnôt EC_{50} s 95 % intervalmi spoľahlivosti ($p = 0,05$) (7), (8).

Ak nemožno zo získaných údajov vypočítať EC_{50} štandardnými metódami, mala by byť hodnota EC_{50} aproximovaná ako geometrická stredná hodnota z najvyššej koncentrácie nespôsobujúca imobilizáciu a najnižšej koncentrácie spôsobujúcej 100 % imobilitu.

3. VYKAZOVANIE

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o vykonaní testu musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

- fyzikálna podstata a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné chemické údaje vrátane čistoty.

Testovací živočíšny druh:

- zdroj a živočíšny druh *Daphnia*, dodávateľ zdroja (ak je známy) a použité kultivačné podmienky (vrátane zdroja, druhu a množstva potravy, frekvencie kŕmenia).

Testovacie podmienky:

- opis testovacích nádob: typ nádob, objem roztoku, počet dafnií v každej testovacej nádobe, počet testovacích nádob (replikáty) na jednu koncentráciu,
- metódy prípravy zásobných a testovacích roztokov vrátane použitia akýchkoľvek rozpúšťadiel alebo dispergačných činidiel, použité koncentrácie,
- podrobnosti o riediacej vode: zdroj a kvalitatívne charakteristiky vody (pH, tvrdosť, pomer Ca/Mg, pomer Na/K, zásaditosť, vodivosť atď.); zloženie rekonštituovanej vody, ak sa použila,
- inkubačné podmienky: teplota, intenzita svetla a jeho periodicita, rozpustený kyslík, pH atď.

Výsledky:

- počet a percentuálny podiel dafnií, ktoré boli imobilizované alebo u ktorých sa prejavili nejaké nežiaduce účinky (vrátane nenormálneho správania) v kontrolných vzorkách a v každej exponovanej skupine v jednotlivých časoch pozorovania, a opis povahy pozorovaných účinkov,
- výsledky a dátum vykonania testu s referenčnou látkou, ak sú dostupné,
- menovité testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacích nádobách; takisto by sa mala uviesť výťažnosť metódy a medzu stanovenia,
- všetky fyzikálno-chemické merania teploty, pH a rozpustného kyslíka vykonávané počas testu,
- hodnota EC₅₀ po 48 hodinách pre imobilizáciu spolu s uvedením intervalov spoľahlivosti a grafmi upraveného modelu použitého na výpočet tejto hodnoty, sklony kriviek závislosti odozvy od dávky a ich smerodajná chyba; štatistické postupy použité na stanovenie hodnoty EC₅₀; (ak sa tieto parametre merali aj pre imobilizáciu po 24 hod., mali by sa taktiež uviesť),
- vysvetlenie akejkoľvek odchýlky od testovacej metódy a toho, či táto odchýlka ovplyvnila výsledky testu.

4. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (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.
- (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 LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. Pp 65 – 84
- (8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

DODATOK 1

NIEKTORÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PRIJATELNEJ RIEDIACEJ VODY

Látka	Koncentrácia
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný čpavok	< 1 µg/l
Reziduálny chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organofosfátové pesticídy a polychlórované bifenily	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

DODATOK 2

PRÍKLADY VHODNEJ REKONŠTITUOVANEJ TESTOVACEJ VODY

Testovacia voda ISO (1)

Zásobné roztoky (jedna látka)		Na prípravu rekonštituovanej vody pridajte toto množstvo základného roztoku do 1 litra vody (*)
Látka	Množstvo pridané do 1 litra vody (*)	
Chlorid vápenatý $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11,76 g	25 ml
Síran horečnatý $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4,93 g	25 ml
Uhlíčan sodný NaHCO_3	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KCl	0,23 g	25 ml

(*) Voda s primeranou čistotou, napr. deionizovaná, destilovaná, prípadne voda získaná reverznou osmózou s vodivosťou, ktorá by nemala presahovať $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Elendtovo médium M7 a M4

Aklimatizácia na Elendtovo médium M4 a M7

V niektorých laboratóriách mali ťažkosti pri priamom prenose dafnií do médií M4 a M7. Na druhej strane sa však dosiahol určitý úspech s postupnou aklimatizáciou, t. j. prenosom z vlastného média do 30 % Elendtovho média, potom do 60 % Elendtovho média a následne do 100 % Elendtovho média. Potrebná dĺžka aklimatizačného obdobia môže byť až jeden mesiac.

Príprava

Stopové prvky

Vo vode vykazujúcej vhodnú čistotu, napríklad v deionizovanej, destilovanej, prípadne vo vode získanej reverznou osmózou, sa najprv pripravujú samostatné zásobné roztoky (I) jednotlivých stopových prvkov. Z týchto oddelených zásobných roztokov (I) sa pripraví jeden zásobný roztok (II), ktorý obsahuje všetky stopové prvky (kombinovaný roztok), t. j.:

Zásobný(-é) roztok(-y) I (jedna látka)	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte do vody toto množstvo základného roztoku I (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000-násobná	1,0	0,25
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7 210	20 000-násobná	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-násobná	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000-násobná	1,0	0,25
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3 040	20 000-násobná	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-násobná	1,0	0,25
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 230	20 000-násobná	1,0	0,25
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	335	20 000-násobná	1,0	0,25
ZnCl_2	260	20 000-násobná	1,0	1,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200	20 000-násobná	1,0	1,0

Zásobný(-é) roztok(-y) I (jedna látka)	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte do vody toto množstvo základného roztoku I (ml/l)	
			M4	M7
KI	65	20 000-násobná	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000-násobná	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000-násobná	1,0	1,0
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	5 000	20 000-násobná	—	—
FeSO ₄ 7H ₂ O	1 991	20 000-násobná	—	—

Ako roztok Na₂ EDTA, tak roztok FeSO₄ sa pripraví samostatne, zlejú sa spolu a ihneď sa ošetrí v autokláve.

Týmto sa získa:

2 l Fe-EDTA roztoku		1 000-násobná	20,0	5,0

Médiá M4 a M7

Médiá M4 a M7 sa pripravujú pomocou zásobného roztoku II, makroživín a vitamínov takto:

	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Množstvo zásobného roztoku II pridané na prípravu média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobný roztok II (kombinované stopové prvky)		20-násobná	50	50
Zásobné roztoky s obsahom makroživín (jedna látka)				
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293 800	1 000-násobná	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246 600	2 000-násobná	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-násobná	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000-násobná	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	50 000	5 000-násobná	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000-násobná	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000-násobná	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000-násobná	0,1	0,1
Zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov	—	10 000-násobná	0,1	0,1

Zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov sa pripraví pridaním 3 vitamínov do 1 litra vody týmto spôsobom:

Thiamín hydrochlorid	750	10 000-násobná		
Kyanokobalamín (B ₁₂)	10	10 000-násobná		
Biotín	7,5	10 000		

Kombinovaný vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvótnych častiach. Vitamíny sa pridávajú do média tesne pred použitím.

Poznámka: Precipitácií solí počas prípravy kompletného média sa zabráni pridaním alikvótnych množstiev zásobných roztokov do približne 500 – 800 ml deionizovanej vody a potom sa objem doplní na 1 liter.

Poznámka: Prvýkrát boli informácie o médiu M4 uverejnené v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25 – 33.

C.3. TEST INHIBÍCIE RASTU RIAS**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Účelom tohto testu je stanoviť účinky látky na rast jednobunkových zelených rias. Relatívne krátke (72 hodín) testy môžu zhodnotiť účinky na niekoľkých generáciách. Táto metóda môže byť prispôbená na použitie s niekoľkými druhmi jednobunkových rias, v takomto prípade musí byť uvedený opis použitej metódy spolu s uvedením výsledkov v správe z testu.

Táto metóda sa najľahšie použije pre látky rozpustné vo vode, kde je pravdepodobné, že v podmienkach testu zostanú vo vode.

Metóda sa môže použiť pre látky, ktoré priamo neinterferujú s meraním rastu rias.

Pokiaľ je to len možné, je žiaduce mať informácie o rozpustnosti vo vode, tlaku pár, stabilite, disociačných konštantách a biodegradabilite látky pred začiatkom testu.

Ďalšie informácie [napr. štruktúrny vzorec, stupeň čistoty, druh a percentuálne zastúpenie nečistôt, prítomnosť a množstvo aditív (prísad) a rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda] sa tiež berú do úvahy pri plánovaní testu a pri interpretácii výsledkov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Bunková hustota: počet buniek na mililiter.

Rast: prírastok bunkovej hustoty počas trvania testu.

Rýchlosť rastu: prírastok bunkovej hustoty na jednotku času.

EC₅₀ v tejto metóde je koncentrácia testovanej látky, ktorá spôsobí 50 % zníženie rastu (E_bC₅₀) alebo rýchlosti rastu (E_rC₅₀) vzhľadom na kontrolu.

NOEC (koncentrácia bez pozorovaného účinku): v tejto metóde je to najvyššia testovaná koncentrácia, pri ktorej sa nepozoruje výrazná inhibícia rastu vzhľadom na kontrolu.

Všetky koncentrácie testovanej látky sú uvedené v hmotnosti na objem (mg na liter). Môžu byť tiež vyjadrené v hmotnosti na hmotnosť (mg.kg⁻¹).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa môžu testovať s cieľom preukázať, že v laboratórnych skúšobných podmienkach nedošlo k významnej zmene citlivosti testovaných druhov.

Ak sa použije referenčná látka, potom by mali byť v správe z testu uvedené výsledky, ktoré sa s touto látkou dosiahli. Dvojchróman draselný sa môže použiť ako referenčná látka, ale jeho farba môže ovplyvňovať kvalitu a intenzitu svetla pre bunky a tiež spektrofotometrické stanovenia, ak sa použijú. Dvojchróman draselný sa použil v medzinárodnom inter-laboratórnom teste [pozri odkaz (3) a dodatok 2].

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Limitný test sa môže vykonať pri 100 mg na liter, aby sa preukázalo, že EC₅₀ je väčšia ako táto koncentrácia.

Exponenciálne rastúce kultúry vybraných zelených rias sú exponované rôznymi koncentraciám testovanej látky počas niekoľkých generácií v definovaných podmienkach.

Testované roztoky sa inkubujú počas 72 hodín. Bunková hustota sa v každom roztoku meria aspoň každých 24 hodín. Stanoví sa inhibícia rastu vzhľadom na kontrolnú kultúru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Kritériá kvality sa aplikujú na limitný test aj na kompletnú testovaciu metódu.

Hustota buniek v kontrolných kultúrach by mala vzrásť aspoň o faktor 16 počas troch dní.

Koncentrácie testovanej látky sa budú udržiavať v rámci 80 % pôvodných koncentrácií počas celého testu.

Pre látky, ktoré sú ľahko rozpustné v testovacom médiu a ktoré tvoria stabilné roztoky, napr. tie, ktoré nebudú vo významnej miere prchavé, nebudú sa rozkladať, hydrolyzovať ani adsorbovať, sa ich počiatočná koncentrácia môže považovať za ekvivalentnú k nominálnej koncentrácii. Musí sa dokázať, že koncentrácie sa udržiavali počas celého testu a kritériá kvality sa dodržali.

Pre látky, ktoré sú:

- i) slabo rozpustné v testovacom médiu alebo
- ii) schopné vytvárať stabilné emulzie alebo disperzie, alebo
- iii) nestabilné vo vodných roztokoch,

sa bude počiatočná koncentrácia považovať za koncentráciu meraní na začiatku testu. Koncentrácia sa stanoví až po vytvorení rovnováhy.

Vo všetkých týchto prípadoch sa musia vykonať ďalšie merania počas testu, aby sa potvrdili aktuálne expozičné koncentrácie alebo aby sa dodržali kritériá kvality.

Je známe, že počas testu sa môže významné množstvo testovanej látky vnieť do biomasy rias. Preto s cieľom preukázať súlad s vyššie uvedenými kritériami kvality je potrebné brať do úvahy množstvo látky vnesenej do biomasy rias, ako aj látky v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, merané vo vodnom stĺpci). Avšak stanovenie koncentrácie látky v biomase rias môže predstavovať významné technické problémy, súlad s kritériami kvality sa môže preukázať tak, že sa testuje nádoba s najväčšou koncentráciou látky, ale bez rias, a meria sa koncentrácia v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, merané vo vodnom stĺpci) na začiatku a na konci testu.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. Reagenty

1.6.1.1. Roztoky testovaných látok

Zásobné roztoky požadovanej sily sa pripravujú rozpustením látky v deionizovanej vode alebo vode podľa 1.6.1.2.

Zvolené skúšobné koncentrácie sa pripravujú pridaním vhodných objemov ku kultúram rias (pozri dodatok 1).

Látky sa testujú len po limit rozpustnosti. Pri niektorých látkach (napr. látkach s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo vysokou hodnotou P_{ow} alebo tých, ktoré sú schopné tvoriť stabilné disperzie namiesto pravých roztokov vo vode) je prijateľné testovať koncentrácie nad limitom rozpustnosti látky, aby sa zaistilo, že sa dosiahla maximálna rozpustná/stabilná koncentrácia. Je však dôležité, aby táto koncentrácia nejakým spôsobom nenarušovala testovací systém (napr. film látky na povrchu vody, ktorý bráni okysličovaniu vody atď.).

Ultrazvuková disperzia, organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo dispergujúce látky sa môžu použiť ako pomôcka pri príprave zásobných roztokov látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo ako pomôcka pri dispergovaní týchto látok v testovacom médiu. Keď sa použijú takéto pomocné látky, potom všetky testované koncentrácie majú obsahovať rovnaké množstvo pomocných látok a mali by sa vykonať dodatočné kontroly pri rovnakých koncentráciách pomocných látok, aké sa použijú v skúšobných sériách. Koncentrácia takýchto pomocných látok by mala byť minimalizovaná, ale v žiadnom prípade by nemala presahovať 100 mg na liter skúšobného média.

Test je potrebné vykonať bez úpravy pH. Ak dochádza k výraznej zmene pH, odporúča sa, aby sa test zopakoval s úpravou pH a výsledky sa zaznamenali. V takomto prípade by mala byť upravená pH hodnota zásobného roztoku podľa pH hodnoty vodného roztoku, pokiaľ nie je špeciálny dôvod tak neurobiť. Na tento účel sa odporúča HCl a NaOH. Úpravu pH hodnoty je potrebné vykonať takým spôsobom, aby sa koncentrácia testovanej látky v zásobnom roztoku výrazne nezmenila. Akúkoľvek reakciu alebo fyzikálne vyvrátenie testovanej látky počas úpravy hodnoty pH je potrebné uviesť v správe z testu.

1.6.1.2. Skúšobné médium

V teste by sa mala použiť destilovaná voda dobrej kvality alebo deionizovaná voda s vodivosťou menšou ako $5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Prístroj na destiláciu vody nesmie obsahovať žiadne časti vyrobené z medi.

Odporúča sa použiť toto médium.

Pripravujú sa štyri zásobné roztoky podľa tejto tabuľky. Zásobné roztoky sa sterilizujú membránovou filtráciou alebo autoklavovaním a skladujú sa v tme pri 4°C . Zásobný roztok č. 4 by mal byť sterilizovaný iba membránovou filtráciou. Tieto zásobné roztoky sa zriedia, aby sa dosiahla finálna koncentrácia živín v skúšobných roztokoch.

Živina	Koncentrácia v zásobnom roztoku	Konečná koncentrácia v testovacom roztoku
Zásobný roztok č. 1: makroživiny		
NH_4Cl	1,5 g/l	15 mg/l
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l	12 mg/l
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l	18 mg/l
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l	15 mg/l
KH_2PO_4	0,16 g/l	1,6 mg/l
Zásobný roztok č. 2: Fe-EDTA		
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 mg/l	0,08 mg/l
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l	0,1 mg/l
Zásobný roztok č. 3: stopové prvky		
H_3BO_3	185 mg/l	0,185 mg/l
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l	0,415 mg/l
ZnCl_2	3 mg/l	3×10^{-3} mg/l
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l	$1,5 \times 10^{-3}$ mg/l
$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l	10^{-5} mg/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l	7×10^{-3} mg/l
Zásobný roztok č. 4: NaHCO_3		
NaHCO_3	50 g/l	50 mg/l

Hodnota pH média je po vytvorení rovnováhy so vzduchom približne 8.

1.6.2. Prístroje:

- Normálne laboratórne vybavenie.
- Skúšobné banky vhodného objemu (napr. 250 ml kónické banky sú vhodné, ak je objem skúšobného roztoku 100 ml). Všetky skúšobné banky by mali byť identické, čo sa týka materiálu aj rozmerov.
- Prístroj na kultiváciu. Miestnosť alebo miesto, v ktorom sa môže udržiavať teplota v rozmedzí 21 °C až 25 °C s presnosťou ± 2 °C a môže byť zabezpečené stále, rovnomerné osvetlenie v spektrálnom rozmedzí 400 nm až 700 nm. Ak riasy v kontrolných kultúrach dosiahli odporúčený stupeň rastu, môže sa predpokladať, že podmienky pre rast, vrátane intenzity osvetlenia, sú adekvátne.

Odporúča sa použiť, pri priemernej úrovni skúšobných roztokov, intenzitu svetla v rozsahu 60 až 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (35 až 70×10^{18} fotónov $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), keď sa meria v rozsahu 400 nm až 700 nm s použitím vhodného receptora. V prípade meracieho prístroja kalibrovaného v luxoch je ekvivalentný rozsah od 6 000 × do 10 000 lx.

Osvetlenie možno zabezpečiť štyrmi až siedmimi 30 W žiarivkami univerzálneho typu s bielym svetlom (farebná teplota je približne 4 300 K) pri vzdialenosti 0,35 m od kultúry rias.

- Meranie hustoty buniek by sa malo vykonať s použitím priamej metódy na počítanie živých buniek, napr. mikroskopom s počítačovou komôrkou. Môžu sa však použiť aj iné postupy (fotometria, turbidimetria a pod.), ak sú dostatočne citlivé a ak dostatočne dobre korelujú s hustotou buniek.

1.6.3. Testované organizmy

Odporúča sa použiť rýchlorastúce druhy zelených rias, vhodné na kultivovanie a testovanie. Odporúčajú sa tieto druhy:

- *Selenastrum capricornutum*, napr. ATCC 22662 alebo CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, napr. 86.81 SAG.

Poznámka:

ATCC = American Type Culture Collection (U.S.A.)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (U.K.)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, F.R.G.)

Ak sa použije iný kmeň, je to potrebné uviesť v správe z testu.

1.6.4. Testovací postup

Koncentračný rozsah, v ktorom je pravdepodobné prejavenie sa účinkov, sa stanoví na základe výsledkov z vyhladávacieho testu.

Dve merania rastu (biomasy a stupňa rastu) môžu mať za výsledok úplne rozdielne merania inhibície rastu; obe by sa mali použiť vo vyhladávacom teste rozsahu, aby sa zaistilo, že geometrický nárast koncentrácií umožní určenie E_bC_{50} a E_rC_{50} .

Počiatková hustota buniek

Odporúča sa, aby počiatková hustota buniek bola v skúšobnej kultúre približne 10^4 buniek/ml, ak sa použije *Selenastrum capricornutum* a *Scenedesmus subspicatus*. V prípade iných skúšobných druhoch sa použije podobná koncentrácia biomasy.

Koncentrácie testovanej látky

Pripraví sa aspoň päť koncentrácií v geometrickej sérii v koncentračnom pomere nepresahujúcom 2,2. Najnižšia testovaná koncentrácia by nemala vykazovať žiadny pozorovateľný účinok na rast rias. Najvyššia testovaná koncentrácia by mala inhibovať rast aspoň na 50 % vzhľadom na kontrolu a v najlepšom prípade by mala úplne zastaviť rast.

Paralelky a kontroly

Každú koncentráciu je potrebné testovať v troch paralelkách. Použijú sa tri paralelky na kontrolu bez testovanej látky, a ak je to potrebné, aj tri paralelky na kontrolu s pomocnou látkou. Ak je to oprávnené, potom sa môže test pozmeniť tak, že sa zvýši počet testovaných koncentrácií a zníži sa počet paraleliel na koncentráciu.

Realizácia testu

Testované kultúry obsahujúce vhodné koncentrácie testovanej látky a vhodné množstvo inokula rias sa pripravujú pridaním potrebného množstva zásobných roztokov testovanej látky k vhodnému množstvu pripravenej kultúry rias (pozri dodatok 1).

Kultivačné banky sa umiestnia v kultivačnom prístroji za trepania. Bunky rias sa udržiavajú v suspenzii trepaním, miešaním alebo prebublávaním so vzduchom, aby sa zlepšila výmena plynov a redukovali sa zmeny pH v testovacom roztoku. Kultúry by sa mali udržiavať pri teplote v rozmedzí 21 °C až 25 °C, s presnosťou ± 2 °C.

Hustota buniek v každej banke sa stanoví aspoň 24, 48, a 72 hodín po začatí testu. Filtrované médium, ktoré sa používa na rast rias, obsahujúce vhodnú koncentráciu testovanej látky alebo prípravku, sa použije na stanovenie pozadia, ak sa používa na meranie hustoty buniek iná metóda ako priame spočítavame.

Hodnota pH sa meria na začiatku testu a tiež po uplynutí 72 hodín.

Hodnota pH kontrol by sa nemala normálne odchyľovať viac ako 1,5 jednotky počas celého testu.

Testovanie prchavých látok

V súčasnosti nie je všeobecne prijatý spôsob testovania prchavých látok alebo prípravkov. Keď je o látke známe, že má tendenciu sa odparovať, potom sa môžu použiť uzavreté skúšobné banky so zväčšeným priestorom pre plynnú fázu. Pri výpočte objemu priestoru pre plynnú fázu je potrebné brať do úvahy možnosť nedostatku CO₂. Boli navrhnuté obmeny tejto metódy [pozri odkaz (4)].

Mali by sa vykonať testy na stanovenie množstva látky ostávajúcej v roztoku a odporúča sa mimoriadna pozornosť pri interpretácii výsledkov testov s prchavými látkami alebo prípravkami v uzavretých systémoch.

Limitný test

Limitný test sa môže vykonať pri koncentrácii 100 mg na liter, aby sa preukázalo, že EC₅₀ je väčšia ako táto koncentrácia. Použijú sa postupy opísané v tejto skúšobnej metóde.

Ak sú vlastnosti látky také, že sa nemôže dosiahnuť koncentrácia 100 mg na liter v testovacom roztoku, limitný test by sa mal vykonať pri koncentrácii rovnjej rozpustnosti látky (alebo pri maximálnej koncentrácii, pri ktorej dochádza k tvorbe stabilnej disperzie) v použitom médiu (pozri tiež bod 1.6.1.1).

Limitný test by sa mal vykonať minimálne v troch opakovaniach s rovnakým počtom kontrol. V limitnom teste by sa mali použiť dve merania rastu (biomasa a rýchlosť rastu).

Ak sa v limitnom teste zistí pokles priemernej biomasy alebo rýchlosti rastu rovný alebo väčší ako 25 % oproti kontrole, potom by sa mal vykonať kompletný test.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Nameraná bunková hustota v testovaných kultúrach a kontrolách je uvedená v tabuľke spolu s koncentraciami testovanej látky a časmi merania. Pre každú skúšanú koncentráciu látky a pre kontrolu sa zostrojí rastová krivka v podobe grafu logaritmu strednej hustoty buniek v závislosti od času (0 – 72 hodín).

Na stanovenie vzťahu koncentrácie a účinku by sa mali použiť dva nasledujúce prístupy. Niektoré látky môžu pri nízkych koncentráciách stimulovať rast. Do úvahy sa však berú len údaje indikujúce inhibíciu medzi 0 % a 100 %.

2.1. POROVNANIE PLÔCH POD RASTOVÝMI KRIVKAMI

Plocha medzi rastovými krivkami a horizontálnou líniou $N = N_0$ sa môže vypočítať podľa vzorca

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

kde:

A = plocha,

N_0 = počet buniek/ml v čase t_0 (začiatok testu),

N_1 = nameraný počet buniek/ml pri t_1 ,

N_n = nameraný počet buniek/ml v čase t_n ,

t_1 = čas prvého merania od začiatku testu,

t_n = čas n-tého merania od začiatku testu,

n = počet vykonaných meraní od začiatku testu.

Percentuálna inhibícia rastu buniek pri každej koncentrácii testovanej látky (I_A) sa vypočíta podľa vzorca:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

kde

A_c = plocha medzi rastovou krivkou kontroly a horizontálnou líniou $N = N_0$,

A_t = plocha medzi rastovou krivkou pri koncentrácii t a horizontálnou líniou $N = N_0$,

I_A = Tieto hodnoty sa nanesú na semilogaritmický papier alebo na semilogaritmickoprobítový papier oproti príslušným koncentráciám (koncentrácie sa nanášajú na logaritmickú stupnicu). Ak sa použije probítový papier, tak sa bodmi preloží priamka od oka alebo vypočítaním regresie.

Hodnota EC_{50} sa získa z regresnej čiary odčítaním koncentrácie, ktorá zodpovedá 50 % inhibície ($I_A = 50$ %). Aby sa táto hodnota označila jednoznačne vo vzťahu k tejto výpočtovej metóde, navrhuje sa používanie symbolu E_bC_{50} . Je nevyhnutné, aby E_bC_{50} bola označená vhodnou expozičnou dobou, napr. E_bC_{50} (0 – 72 hodín).

2.2. POROVNANIE RÝCHLOSTÍ RASTU

Priemerná špecifická rýchlosť rastu (μ) pre exponenciálne rastúce kultúry sa môže vypočítať ako:

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0}$$

kde t_0 je čas na začiatku testu.

Alternatívne sa zistí priemerná špecifická rýchlosť rastu zo smernice regresnej priamky v závislosti $\ln N$ oproti času.

Percentuálna inhibícia špecifickej rýchlosti rastu pri každej koncentrácii testovanej látky ($I_{\mu t}$) sa vypočíta podľa vzorca:

$$I_{\mu t} = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

kde

μ_c = stredná špecifická rýchlosť rastu v kontrole.

μ_t = stredná špecifická rýchlosť rastu pri testovanej koncentrácii t.

Percentuálne zníženie priemernej špecifickej rýchlosti rastu pri každej koncentrácii testovanej látky v porovnaní s kontrolnou hodnotou sa vynesie oproti logaritmu koncentrácie. Hodnota EC_{50} sa môže odčítať z výsledného grafu. Na jednoznačné označenie EC_{50} vypočítanej touto metódou sa navrhuje používanie symbolu E_rC_{50} . Doby merania musia byť uvedené, napr. ak sa merania vykonali v čase medzi 0. a 72. hodinou, uvedie sa symbol E_rC_{50} (0 – 72 hodín).

Poznámka: špecifická rýchlosť rastu je vyjadrená v logaritmoch a malé zmeny v rýchlosti rastu môžu viesť k veľkým zmenám v biomase. $E_{5b}C$ a E_rC hodnoty nie sú preto číselne porovnateľné.

2.3. VÝPOČET HODNOTY NOEC

Koncentrácia bez pozorovaného účinku sa stanoví vhodným štatistickým postupom na porovnanie vzoriek (napr. analýza variácií a Dunnettov test) s použitím jednotlivých hodnôt paraleliek v oblastiach pod rastovými krivkami A (pozri bod 2.1) alebo špecifickými stupňami rastu μ (pozri bod 2.2).

3. SPRÁVA

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

- testovaná látka: údaje na identifikáciu látky alebo prípravku,
- testovaný organizmus: pôvod, laboratórnu kultúru, číslo kmeňa, metódu kultivácie,
- podmienky skúšania:
 - dátum začiatku a konca testu a jeho dobu,
 - teplotu,
 - zloženie média,
 - kultivačný prístroj,
 - hodnotu pH roztokov na začiatku a na konci testov (je potrebné podať vysvetlenie, ak sa pozorovali odchýlky pH väčšie ako 1,5 jednotky),
 - vehikulum (pomocné rozpúšťadlo) a metódu, ktorá sa použila na rozpustenie testovanej látky a koncentráciu vehikula v testovaných roztokoch,
 - intenzitu a kvalitu svetla,
 - testované koncentrácie (namerané alebo nominálne),
- výsledky:
 - bunkovú hustotu v každej banke v každom meranom bode a metódu na meranie bunkovej hustoty,

- stredné hodnoty bunkovej hustoty,
- rastové krivky,
- grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,
- hodnoty EC a metódu výpočtu,
- NOEC,
- iné pozorované účinky.

4. ODKAZY

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 201, Decision of the Council C(81) 30 Final.
- (2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*“, in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.
- (3) ISO 8692 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- (4) S. Galassi and M. Vighi – Chemosphere, 1981, vol. 10, 1123 – 1126.

Dodatok 1

Príklad postupu na kultiváciu rias**Všeobecné pozorovania**

Účelom kultivácie na základe predloženého postupu je získať kultúry rias na testovanie toxicity.

Aby sa zabezpečilo, že kultúry rias nie sú kontaminované baktériami, mali by sa použiť vhodné metódy (ISO 4833). Axenické kultúry môžu byť vhodné, ale nevyhnutné sú kultúry s jedným druhom rias.

Všetky činnosti by sa mali vykonať v sterilných podmienkach, aby sa zamedzilo kontaminácii baktériami a inými riasami. Kontaminované kultúry by mali byť odstránené.

Postupy na získanie kultúr rias*Príprava živných roztokov (médii):*

Médium sa môže pripraviť zriedením koncentrovaných zásobných roztokov živín. Na prípravu tuhého média sa pridá 0,8 % agaru. Použité médium by malo byť sterilné. Sterilizácia autoklávaním môže viesť k strate NH_3 .

Kmeňová kultúra:

Kmeňové kultúry sú malé kultúry rias, ktoré sa pravidelne prenášajú do čerstvého média, aby sa použili ako počiatočný testovací materiál. Ak sa kultúry nepoužívajú pravidelne, naočkujú sa do skúmaviek na šikmý agar. Potom sa prenášajú do čerstvého média aspoň raz za dva mesiace.

Kmeňové kultúry sa kultivujú v kónických bankách obsahujúcich vhodné médium (objem okolo 100 ml). Prenos raz týždenne sa vyžaduje, ak sa riasy inkubujú pri teplote 20 °C pri kontinuálnom osvetlení.

Prenesie sa také množstvo „starej“ kultúry so sterilnou pipetou do banky s čerstvým médiom, aby počiatočná koncentrácia rýchlo rastúceho druhu bola asi 100-násobne menšia ako v starej kultúre.

Rýchlosť rastu druhu môže byť stanovená z rastovej krivky. Ak je toto známe, možno určiť hustotu, pri ktorej by sa mala kultúra preniesť do nového média. To sa musí vykonať skôr, ako kultúra dosiahne stacionárnu fázu rastu.

Prípravná kultúra:

Prípravná kultúra je určená na to, aby poskytla potrebné množstvo rias na inokuláciu testovaných kultúr. Prípravná kultúra je inkubovaná za podmienok testu a použije sa, pokiaľ je ešte v exponenciálnom raste, normálne po inkubačnej perióde asi počas troch dní. Kultúry rias obsahujúce deformované alebo abnormálne bunky sa musia odstrániť.

Dodatok 2

Technická norma ISO 8692 – Kvalita vody – Inhibičný test rastu rias v sladkej vode so *Scenedesmus subspicatus* a *Selenastrum capricornutum* uvádza tieto výsledky laboratórnych testov zo 16 laboratórií pri testovaní dvojchrómanu draselného:

	Stredne hodnoty (mg/l)	Rozsah (mg/l)
ErC_{50} (0 – 72 h)	0,84	0,60 až 1,03
EbC_{50} (0 – 72 h)	0,53	0,20 až 0,75

C.4. STANOVENIE „LAHKEJ“ BIODEGRADOVATEĽNOSTI

ČASŤ I. VŠEOBECNÉ ÚVAHY

1.1. ÚVOD

Opísaných je šesť metód, ktoré umožňujú skrining látok a prípravkov na ľahkú biodegradovateľnosť v aeróbnom vodnom médiu:

- Úbytok rozpusteného organického uhlíka (DOC) Die-Away (metóda C.4-A).
- Modifikovaný skriningový test podľa OECD – DOC Die-Away (metóda C.4-B).
- Vývoj oxidu uhličitého (CO₂) (modifikovaný Sturmov test) (metóda C.4-C).
- Manometrická respirometria (metóda C.4-D).
- Test uzavretej fľaše (metóda C.4-E).
- MITI (Ministerstvo medzinárodného obchodu a priemyslu – Japonsko) (metóda C.4-F).

Všeobecné zamerania všetkých šiestich testov sú uvedené v časti I metódy. Položky, ktoré sú špecifické pre jednotlivé metódy, sú uvedené v častiach II až VII. Prílohy obsahujú pojmy, vzorce a návody.

Medzilaboratórny porovnávací test OECD, vykonaný v roku 1988, ukázal, že metódy poskytujú zhodné výsledky. V závislosti od fyzikálneho charakteru látky, ktorá má byť testovaná, sa však môže dávať prednosť určitej metóde.

1.2. VÝBER VHODNEJ SKÚŠOBNEJ METÓDY

Informácie o rozpustnosti látky alebo prípravku, tlaku pár a adsorpčných charakteristikách sú nevyhnutné pri výbere najvhodnejšej metódy. Mal by byť známy chemický vzorec alebo štruktúra, aby sa dali vypočítavať a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, COD (pozri prílohy I a II).

Testované chemické látky, ktoré sú rozpustné vo vode v koncentrácii aspoň 100 mg/l sa môžu hodnotiť všetkými metódami, pokiaľ nie sú prchavé a neadsorbujú sa. Pre látky alebo prípravky, ktoré sú slaboz rozpustné vo vode, prchavé alebo sa adsorbujú, sú vhodné metódy uvedené v tabuľke č. 1. Spôsob, akým sa má zaobchádzať so slaboz rozpustnými a prchavými látkami alebo prchavými prípravkami je opísaný v dodatku 3. Stredne prchavé látky alebo prchavé prípravky sa môžu testovať DOC Die-Away metódou, ak sa zabezpečí dostatok priestoru pre plynnú fázu v skúšobných nádobách (ktoré by mali byť vhodne uzavreté). V takomto prípade sa musí vykonať abiotická kontrola umožňujúca zistenie fyzikálnych strát.

Tabuľka 1

Aplikovateľnosť skúšobných metód

Test	Analytická metóda	Vhodnosť pre chemické látky, ktoré sú:		
		slaboz rozpustné	prchavé	adsorbujúce
DOC. Die Away	rozpustený organický uhlík	—	—	+/-
modifikovaný OECD Die-Away	rozpustený organický uhlík	—	—	+/-
vývoj CO ₂	respirometria: uvoľňovanie CO ₂	+	—	+
manometrická respirometria	manometrická respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+

Test	Analytická metóda	Vhodnosť pre chemické látky, ktoré sú:		
		slabo rozpustné	prchavé	adsorbujúce
uzavretá fľaša	Respirometria: rozpustený kyslík	+/-	+	+
MITI	respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+

Na interpretáciu získaných výsledkov sa požadujú informácie o čistote alebo relatívnom zastúpení jednotlivých zložiek testovaného materiálu, obzvlášť keď sú výsledky malé alebo na okraji detekcie.

Informácie týkajúce sa toxicity testovanej látky alebo prípravku pre baktérie (dodatok 4) môžu byť veľmi užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť nevyhnutné pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Na účely kontroly postupu sa testujú referenčné látky alebo prípravky, ktoré spĺňajú kritériá ľahkej biodegradovateľnosti, ich zaradením vo vhodnej banke paralelne k normálnemu testu.

Vhodnými látkami sú: anilín (čerstvo destilovaný), octan sodný, benzoan sodný. Tieto referenčné látky sa degradujú v týchto metódach, a to aj v prípade, ak sa úmyselne nepridalo inokulum.

Odporúča sa, aby za referenčnú látku bola vyhladaná taká, ktorá je ľahko biodegradovateľná, ale vyžaduje prídavok inokula. Navrhnutý bol hydroftalát draselný, ale je potrebné získať viac informácií o tejto látke, skôr ako môže byť prijatá za referenčnú látku.

Pri respirometrických testoch môže byť ovplyvnená spotreba kyslíka látkami obsahujúcimi dusík procesom nitrifikácie (pozri prílohy II a V).

4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Roztok alebo suspenzia testovanej látky v minerálnom médiu sa inokuluje a inkubuje v aeróbných podmienkach v tme alebo za rozptýleného svetla. Množstvo DOC v testovanom roztoku by sa vzhľadom na inokulum malo udržiavať tak nízko, ako je to len možné v porovnaní s množstvom DOC vzhľadom na testovanú látku. Berie sa zreteľ na endogénnu aktivitu inokula tým, že sa vykonajú paralelne slepé testy s inokulom, ale bez testovanej látky, hoci endogénna aktivita buniek v prítomnosti látky nebude presne súhlasiť s endogénnou aktivitou v kontrole. Referenčná látka sa testuje paralelne, aby sa kontrolovala činnosť postupov.

Degradácia sa vo všeobecnosti sleduje stanovením parametrov, ako sú DOC, tvorba CO₂ a spotreba kyslíka, a merania sa vykonávajú v dostatočných časových intervaloch, aby to umožnilo identifikovať začiatok a koniec biodegradácie. Pri použití automatických respirometrov je meranie kontinuálne. Hodnota DOC sa niekedy meria navyše k inému parametru, ale zvyčajne sa to robí len na začiatku a na konci testu. Takisto sa môžu použiť špecifické chemické analýzy na hodnotenie primárnej degradácie testovanej látky a stanovenie koncentrácie akéhokoľvek vzniknutého medziproduktu (povinné v MITI teste).

Test trvá za normálnych okolností 28 dní. Test sa však môže ukončiť pred uplynutím 28 dní, ak biodegradácia krivka dosiahla stacionárnu úroveň aspoň pri troch stanoveniach. Testy sa tiež môžu predĺžiť, ak z tvaru krivky vyplýva, že biodegradácia sa síce začala, ale ešte nedosiahla stacionárnu úroveň na 28. deň.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. Reprodukovateľnosť

Stanovenia by sa mali vykonať aspoň v dvoch paralelkách, a to kvôli charakteru biodegradácie a zmesových bakteriálnych kultúr použitých ako inokulum.

Je všeobecnou skúsenosťou, že čím väčšia koncentrácia mikroorganizmov sa na začiatku pridá k skúšobnému médiu, tým menšie rozdiely sú medzi paralelkami. Kruhovité testy ukázali, že môže dochádzať k veľkým rozdielom medzi výsledkami získanými v rôznych laboratóriách, ale normálne je dobrá zhoda v prípade ľahko biodegradovateľných látok.

I.5.2. Platnosť testu

Test sa považuje za platný, ak rozdiely extrémnych hodnôt paraleliek pri odstránení testovanej látky alebo prípravku na stacionárnej úrovni na konci testu alebo na konci 10-dňového okna sú menšie ako 20 % a ak percentuálna degradovateľnosť referenčnej látky dosiahla úroveň ľahkej biodegradovateľnosti do 14 dní. Ak sa jedna z týchto podmienok nedodrží, test by sa mal zopakovať. Vzhľadom na presnosť metód nízke hodnoty nemusia nutne znamenať, že testovaná látka nie je biodegradovateľná v environmentálnych podmienkach, ale indikovať, že je potrebné vykonať viac práce pri stanovení biodegradability.

Ak v teste toxicity, obsahujúcom testovanú látku a referenčnú látku alebo prípravok, dôjde k menej ako 35 % degradácii (na základe DOC) alebo menej ako 25 % (na základe ThOD alebo ThCO₂) počas 14 dní, testovaná látka alebo prípravok sa môže považovať za inhibujúce (pozri tiež prílohu IV). Testované série by sa mali zopakovať, ak možno použiť nižšie koncentrácie testovanej látky alebo prípravku a/alebo vyššie koncentrácie inokula, ale nie vyššie ako 30 mg tuhých látok/liter.

I.6. VŠEOBECNÉ POSTUPY A PRÍPRAVA

Všeobecné podmienky aplikované na testy sú sumarizované v tabuľke 2. Prístroje a ostatné experimentálne podmienky, špecificky priradené k jednotlivým testom, sú opísané neskôr pod hlavičkou pre daný test.

Tabuľka 2

Podmienky skúšania

Test	Test Die-Away	Vývoj CO ₂	Manometrická respirometria	Modifikovaný skrinigový test OECD	Uzavretá fľaša	MITI (I)
Koncentrácia testovanej látky v mg/liter			100		2-10	100
mg DOC/liter	10 – 40	10 – 20		10 – 40		
mg TSP/liter			50 – 100		5 – 10	
Koncentrácia inokula (v bunkách/liter približne)	≤ 30 mg/liter SS alebo ≤ 100 ml eluátu na l (10 ⁷ – 10 ⁸)			0,5 ml sekundárneho eluátu na liter (10 ⁵)	≤ 5 ml eluátu na liter (10 ⁴ – 10 ⁶)	30 mg na liter SS (10 ⁷ – 10 ⁸)
Koncentrácia prvkov v minerálnom médiu (mg/liter)						
P	116					29
N	1,3					1,3
Na	86					17,2
K	122					36,5
Mg	2,2					6,6
Ca	9,9					29,7
Fe	0,05 – 0,1					0,15
pH	7,4 ± 0,2					podľa možnosti 7,0

Test	Test Die-Away	Vývoj CO ₂	Manometrická respirometria	Modifikovaný skríningový test OECD	Uzavretá fľaša	MITI (I)
Teplota	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C
DOC = rozpustený organický kyslík		ThoD = teoretická potreba kyslíka		SS = suspendované pevné látky		

I.6.1. Voda na prípravu roztokov

Používa sa deionizovaná alebo destilovaná voda neobsahujúca inhibičné koncentrácie toxických látok (napr. ióny Cu⁺⁺). Musí obsahovať menej ako 10 % organického uhlíka, ktorý sa nachádza v testovanom materiáli. Vysoká čistota skúšobnej vody je nevyhnutná, aby sa eliminovali vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminácia môže pochádzať z vnútorných nečistôt, iontomeniča a lyzovaných baktérií a rias. Pre každú sériu testov použite len úplne totožnú vodu z jednej sady, ktorá je skontrolovaná analýzou DOC. Takáto kontrola nie je nutná pri teste uzavretej fľaše, ale spotreba kyslíka vo vode musí byť nízka.

I.6.2. Zásobné roztoky minerálnych zložiek

Na prípravu skúšobných roztokov sa pripravujú zásobné roztoky minerálnych zložiek vhodnej koncentrácie. Tieto zásobné roztoky sa môžu použiť (pri rozdielnych faktoroch zriedenia) pre metódy DOC Die-Away, modifikovaného skríningového testu OECD, vývoja CO₂, manometrickej respirácie, testu uzavretej fľaše.

Zriedňovacie faktory a špecifická príprava minerálneho média pre test MITI sú uvedené pod hlavičkou špecifických testov.

Zásobné roztoky

Prípravajú sa tieto zásobné roztoky s použitím reagentov analytickej čistoty.

a)	Dihydrogenfosforečnan draselný, KH ₂ PO ₄	8,50 g
	Hydrogénfosforečnan didraselný, K ₂ HPO ₄	21,75 g
	Hydrogénfosforečnan disodný dihydrát Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	33,40 g
	Chlorid amónny, NH ₄ Cl	0,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. Hodnota pH roztoku musí byť 7,4.	
b)	Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl ₂	27,50 g
	alebo chlorid vápenatý dihydrát, CaCl ₂ · 2 H ₂ O	36,40 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
c)	Síran horečnatý heptahydrát, MgSO ₄ · 7 H ₂ O	22,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
d)	Chlorid železitý hexahydrát, FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,25 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	

Poznámka: Aby nebolo potrebné pripravovať tento roztok tesne pred jeho použitím, pridajte jednu kvapku koncentrovanej HCl alebo 0,4 g EDTA na liter.

I.6.3. Zásobné roztoky chemických látok a prípravkov

Podľa vhodnosti napríklad rozpustíte 1 až 10 g testovanej alebo referenčnej látky, alebo prípravku v deionizovanej vode a doplníte do 1 litra, ak rozpustnosť presahuje 1g/l. Inak pripravte zásobný roztok v minerálnom médiu alebo pridajte látku alebo prípravok priamo do minerálneho média. O zaobchádzaní s menej rozpustnými látkami alebo prípravkami pozri prílohu III, v teste MITI (metóda C.4-F) sa však nepoužívajú ani rozpúšťadlá, ani emulzifikátory.

I.6.4. Inokulá

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: napríklad z aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku (bez chlóru), povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí. Ak sa používa aktivovaný kal pre testy DOC Die-Away, vývoj CO₂ a manometrická respirometria, odoberie sa z čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú najmä odpadové splaškové vody z domácností. Inokulá z iných zdrojov dávajú rozptýlenejšie výsledky. Zriedenejšie inokulum bez kalových vločiek je potrebné pre testy: modifikovaný skríningový OECD a test uzavretej fľaše, pričom uprednostňovaným zdrojom je sekundárny výtok z čističky odpadových vôd spracúvajúcej splaškové vody z domácností alebo laboratórna jednotka. Inokulum pre test MITI sa získava zo zmesi zdrojov a je opísané pod hlavičkou tohto špecifického testu.

I.6.4.1. Inokulum z aktivovaných kalov

Odoberie sa čerstvá vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacieho tanku čističky odpadových vôd alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Odstránia sa hrubé častice, a ak je to nutné, použije sa jemné sitko a potom sa udržiava kal v aeróbnych podmienkach.

Alternatívne sa ponechá kal sedimentovať alebo sa odstredí (napr. 10 minút pri 1 100 g) po odstránení všetkých hrubých častíc. Odstráni sa supernatant. Kal sa môže premyť v minerálnom médiu. Suspenduje sa koncentrovaný kal v minerálnom médiu, aby sa získala koncentrácia tuhých častíc 3 až 5 g/l, a prevzdušňuje sa, pokiaľ je to potrebné.

Kal sa odoberie zo správne pracujúcej čističky. Ak sa musí kal odobrať z vysokostupňovej čističky alebo je možné, že obsahuje inhibitory, mal by sa premyť. Po dôkladnom premiešaní sa sedimentuje alebo odstredí resuspendovaný kal, odstráni sa supernatant a premytý kal znovu resuspenduje v ďalšom objeme minerálneho média. Tento postup sa opakuje, pokiaľ sa z kalu neodstráni nadbytok substrátu alebo inhibitor.

Z resuspendovaného alebo neošetreného kalu sa odoberie vzorka tesne pred použitím na stanovenie sušiny suspendovaných tuhých látok.

Ďalšou alternatívou je homogenizácia aktivovaného kalu (3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l). Kal sa prevzdušňuje v mechanickom mixéri 2 minúty pri strednej rýchlosti. Zmiešaný kal sa nechá sedimentovať 30 minút, alebo ak je to potrebné, aj dlhšie, a dekantuje sa kvapalinou na nižšie použitie ako inokulum v množstve 10 ml/l minerálneho média.

I.6.4.2. Ostatné zdroje inokula

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky spracúvajúcej prevažne domáce splaškové vody. Odoberie sa čerstvá vzorka a počas prepravy sa udržiava prevzdušňovaním. Nechá sa sedimentovať asi 1 hodinu alebo sa prefiltruje cez hrubý filtračný papier a udržiava sa kvapalina po odstránení sedimentu alebo filtrát v aeróbnom stave, pokiaľ je to potrebné. Tento typ inokula sa môže použiť až do objemu 100 ml na 1 liter minerálneho média.

Ďalším zdrojom inokula je povrchová voda. V tomto prípade sa odoberie vzorka z vhodnej povrchovej vody, napr. rieky, jazera a udržiava sa v aeróbnom stave. Ak je to potrebné, koncentruje sa inokulum filtráciou alebo odstredením.

I.6.5. Aklimatizácia inokula

Inokulum sa môže aklimatizovať na experimentálne podmienky, ale nie pred adaptovaním k testovanej látke alebo prípravku. Aklimatizácia pozostáva z prevzdušňovania aktivovaného kalu v minerálnom médiu alebo v sekundárnom výtoku počas 5 až 7 dní pri teplote testovania. Aklimatizácia niekedy zlepšuje presnosť skúšobných metód tým, že znižuje hodnoty slepých pokusov. Za nevyhnutné sa to považuje v prípade aklimatizácie inokula v rámci testu MITI.

I.6.6. Abiotické kontroly

Skontroluje sa možnosť abiotickej degradácie testovanej látky stanovením odstránenia DOC, spotreby kyslíka alebo vývoja oxidu uhličitého v sterilných kontrolách neobsahujúcich inokulum. Sterilizuje sa filtráciou cez membránu (0,2 až 0,45 mikrometra) alebo prídavkom vhodnej toxikkej látky vo vhodnej koncentrácii. Ak sa použije membránová filtrácia, odoberie sa vzorka asepticky, aby sa udržala sterilita. Pokiaľ adsorpcia testovanej látky alebo prípravku to vopred nevylučuje, testy, ktoré merajú biodegradáciu ako odstránenie DOC, obzvlášť s inokulom z aktivovaného kalu, by mali zahŕňať abiotickú kontrolu, ktorá sa inokuluje a sterilizuje jedom.

I.6.7. Počet baniek

Počet baniek v typickom teste je uvedený pod hlavičkou každého testu.

Môžu sa použiť tieto typy baniek:

- Testovacia suspenzia: obsahujúca testovanú látku a inokulum.
- Inokulový slepý pokus: obsahujúci len inokulum.
- Kontrola postupu: obsahujúca referenčnú látku a inokulum.
- Abiotická sterilná kontrola: obsahujúca testovanú látku (pozri I.6.6).
- Kontrola adsorpcie: obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizujúcu látku.
- Kontrola toxicity: obsahujúca testovanú látku, referenčnú látku a inokulum.

Stanovenie v skúšobnej suspenzii a inokulovom slepom pokuse sa vykoná paralelne. Odporúča sa tiež vykonať stanovenia aj v iných bankách paralelne.

Toto sa však nemôže vždy uskutočniť. Je potrebné zaistiť, aby sa odobrali dostatočné vzorky alebo vykonalo vhodné odčítanie, umožňujúce, aby sa zhodnotilo percentuálne odstránenie v 10-dňovom okne.

I.7. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Pri výpočte D_t , percentuálnej degradácie, sa použijú stredné hodnoty paralelných meraní parametrov v testovaných nádobách a v inokulovom slepom pokuse. Vzorce sú uvedené v častiach o špecifických testoch. Priebeh degradácie sa zobrazí graficky a vyznačí sa 10-dňové okno. Vypočíta sa a uvedie percentuálne odstránenie, ktoré sa dosiahlo na konci 10-dňového okna, a hodnota stacionárnej úrovne alebo na konci testu, podľa toho, čo je vhodné.

V respirometrických testoch látky obsahujúce dusík môžu ovplyvniť spotrebu kyslíka kvôli prebiehajúcej nitrifikácii (pozri prílohy II a V).

I.7.1. Degradácia meraná pomocou stanovenia DOC

Percentuálna degradácia D_t v každom čase, keď bola odobraná vzorka, by sa mala vypočítať oddelene pre banky obsahujúce testovanú látku použitím strednej hodnoty meraní DOC, aby sa mohla posúdiť platnosť testu (pozri I.5.2). To sa vypočíta na základe tejto rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}} \right) \times 100$$

kde:

D_t = % degradácie v čase t ;

C_o = stredná počiatočná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku (mg DOC/l);

C_t = stredná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku v čase t (mg DOC/l);

C_{b0} = stredná počiatočná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média (mg DOC/l);

C_{bt} = stredná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média v čase t (mg DOC/l).

Všetky koncentrácie sú namerané experimentálne.

I.7.2. Degradácia meraná s použitím špeciálnych analýz

Keď sú dostupné špecifické analytické údaje, primárna biodegradácia sa vypočíta z tejto rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde:

D_t = percentuálna degradácia v čase t , normálne po 28 dňoch;

S_a = zvyškové množstvo testovanej látky v inokulovanom médiu na konci testu (mg);

S_b = zvyškové množstvo testovanej látky v slepom pokuse s vodou/médiom, ku ktorému sa pridala len testovaná látka (mg).

I.7.3. Abiotická degradácia

Ak sa použije abiotická sterilná kontrola, vypočíta sa percento abiotickej degradácie s použitím tejto rovnice:

$$\text{abiotická degradácia v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kde:

$C_{s(o)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň 0;

$C_{s(t)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň t .

I.8. SPRÁVA

Správa z testu by mala mať, ak je to možné, tieto informácie:

- testované a referenčné chemické látky a ich čistotu,
- podmienky skúšania,
- inokulum: povahu a miesto odobrania, koncentráciu a jeho predprípravu,
- pomer a povahu priemyselného odpadu prítomného v splaškových vodách, ak známa,
- dobu trvania testu a jeho teplotu,
- v prípade slabo rozpustných testovaných látok alebo prípravkov ich úpravu,
- aplikovanú testovaciu metódu, mali by byť uvedené vedecké dôvody a vysvetlenia pri akejkoľvek zmene postupu,
- súbor údajov,
- pozorované javy inhibície,
- každú pozorovanú abiotickú degradáciu,
- špecifické chemické analytické údaje, ak sú dostupné,
- analytické údaje o medziproduktoch, ak sú dostupné,

- graf závislosti percentuálnej degradácie oproti času pre testované a referenčnú látku, lag fázu, degradačnú fázu, 10-dňové okno a sklon by mali byť jasne uvedené (dodatok 1). Ak bol test v súlade s kritériami kvality, tak sa stredné hodnoty percentuálnej degradácie v bankách obsahujúcich testovanú látku môžu použiť na tvorbu grafu,
- percentuálne vyjadrenie odstránenia po 10-dňovom okne a v stacionárnej fáze alebo na konci testu.

ČASŤ II. ÚBYTOK ROZPUSTENÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (DOC DIE-AWAY) (Metóda C.4-A)

II.1. PRINCÍP METÓDY

Známy objem inokulovaného minerálneho média so známou koncentráciou testovanej látky (10 až 40 mg DOC/l) ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa prevzdušňuje za tmny alebo pri difúznom svetle pri teplote 22 ± 2 °C.

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

II.2. OPIS METÓDY

II.2.1. Prístroje

- a) Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.
- b) Trepačka prispôbená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty, alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.
- c) Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.
- d) Analyzátor DOC.
- e) Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.
- f) Odstredivka.

II.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridá po 1 ml roztokov b) až d) a doplní do 1 litra vodou.

II.2.3. Príprava a prekondicionovanie inokula

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri: I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4. Príprava baniek

Ako príklad sa do dvojlitrových kónických baniek s obsahom 800 ml minerálneho média pridajú vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/l. Skontroluje sa pH hodnoty, a ak je to potrebné, upraví sa na hodnotu 7,4. Inokulujú sa banky s aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula (pozri bod I.6.4), aby sa získala koncentrácia suspendovaných tuhých častíc menšia ako 30 mg/l. Pripravajú sa tiež inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej látky alebo referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbuje na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplňa sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

II.2.5. Počet baniek v typickom teste

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

Odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

II.2.6. Realizácia testu

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pod –18 °C dlhší čas.

II.3. ÚDAJE A SPRÁVA

II.3.1. Spracovanie výsledkov

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenávajú na poskytnutý záznamník údajov.

II.3.2. **Platnosť výsledkov**

Pozri I.5.2.

II.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

II.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST DOC DIE-AWAY

1. **LABORATÓRIUM**2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ...mg/l chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu: ...mg/l chemickej látky.

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. **STANOVENIE UHLÍKA**

Analyzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Testovaná látka a inokulum	1	a ₁					
		a ₂					
		a, stredná hodnota C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, stredná hodnota C _{b(t)}					

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Inokulový slepý pokus bez. testovanej chemickej látky	3	c ₁					
		c ₂					
		c, stredná hodnota C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, stredná hodnota C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		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				
Stredná hodnota ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

⁽¹⁾ Z hodnôt D₁ a D₂ by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (NEPOVINNÁ)

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	C _{a(l)}	C _{a(t)}

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S _b	

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Inokulované skúšobné médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ III. MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD (METÓDA C.4-B)

III.1. PRINCÍP METÓDY

Odmeraný objem minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky (10 až 40 mg DOC/l), ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa inokuluje s 0,5 ml odtoku z čistiarne odpadových vôd na liter média. Zmes sa prevzdušňuje v tme alebo pri difúznom osvetlení pri teplote 22 ± 2 °C.

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

III.2. OPIS METÓDY

III.2.1. Prístroje

- Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.
- Trepačka prispôbená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.
- Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.
- Analyzátor DOC.
- Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.
- Odstredivka.

III.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku a) s 80 ml vody, pridá po 1 ml roztokov b) až d) a doplní sa do 1 litra vodou.

Táto metóda používa len 0,5 ml inokula na liter, a preto môže vzniknúť potreba fortifikácie média stopovými prvkami a rastovými faktormi. To sa dosiahne pridaním 1 ml z týchto roztokov na liter konečného média:

Roztok stopových prvkov:

Síran mangánatý tetrahydrát, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinočnatý heptahydrát, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamónny, $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe (FeCl_3 s kyselinou etyléndiamíntetraoctovou)	100,0 mg

Rozpustíte vo vode a doplníte vodou na 1 liter.

Vitamínový roztok:

Kvasničný extrakt

15,0 mg

Kvasničný extrakt rozpustíte v 100 ml vody. Sterilizujte filtráciou cez 0,2-mikrónovú (μm) membránu alebo pripravte čerstvý roztok.

III.2.3. **Príprava a prekondicionovanie inokula**

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Pozri I.6.4.2 a I.6.5.

Použije sa 0,5 ml na liter minerálneho média.

III.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad pridajte 800 ml minerálneho média do 2-litrových kónických baniek a pridajte vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/liter. Skontrolujte pH hodnoty, a ak je to potrebné, upravte ich na 7,4. Inokulujte banky s kanalizačným výtokom 0,5 ml/liter (pozri I.6.4.2). Tiež pripravte inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej alebo referenčnej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbuje na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplňa sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

III.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

III.2.6. **Realizácia testu**

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pod –18 °C dlhší čas.

III.3. ÚDAJE A SPRÁVA

III.3.1. Spracovanie výsledkov

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenávajú na poskytnutý záznamník údajov.

III.3.2. Platnosť výsledkov

Pozri I.5.2.

III.3.3. Správa

Pozri I.8.

III.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD

1. LABORATÓRIUM

2. DÁTUM ZAČIATKU TESTU

3. TESTOVANÁ LÁTKA

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ...mg/l chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu: ...mg/l chemickej látky

4. INOKULUM

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. STANOVENIE UHLÍKA

Analýzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l ¹)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Testovaná látka a inokulum	1	a ₁					
		a ₂					
		a, stredná hodnota C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, stredná hodnota C _{b(t)}					
Inokulový slepý pokus bez. testovanej chemickej látky	3	c ₁					
		c ₂					
		c, stredná hodnota C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, stredná hodnota C _{d(t)}					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		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				
Stredná hodnota ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

⁽¹⁾ Z hodnôt D₁ a D₂ by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (NEPOVINNÁ)

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	$C_{a(0)}$	$C_{a(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Prímárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S_b	
Inokulované skúšobné médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ IV. VÝVOJ OXIDU UHLIČITÉHO (CO₂) (METÓDA C.4-C)

IV.1. PRINCÍP METÓDY

Odmeraný objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúceho známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (10 až 20 mg DOC alebo TOC/l) ako nominálneho jediného zdroja organického uhlíka sa prevzdušňuje prechodom vzduchu neobsahujúceho CO₂ v kontrolovaných podmienkach za tmy alebo pri difúznom osvetlení. Degradácia sa meria počas 28 dní stanovovaním uvoľňovaného CO₂, ktorý sa zachytáva v hydroxide bárnatom alebo hydroxide sodnom a ktorý sa meria titráciou zvyškového hydroxidu alebo ako anorganický uhlík. Množstvo produkovaného CO₂ z testovanej látky alebo prípravku (upravené na hodnotu slepého inokulového pokusu) sa vyjadrí ako percento ThCO₂. Stupeň biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy DOC vykonanej na začiatku a na konci inkubácie.

IV.2. OPIS METÓDY

IV.2.1. Prístroje

- 2-až 5-litrové banky, vybavené s aeračnou trubicou, dosahujúcou takmer na dno nádoby a výstupnou trubicou;
- magnetické miešadlá, keď sa hodnotia slabšie rozpustné látky alebo prípravky;
- fľaše na absorbovanie plynu;
- zariadenie na kontrolu a meranie prietoku vzduchu;
- prístroj na odstránenie CO₂ pri príprave vzduchu, ktorý neobsahuje CO₂; prípadne sa môže použiť zmes kyslíka neobsahujúceho CO₂ a dusíka neobsahujúceho CO₂ z plynových fliaš v správnom pomere (20 % O₂ : 80 % N₂);
- zariadenie na stanovenie CO₂, a to buď titráciou, alebo nejakým analyzátorom anorganického uhlíka;
- zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);
- analyzátor DOC (nepovinné).

IV.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov b) až d) a doplňte vodou do 1 litra.

IV.2.3. Príprava a prekondicionovanie inokula

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4. Príprava baniek

Ako príklad sa uvádzajú nasledujúce objemy a hmotnosti pre 5-litrové banky obsahujúce 3 litre suspenzie. Ak sa použijú menšie objemy, tieto hodnoty je potrebné podľa nich upraviť, ale je potrebné zaistiť, aby bolo možné presne merať vytváraný oxid uhličitý.

Do každej 5-litrovej banky pridajte 2 400 ml minerálneho média. Pridajte vhodný objem pripraveného aktivovaného kalu (pozri I.6.4.1 a I.6.5) tak, aby získaná koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/l v konečnej 3-litrovej inokulovanej zmesi. Alternatívne najskôr zriedte pripravený kal v minerálnom médiu na suspenziu s koncentráciou 500 až 1 000 mg/l pred pridaním daného objemu do 5-litrovej banky tak, aby sa získala koncentrácia 30 mg/l; to zaistí väčšiu presnosť. Môžu byť použité aj iné zdroje inokula (pozri I.6.4.2).

Cez noc prevzdušňujte tieto inokulované zmesi so vzduchom, ktorý neobsahuje CO₂, aby sa odstránil CO₂ zo systému.

Oddelene pridajte testovaný materiál a referenčnú látku v známom objeme zásobných roztokov, použite paralelky v koncentráciách za prídavku látky alebo prípravku 10 až 20 mg DOC alebo TOC/l, nechajte niektoré banky bez prídavku látky alebo prípravku ako inokulové kontroly. Slabo rozpustné testované látky pridajte priamo do baniek v takom množstve alebo objeme, ako je uvedené v dodatku 3.

Ak je to potrebné, použite jednu banku na kontrolu inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku pridaním testovanej aj referenčnej látky alebo prípravku v tej istej koncentrácii, aká je v ostatných bankách.

Takisto, ak je to potrebné, použite ďalšiu sterilnú banku na kontrolu, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku látky alebo prípravku (pozri I.6.6). Sterilizujte prídavkom jedovatej látky vo vhodnej koncentrácii.

Doplňte objemy suspenzií vo všetkých bankách na 3 litre pridaním minerálneho média, ktoré sa predtým prevzdušnilo vzduchom neobsahujúcim CO₂. Prípadne sa môžu odobrať vzorky na analýzu DOC (pozri prílohu II.4) a/alebo na špecifickú analýzu. Pripojte absorpčné fľaše na výstupy z baniek.

Ak sa použije hydroxid bárnatý, sériovo spojte tri absorpčné fľaše, každú obsahujúcu 100 ml 0,0125 M roztoku hydroxidu bárnateho ku každej 5-litrovej banke. Roztoky nesmú obsahovať zrazeniny síranov a uhličitanov a ich sila sa musí stanoviť tesne pred použitím. Ak sa použije hydroxid sodný, pripojte dve fľaše, z ktorých druhá bude určená na demonštráciu, že sa všetok CO₂ absorboval v prvej fľaši. Absorpčné fľaše, na ktoré sedia uzávery sérových fliaš, sú bežne dostupné. Pridajte 200 ml 0,05 M NaOH do každej fľaše, čo stačí na absorbovanie všetkého CO₂, ktorý sa môže vyvinúť pri úplnej degradácii testovanej látky. Roztok NaOH, aj keď je čerstvo pripravený, bude obsahovať stopy uhličitanov; to sa koriguje stanovením uhličitanu v slepom pokuse.

IV.2.5. Počet baniek v typickom teste

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia,.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

IV.2.6. Realizácia testu

Začnite test prebublávaním vzduchu bez CO₂ cez suspenziu pri prietoku 30 až 100 ml/min. Periodicky odoberajte vzorky absorbenta CO₂ na analýzu obsahu CO₂. Odporúča sa počas prvých desiatich dní vykonávať analýzy každý druhý alebo tretí deň a potom každý piaty deň až do 28. dňa, takže sa obdobie 10-dňového okna môže identifikovať.

Na 28. deň odoberte vzorky (voliteľné) na stanovenie DOC a/alebo špecifickú analýzu, merajte pH suspenzie a pridajte 1 ml koncentrovanej HCl do každej banky, prevzdušnite banky cez noc, aby sa odstránil CO₂ prítomný v testovaných suspenziách. Na 29. deň vykonajte posledné analýzy uvoľneného CO₂.

V dňoch merania CO₂ odpojte najbližšiu fľašu s Ba(OH)₂ k banke a titrujte roztok hydroxidu s 0,05 M HCl s použitím fenolftaleínu ako indikátora. Posuňte zostávajúce fľaše bližšie k banke a pripojte novú fľašu s absorbentom obsahujúcu 100 ml čerstvého roztoku 0,0125 M Ba(OH)₂ na koniec série fliaš. Vykonajte titrácie, ak sú potrebné, napr. keď sú zrazeniny viditeľné v prvej fľaši, ale predtým ako sú viditeľné v druhej fľaši alebo aspoň raz za týždeň. Ďalšou možnosťou je použitie NaOH ako absorbenta, v tomto prípade (v závislosti od charakteristiky použitého analyzátora uhlíka) odoberte striekačkou malú vzorku roztoku NaOH z absorpčnej fľaše bližšej k banke. Injektujte vzorku do časti IC analyzátora uhlíka na priamu analýzu uvoľneného CO₂.

Analyzujte obsah druhej záchytnej fľaše len na konci testu, aby sa korigovala hodnota na prípadne prenesený CO₂.

IV.3. ÚDAJE A SPRÁVA

IV.3.1. Spracovanie výsledkov

Množstvo zachyteného CO₂ v absorbente sa pri titracii určuje podľa rovnice:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde:

V = objem HCl použitý na titráciu 100 ml absorbenta (ml);

C_B = koncentrácia roztoku Ba(OH)₂ (M);

C_A = koncentrácia roztoku HCl (M);

ak je C_B 0,0125 M a C_A je 0,05 M, titrácia 100 ml Ba(OH)₂ je 50 ml a hmotnosť CO₂ je daná podľa rovnice:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titrované} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Preto sa v takomto prípade konvertuje objem titrovanej HCl na vytvorený CO₂ v mg faktorom 1,1.

Vypočítajte hmotnosti vytvoreného CO₂ samotným inokulom a inokulom v prítomnosti testovanej látky alebo prípravku s použitím príslušných hodnôt titrácií, potom rozdiel je hmotnosť vytvoreného CO₂ zo samotnej testovanej látky alebo prípravku.

Napríklad ak samotné inokulum má spotrebu na titráciu 48 ml a inokulum v prítomnosti testovanej látky má spotrebu 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ z inokula} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$\text{CO}_2 \text{ z inokula v prítomnosti testovanej látky} = 1,1 \times (50 - 45) = 5,5 \text{ mg,}$$

a preto hmotnosť vytvoreného CO_2 z testovanej látky alebo prípravku je 3,3 mg.

Percento biodegradácie sa vypočíta z rovnice:

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného CO}_2 \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{mg pridanej testovanej látky alebo prípravku}}$$

alebo

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného CO}_2 \times 100}{\text{mg pridaného TOC v teste} \times 3,67}$$

kde 3,67 je konverzný faktor (44/12) pre uhlík na oxid uhličitý.

Získajte percentuálnu degradáciu po každom časovom intervale pridaním percenta z vypočítaných hodnôt ThCO_2 pre každý deň až do času, keď sa merala.

Pre absorbent NaOH vypočítajte množstvo uvoľneného CO_2 , vyjadrené ako IC (mg), vynásobením koncentrácie IC v absorbente objemom absorbentu.

Percento degradácie sa vypočíta podľa rovnice:

$$\% \text{ ThCO}_2 = \frac{\text{mg IC z testovanej banky} - \text{mg IC zo slepého pokusu}}{\text{mg TOC pridané ako testovaná látka alebo prípravok}} \times 100$$

Odstránenie DOC (nepovinné) sa vypočíta podľa I.7. Zaznamenajte tieto a ostatné výsledky do uvedenej karty údajov.

IV.3.2. **Platnosť výsledkov**

Obsah IC v suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu na začiatku testu musí byť menší ako 5 % TC a celková tvorba CO_2 v inokulovom slepom pokuse na konci testu by nemala normálne presahovať 40 mg/l média. Ak sú hodnoty väčšie ako 70 mg CO_2 /liter, potom by sa mali kriticky posúdiť údaje aj experimentálna technika.

Pozri tiež I.5.2.

IV.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

IV.4. **KARTA ÚDAJOV**

Príklad záznamníka údajov je uvedený nižšie.

TEST VÝVOJA OXIDU UHLIČITÉHO

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ...mg/liter chemickej látky

Počiatočná koncentrácia v médiu: ...mg/liter chemickej látky

Celkový C pridaný do banky: ...mg C,

ThCO₂: mg CO₂

4. INOKULUM

Zdroj:

Úprava:

Prekondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. TVORBA OXIDU UHLIČITÉHO A DEGRADOVATEĽNOSŤ

Metóda: Ba(OH)₂/NaOH/iné

Čas (dni)	CO ₂ vytvorený v teste (mg)		CO ₂ vypočítané no tukša parauga (mg)		Celkové množstvo CO ₂ (priemer v teste mínus priemer v teste naslepo) (mg)		% THCO ₂ celkový $\frac{\text{CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	1 2	priemer	3 4	priemer	1	2	1	2	priemer
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Poznámka: podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčné chemické látky a na kontrolu toxicity.

6. ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÁ)

Analyzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
0	C _{b(l)}	C ₀
28 ⁽¹⁾	C _{b(t)}	C _t

⁽¹⁾ alebo na konci kultivácie.

$$\% \text{ odstráneného DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_t - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (NEPOVINNÉ)

$$\% \text{ abiotickej degradácie} = \frac{\text{CO}_2 - \text{tvorba CO}_2 \text{ v sterilnej banke po 28 dňoch (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

ČASŤ V. TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE (METÓDA C.4-D)

V.1. PRINCÍP METÓDY

Známy objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (100 mg/liter testovanej látky, aby sa dosiahla koncentrácia aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter) ako jediného nominálneho zdroja organického uhlíka, sa mieša v uzavretej banke pri konštantnej teplote ($\pm 1^\circ\text{C}$ alebo presnejšie) počas 28 dní. Spotreba kyslíka sa stanoví meraním množstva kyslíka (produkovaného elektrolyticky), ktoré vyžaduje udržiavanie konštantného objemu plynu v respirometrickej banke, alebo zo zmien v objeme alebo tlaku (alebo ich kombinácia) v prístroji. Vyvinutý oxid uhličitý sa absorbuje v roztoku KOH alebo iného vhodného absorbenta. Množstvo kyslíka odobraného testovanou látkou alebo prípravkom (upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý prebieha paralelne) sa vyjadrí ako percento z ThOD alebo CHSK. Primárna biodegradácia sa môže prípadne tiež vypočítať z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a z úplnej biodegradácie na základe analýzy DOC.

V.2. OPIS METÓDY

V.2.1. Prístroje

- vhodný respirometer;
- prístroj na udržiavanie a kontrolu teploty ($\pm 1^\circ\text{C}$ alebo presnejšie);
- zostava pre membránovú filtráciu (nepovinné);
- analýzátor uhlíka (nepovinné).

V.2.2. Príprava minerálneho média

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov b) až d) a doplňte vodou do 1 litra.

V.2.3. Príprava a prekondicionovanie inokula

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku, povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4. Príprava baniiek

S použitím zásobných roztokov pripravte v oddelených sadách 100 mg roztoky testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky/liter (ktoré poskytujú aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter).

Vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, pokiaľ nedochádza k nitrifikácii, keď by výpočet mal byť založený na tvorbe dusičnanov (pozri prílohu II.2).

Stanovte hodnoty pH, a ak je to potrebné, upravte ich na $7,4 \pm 0,2$.

Slabo rozpustné látky alebo prípravky by sa mali pridať neskôr (pozri nižšie).

Ak sa má stanoviť toxicita testovanej látky alebo prípravku, pripravte roztok v minerálnom médiu, ktorý obsahuje súčasne testovanú látku alebo prípravok aj referenčnú látku v tých istých koncentráciách ako v jednotlivých roztokoch.

Ak sa vyžaduje meranie fyzikálno-chemickej spotreby kyslíka, pripravte roztok testovanej látky alebo prípravku, normálne 100 mg ThOD/liter, ktorý bol sterilizovaný prídavkom vhodnej toxické látky (pozri I.6.6).

Umiestnite pripravené objemy roztokov testovanej a referenčnej látky alebo prípravku aspoň do dvoch paralelných baniek. Do ďalších baniek pridajte len minerálne médium (na inokulové kontroly), a ak sa to vyžaduje, zmes roztoku testovanej a referenčnej látky alebo prípravku a sterilného roztoku.

Ak je testovaná chemická látka slabo rozpustná, pridajte ju priamo na hmotnostnom alebo objemovom základe alebo postupujte podľa prílohy III. Pridajte KOH pelety alebo iný absorbent do častí určených na absorpciu CO₂.

V.2.5. Počet baniek v typickom teste

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus

Banka 5: Kontrola postupu

A odporúča sa, ak je to potrebné:

Banka 6: Sterilná kontrola

Banka 7: Kontrola toxicity

Pozri tiež I.6.7.

V.2.6. Realizácia testu

Zohrejte nádoby na požadovanú teplotu a inokulujte ich s pripraveným aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula tak, aby koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/liter. Zložte zariadenie, zapnite miešadlo, skontrolujte vzduchotesnosť a začnite meranie spotreby kyslíka. Zvyčajne nie je potrebná iná starostlivosť, ako získať potrebné údaje a vykonať dennú kontrolu správnosti teploty a miešania.

Vypočítajte spotrebu kyslíka z údajov, ktoré sa zistili v pravidelných a častých intervaloch, podľa metód uvedených výrobcom zariadenia. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte pH obsahu baniek, najmä ak spotreba kyslíka bola nízka alebo väčšia ako ThODNH₄ (pre chemické látky obsahujúce dusík).

Ak je to potrebné, odoberte vzorky z respirometrických baniek na začiatku a na konci na analýzu DOC alebo špecifickej látky alebo prípravku (pozri prílohu II.4). Pri počiatočnom odbere zaistite, aby zostávajúci objem testovanej suspenzie v banke bol známy. Ak sa kyslík spotrebúva testovanou látkou obsahujúcou dusík, stanovte nárast koncentrácie dusitanov a dusičnanov počas 28 dní a vypočítajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou (dodatok 5).

V.3. ÚDAJE A SPRÁVA

V.3.1. Spracovanie výsledkov

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom po danom čase (upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase) hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK, vyjadrená ako mg kyslíka/mg testovanej látky alebo prípravku, t. j.:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg spotreby } \text{O}_2 \text{ testovanej látky} - \text{mg spotreby } \text{O}_2 \text{ slepého pokusu})}{(\text{mg testovanej látky alebo prípravku v banke})}$$

= mg O₂ na mg testovanej látky alebo prípravku

Vypočítajte percento biodegradácie buď z rovnice:

$$\% \text{ biodegradácie} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg BSK}(\text{mg O}_2 \text{ látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg ThOD}(\text{mg O}_2 \text{ látky alebo prípravku}))} \times 100$$

alebo z rovnice

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg BSK}(\text{mg O}_2 \text{ látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg ThOD}(\text{mg O}_2 \text{ látky alebo prípravku}))} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky alebo prípravky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH₄ alebo NO₃) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

Ak sú vykonané voliteľné stanovenia organického uhlíka a/alebo špecifickej látky alebo prípravku, vypočítajte percento degradácie podľa I.7 tejto metodiky.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

V.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O₂ na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak pH hodnota je mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

V.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

V.4. **KARTA ÚDAJOV**

Príklad záznamníka údajov je uvedený ďalej.

TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE

1. **LABORATÓRIUM**
2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**
3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ... mg/liter

Počiatočná koncentrácia v médiu, C_0 : ... mg/liter

Objem v skúšobnej banke (V): ... ml

ThOD alebo CHSK: mg O_2 /mg testovanej látky (NH_4 alebo NO_3)

4. INOKULUM

Zdroj:

Úprava:

Prekondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATEĽNOSŤ

		Čas (dni)											
		0		7		14			21			28	
Spotreba O_2 (mg) testovanou látkou	1												
	2												
	a, priemer												
Spotreba O_2 (mg) v teste naslepo	3												
	4												
	b, priemer												
Korigovaná BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSK na mg testovanej látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$												
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	$D_1 (a_1)$												
	$D_2 (a_2)$												
	Priemer (*)												

V = objem média v skúšobnej banke.

(*) Nemal by sa urobiť priemer z hodnôt D_1 a D_2 , ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú chemickú látku a na kontrolu toxicity.

6. KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (POZRI PRÍLOHU V).

Deň	0	28	Rozdiel
i) Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)			{N}
ii) Kyslíkový ekvivalent $(4,57 \times N \times V)$ (mg)	—	—	
iii) Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)			{N}
iv) Kyslíkový ekvivalent $(3,43 \times N \times V)$ (mg)	—	—	
ii + iv) Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÉ)

Analýzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
D	(C _{blo})	(C _o)
28 (*)	(C _{blt})	(C _t)

(*) Alebo na konci inkubácie.

$$\% \text{ DOC \% odstráneného} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. ŠPECIFICKÁ CHEMICKÁ LÁTKA (NEPOVINNÉ)

S_b = koncentrácia vo fyzikálno-chemickej (sterilnej) kontrole po 28 dňoch

S_a = koncentrácia v inokulovanej banke po 28 dňoch.

$$\% \text{ biodegradácie} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (NEPOVINNÉ)

a = spotreba kyslíka (O₂) v sterilných bankách po 28 dňoch (mg)

$$\text{spotreba kyslíka na mg testovavej látky alebo prípravku} = \frac{a}{C_o V}$$

(pozri oddiely 1 a 3)

$$\% \text{ abiotickej degradácie} = \frac{a \times 100}{C_o V \times \text{ThOD}}$$

ČASŤ VI. TEST UZAVRETEJ FLAŠE (METÓDA C.4-E)

VI.1. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Roztok testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, 2 až 5 mg/liter, sa inokuluje s relatívne malým počtom mikroorganizmov zo zmesovej populácie a udržiava sa v úplne plných, uzavretých fľašiach v tme za konštantnej teploty. Degradácia sa sleduje analýzou rozpusteného kyslíka počas 28-dňového obdobia. Množstvo spotrebovaného kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom, upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý sa testuje paralelne, sa vyjadrí ako percento ThOD alebo CHSK.

VI.2. OPIS METÓDY

VI.2.1. **Prístroje**

- a) fľaše BSK so sklenenými uzávermi, napr. 250 až 300 ml;
- b) vodný kúpeľ alebo inkubátor na udržiavanie fliaš pri konštantnej teplote (± 1 °C alebo presnejšie) s vylúčením svetla;
- c) veľké sklenené fľaše (2-až 5-litrové) na prípravu média na naplnenie fliaš BSK;
- d) kyslíková elektróda a prístroj alebo zariadenie a reagenty na Winklerovu titráciu.

VI.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 1 (jeden) ml roztokov (a) až (d) a doplňte vodou do 1 litra.

VI.2.3. **Príprava inokula**

Inokulum sa normálne získa zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré prevažne spracúvajú domáce splaškové vody. Alternatívnym zdrojom inokula je povrchová voda. Používa sa jedna kvapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na liter média, môžu byť potrebné pokusy na zistenie optimálneho objemu pre daný výtok (pozri I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4. **Príprava baniek**

Aspoň 20 minút intenzívne prevzdušňujte minerálne médium. Pripravte každú testovaciu sériu z minerálneho média z tej istej zásoby. Vo všeobecnosti je médium pripravené na použitie až po 20 hodinách státia pri teplote testovania. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka na účely kontroly, pri 20 °C by mala byť hodnota okolo 9 mg/liter. Vykonajte všetky prenosy a plnenia vzduchom nasýteného, bubliny neobsahujúceho média, napr. s použitím sifónu.

Pripravte paralelné skupiny BSK fliaš na stanovenie testovanej a referenčnej látky na simultánne experimentálne série. Zostavte dostatočný počet BSK fliaš vrátane inokulového slepého pokusu, tak aby bolo možné meranie spotreby kyslíka aspoň v dvoch paralelkách v požadovaných skúšobných intervaloch, napr. po 0, 7, 14, 21 a 28 dňoch. Viac fliaš sa môže vyžadovať na zaistenie identifikácie 10-dňového okna.

Pridajte kompletne prevzdušené minerálne médium do veľkých fliaš tak, aby boli naplnené asi do jednej tretiny. Potom pridajte vhodné množstvo zásobných roztokov testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky do osobitných veľkých fliaš tak, aby konečná koncentrácia látky alebo prípravku nepresahovala 10 mg/liter. Do ďalšej veľkej fľaše obsahujúcej kontrolný slepý pokus nepridávajte žiadne látky ani prípravky.

Aby sa zaistilo, že aktivita inokula nie je limitovaná, koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie byť v BSK fľašiach nižšia ako 0,5 mg/liter. To limituje koncentráciu testovanej látky alebo prípravku asi na 2 mg/liter. Avšak v prípade slabo degradovateľných látok alebo prípravkov a látok alebo prípravkov s nízkou hodnotou ThOD sa môže použiť koncentrácia 5 až 10 mg/liter. V niektorých prípadoch sa odporúča testovať paralelne pri dvoch rozdielnych koncentráciách, napríklad 2 mg/liter a 5 mg/liter. Normálnym spôsobom vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, ale ak sa vie alebo očakáva, že bude prebiehať nitrifikácia, je potrebné vypočítať túto hodnotu na základe tvorby dusičnanov ($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$; pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia nie je úplná, ale predsa prebieha, je potrebné vykonať korekciu na zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov stanovených analýzou (pozri prílohu V).

Ak je potrebné testovať toxicitu testovanej látky alebo prípravku (v prípade napríklad zistenej nízkej biodegradovateľnosti), sú potrebné ďalšie série fliaš.

Pripravte ďalšiu veľkú fľašu obsahujúcu prevzdušené minerálne médium (asi do jednej tretiny jej objemu) a testovanú látku alebo prípravok a referenčnú látku v rovnakých konečných koncentráciách, aké sú v ostatných veľkých fľašiach.

Inokulujte roztoky vo veľkých fľašiach so sekundárnym výtokom (jedna kvapka alebo asi 0,05 ml až 5 ml/liter) alebo iným zdrojom, ako je riečna voda (pozri I.6.4.2). Nakoniec doplňte roztoky na objem s prevzdušeným minerálnym médiom s použitím hadičky dosahujúcej až na dno fľaše, aby sa dosiahlo riadne premiešanie.

VI.2.5. Počet baniek v typickom teste

V typickom teste sa použijú tieto fľaše:

- aspoň 10 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok a inokulum (testovaná suspenzia),
- aspoň 10 fliaš obsahujúcich len inokulum (inokulový slepý pokus),
- aspoň 10 fliaš obsahujúcich referenčnú látku a inokulum (kontrola postupu),
- a ak je to nutné, 6 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok, referenčnú látku a inokulum (kontrola toxicity). Aby sa však zaistila identifikácia 10-dňového okna, bol by potrebný približne dvojnásobný počet fliaš.

VI.2.6. Realizácia testu

Ľhneď rozdeľte každý pripravený roztok do príslušnej skupiny BSK fliaš s použitím hadičky zo spodnej štvrtiny (nie z dna) vhodne veľkej fľaše, tak aby všetky BSK fľaše boli úplne naplnené. Jemne trasením odstráňte všetky vzduchové bubliny. Okamžite analyzujte v nulovom čase rozpustený kyslík Winklerovou alebo elektródovou metódou. Obsah fliaš sa môže zakonzervovať pre neskoršiu analýzu Winklerovou metódou pridaním síranu manganatého (II) a hydroxidu sodného (prvý Winklerov reagent). Uskladnite starostlivo uzavreté fľaše obsahujúce zafixovaný kyslík ako hnedý hydratovaný (III) oxid manganitý v tme pri teplote 10 až 20 °C nie dlhšie ako 24 hodín pred vykonaním zostávajúcich krokov Winklerovej metódy. Uzavrite zostávajúce paralelné fľaše tak, aby sa zaistilo, že nie sú uzavreté žiadne vzduchové bubliny, a inkubujte za tmy pri teplote 20 °C. Každá séria musí byť spolu s kompletnou paralelnou sériou na stanovenie slepého pokusu inokulovaného média. Odoberte aspoň po dve fľaše zo všetkých sérií na analýzu rozpusteného kyslíka v časových intervaloch (aspoň týždenne) počas 28-dňovej inkubácie.

Týždenné odbery vzoriek umožnia hodnotenie percentuálneho odstránenia v 14-dňovom okne, avšak odbery každé 3 až 4 dni by mali umožniť identifikovať 10-dňové okno, čoby vyžadovalo dvojnásobok fliaš.

Pre testované látky obsahujúce dusík by sa mali vykonať korekcie na spotrebu kyslíka prípadnou nitrifikáciou. Aby sa toto vykonalo, použite metódu kyslíkovej elektródy na stanovenie koncentrácie rozpustného kyslíka a potom odoberte vzorku z BSK fľaše na analýzu dusitanov a dusičnanov. Z nárastu koncentrácie dusitanov a dusičnanov vypočítajte spotrebovaný kyslík (pozri prílohu V).

VI.3. ÚDAJE A SPRÁVA

VI.3.1. Spracovanie výsledkov

V prvom rade vypočítajte BSK získaný po každej časovej perióde odpočítaním spotreby kyslíka (mg O₂/liter) v inokulovom slepom pokuse od spotreby kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom. Vydeľte túto upravenú spotrebu koncentráciou (mg/liter) testovanej látky alebo prípravku, aby sa získala špecifická hodnota BSK ako mg kyslíka na mg testovanej látky alebo prípravku. Vypočítajte percento biodegradovateľnosti vydelením špecifickej hodnoty BSK so špecifickou hodnotou ThOD (vypočítanou podľa prílohy II.2) alebo CHSK (stanovené analýzou, pozri prílohu II.3), potom:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby O}_2 \text{ testovanej} - \text{mg spotreby O}_2 \text{ slepého pokusu}}{(\text{BSK})}$$

= mg O₂ na mg testovanej látky alebo prípravku

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg BSK (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg ThOD (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}} \times 100$$

alebo

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg BSK (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}}{\text{COD (mg O}_2\text{/mg CHSK (mg O}_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH_4 alebo NO_3) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

VI.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse by nemala presahovať 1,5 mg rozpusteného O_2 /liter po 28 dňoch. Hodnoty vyššie ako táto vyžadujú prehodnotenie a posúdenie experimentálnych techník. Počas celého testu by sa nemala zvyšková koncentrácia kyslíka znížiť pod 0,5 mg/liter. Takéto nízke hladiny kyslíka sú platné, len ak metódy stanovenia rozpustného kyslíka sú schopné presne merať takéto nízke koncentrácie.

Pozri tiež I.5.2.

VI.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

VI.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený ďalej.

TEST UZAVRETEJ FĽAŠE

1. **LABORATÓRIUM**
2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**
3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ... mg/liter

Počiatočná koncentrácia vo fľaši: ... mg/liter

ThOD alebo CHSK: ... mg O_2 /mg testovanej látky

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Úprava:

Prekondicionovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia v reakčnej zmesi: ... mg/liter

5. **STANOVENIE ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA**

Metóda: Winklerova/elektrodová

Analýzy baniek

Doba inkubácie (d)			Rozpustený kyslík (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Test naslepo (bez chemickej látky)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Priemer	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testovaná chemická látka	1	a ₁				
	2	a ₂				
Priemer	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú látku a na kontrolu toxicity

6. KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (POZRI PRÍLOHU V)

Doba inkubácie d)		0	n ₁	n ₂	n ₃
i)	Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)				
ii)	Zmena koncentrácie dusičnanov (mg N na liter)	—			
ii)	Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)				
v)	Zmena koncentrácie dusitanov (mg N na liter)	—			
vi)	Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Celkový kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			

7. SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA: % DEGRADÁCIE

	Spotreba po n dňoch (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
BANKA 1: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
BANKA 2: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
BANKA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
BANKA 2: $\% D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
$\% D \text{ priemer (*)} = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

m_{i0} = hodnota v skúšobnej banke v čase 0
 m_{ix} = hodnota v skúšobnej banke v čase x
 m_{b0} = stredná hodnota slepého pokusu v čase 0
 m_{bx} = stredná hodnota slepého pokusu v čase x

Tiež aplikujte korekciu na nitrifikáciu z iii + vi v oddiele 6.

8. SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA V SLEPOM POKUSE

Spotreba kyslíka v slepom pokuse: ($m_{b0} - m_{b28}$) mg/liter. Táto spotreba je dôležitá pre platnosť testu. Mala by byť menšia ako 1,5 mg/liter.

ČASŤ VII. TEST M.I.T.I. (METÓDA C.4-F)

VII.1. PRINCÍP METÓDY

Spotreba kyslíka v miešanom roztoku alebo suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, inokulovanom so špeciálne kultivovanými, neadaptovanými mikroorganizmami sa meria automaticky počas 28 dní v tmavom, uzavretom respirometri pri teplote 25 ± 1 °C. Vyvíjaný oxid uhličitý sa absorbuje nátronným vápnom. Biodegradovateľnosť je vyjadrená v percentách spotreby kyslíka (korigované na spotrebu slepého pokusu) z teoretickej spotreby (ThOD). Percento primárnej biodegradovateľnosti sa tiež vypočíta z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a prípadne z analýzy DOC.

VII.2. OPIS METÓDY

VII.2.1. Prístroje

- automatický elektrolytický BSK-meter alebo respirometer, normálne vybavený 6 fľašami s 300 ml objemu a nádobami obsahujúcimi absorbent CO_2 ;
- miestnosť s konštantnou teplotou a/alebo vodný kúpeľ s teplotou 25 ± 1 °C alebo presnejšie;
- zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);
- analýzátor uhlíka (nepovinné).

VII.2.2. Príprava minerálneho média

S použitím látok analytickej čistoty a vody pripravte tieto zásobné roztoky (I.6.1):

a)	Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogénfosforečnan dvoj sodný dodekahydrát $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	44,60 g
	Chlorid amónny, NH_4Cl	1,70 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
	Hodnota pH roztoku musí byť 7,2.	
b)	Síran horečnatý heptahydrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	22,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
c)	Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl_2	27,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
d)	Chlorid železitý hexahydrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	

Odoberte 3 ml z každého roztoku a), b), c) a d) doplňte do 1 litra.

VII.2.3. Príprava inokula

Získajte čerstvé vzorky z najmenej desiatich miest, najmä z oblasti, kde sú použité a rozptýlené rozličné látky alebo prípravky. Z miest, ako sú čističky odpadových vôd, čističky vôd priemyselného odpadu, rieky, jazerá, more zhromažďujte 1 liter vzorky kalu, povrchovej pôdy, vody atď. a zmiešajte ich spolu. Po odstránení plávajúcich látok a odstátí upravte hodnotu pH supernatantu na $\text{pH } 7 \pm 1$ s hydroxidom sodným (NaOH) alebo s kyselinou fosforečnou (H_3PO_4).

Použite vhodný objem filtrovaného supernatantu na naplnenie nádoby s aktivovaným kalom a prevzdušňujte kvapalinu asi 23,5 hodiny. Tridsať minút po zastavení prevzdušňovania oddelíte asi jednu tretinu objemu supernatantu a pridajte rovnaký objem roztoku ($\text{pH } 7$) obsahujúceho 0,1 % glukózy, peptonu a dihydrofosforečnanu draselného k usadenému materiálu a znovu začnite prevzdušňovanie. Opakujte tento postup raz denne. Kalová jednotka musí fungovať podľa správnej praxe: výtok by mal byť číry, teplota by sa mala udržiavať na $25 \pm 2^\circ\text{C}$, hodnota pH má byť 7 ± 1 , kal by sa mal dobre sedimentovať, dostatočné prevzdušňovanie by malo udržiavať zmes stále aeróbnu, mali by byť prítomné prvky a aktivita kalu by sa mala testovať referenčnou látkou aspoň každé tri mesiace. Nepoužite kal ako inokulum skôr ako po jednom mesiaci, ale už nie po štyroch mesiacoch. Preto odoberte vzorku aspoň z 10 miest v pravidelných intervaloch, raz za tri mesiace.

Aby sa udržala rovnaká aktivita čerstvého a starého kalu, zmiešajte filtrovaný supernatant aktivovaného kalu, ktorý sa používa s rovnakým objemom filtrovaného supernatantu z čerstvo zhromaždenej zmesi z 10 miest, a kultivujte kombinovanú zmes, ako je vyššie uvedené. Použite kal ako inokulum po 18 až 24 hodinách po pridaní živín.

VII.2.4. Príprava baniek

Prípravte týchto 6 baniek:

Banka č. 1: testovaná látka alebo prípravok vo vode, 100 mg/liter.

Banka č. 2, 3 a 4: testovaná látka alebo prípravok v minerálnom médiu, 100 mg/liter.

Banka č. 5: referenčná látka alebo prípravok (napr. anilín) v minerálnom médiu 100 mg/liter.

Banka č. 6: samotné minerálne médium.

Slabo rozpustné testované chemické látky pridajte priamo, a to podľa ich hmotnosti alebo objemu, alebo s nimi zaobchádzajte podľa toho, ako je to uvedené v dodatku 3, okrem toho by sa nemali pridať rozpúšťadlá ani emulzifikátory. Pridajte absorbent CO_2 do všetkých príslušných nádob. Upravte hodnotu pH v bankách č. 2, 3 a 4 na 7,0.

VII.2.5. Realizácia testu

Inokulujte banky č. 2, 3 a 4 (testované suspenzie), č. 5 (kontrola aktivity) a č. 6 (inokulový slepý pokus) s malým objemom inokula tak, aby sa dosiahla koncentrácia suspendovaných tuhých častíc 30 mg/l. Žiadne inokulum sa nepridáva do banky č. 1, ktorá slúži ako abiotická hodnota. Zložte zariadenie, skontrolujte vzduchotesnosť, zapnite miešadlá a začnite meranie spotreby kyslíka bez prístupu svetla. Denne kontrolujte teplotu, miešadlá a coulometricky záznamník spotreby kyslíka a zaregistrujte akékoľvek zmeny farby obsahov baniek. Odčítajte spotrebu kyslíka pre šesť baniek priamo pomocou vhodnej metódy, napr. zo šesťbodového zapisovača, ktorá poskytuje krivku BSK. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte hodnotu pH obsahu baniek a stanovte koncentráciu zvyškovej testovanej látky alebo prípravku a akékoľvek medziproduktu a v prípade vo vode rozpustných látok vo vode koncentráciu DOC (pozri prílohu II.4). Zvláštna pozornosť sa musí venovať prchavým chemickým látkam. Ak sa predpokladá nitrifikácia, stanovte koncentráciu dusičnanov a dusitanov, ak je to možné.

VII.3. ÚDAJE A SPRÁVA**VII.3.1. Spracovanie výsledkov**

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom, po danom čase upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase, hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK vyjadrený ako mg kyslíka/mg testovanej chemickej látky, t. j.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby } \text{O}_2 \text{ testovanou látkou} - \text{mg spotreby } \text{O}_2 \text{ slepého pokusu látkou}}{\text{mg testovanej látky alebo prípravku v banke}}$$

= mg O₂ na mg testovanej látky alebo prípravku.

Percentuálna biodegradácia sa potom získa z:

$$\% \text{ biodegradácie} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{BSK (mg O}_2\text{/mg látky alebo prípravku))}}{\text{ThOD (mg O}_2\text{/mg ThOD (mg O}_2\text{mg látky alebo prípravku))}} \times 100$$

Pre zmesi vypočítajte ThOD z elementárnej analýzy tak ako pre jednotlivé látky alebo prípravky. Použite vhodný ThOD (ThOD_{NH4}, ThOD_{NO3}) podľa toho, či nedochádza k nitrifikácii, alebo či nitrifikácia prebieha kompletne (pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia prebieha, ale je neúplná, vykonajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentráciách dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

Vypočítajte percento primárnej biodegradácie zo straty špecifickej (parentálnej, pôvodnej) látky alebo prípravku (pozri I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 \%$$

Ak došlo k strate testovanej látky alebo prípravku v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, uveďte to v správe a použite koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (S_b) po 28 dňoch v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Ak sa vykonajú stanovenia DOC (nepovinné), vypočítajte percento konečnej biodegradácie z:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100 \%$$

ako je opísané pod bodom I.7.1. Ak došlo k strate DOC v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, použite koncentráciu DOC v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

VII.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O₂ na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak je pH hodnota mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

Ak percento degradácie anilínu, vypočítané zo spotreby kyslíka, nepresahuje 40 % po 7 dňoch a 65 % po 14 dňoch, test sa považuje za platný.

3.3. **Správa**

Pozri I.8.

VII.4. **KARTA ÚDAJOV**

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST MITI (I)

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ... mg/liter chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu C_0 : ... mg/liter chemickej látky.

Objem reakčnej zmesi, V: ... ml.

ThOD: ... mg O_2 /liter.4. **INOKULUM**

Miesta odberu vzoriek kalu:

1. ...	6. ...
2. ...	7. ...
3. ...	8. ...
4. ...	9. ...
5. ...	10. ...

Koncentrácia suspendovaných tuhých častíc v aktivovanom kale po aklimatizácii so syntetickým výtokom = ... mg/liter.

Objem aktivovaného kalu na liter konečného média = ... ml.

Koncentrácia kalu v konečnom médiu = ... mg/liter

5. **SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATELNOSŤ**

Typ použitého respirometra:

			Čas (dni)				
			0	7	14	21	28
Spotreba O_2 (mg) testovanej látkou	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spotreba O_2 (mg) v teste naslepo	b						
Korigovaná spotreba O_2 (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BSK na mg testovanej	$\frac{(a-b)}{C_0 V}$	Banka 1					
		Banka 2					
		Banka 3					

			Čas (dni)				
			0	7	14	21	28
$\frac{\text{Rozklad v \% BOD}}{\text{ThOD}} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Priemer ⁽¹⁾					

⁽¹⁾ Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku.

6. ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÉ)

Analyzátor uhlíka:

Banka	DOC				% odstráneného DOC	Priemer
	Nameraná hodnota	Korigovaná hodnota				
Voda + testovaná látka	a				—	—
Kal + testovaná látka	b ₁		b ₁ – c			
Kal + testovaná látka	b ₂		b ₂ – c			
Kal + testovaná látka	b ₃		b ₃ – c			
Kontrolný test naslepo	c		—		—	—

$$\% \text{ odstráneného} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. ÚDAJE ZO ŠPECIFICKEJ CHEMICKEJ ANALÝZY

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na koci testu	degradácia v %
Test naslepo s vodou	S _b	
Inokulované médium	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ degradácie} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Vypočítajte % degradácie pre banky a1, a2, a a3.

8. POZNÁMKY

Ak je to možné, mala by sa pripojiť krivka závislosti BSK od času.

DODATOK 1

SKRATKY A POJMY

- DO: Rozpustený kyslík (mg/liter) je koncentrácia rozpusteného kyslíka vo vodnej vzorke.
- BSK: Biochemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka mikroorganizmami počas metabolizovania testovanej látky alebo prípravku, tiež vyjadrené ako g spotrebovaného kyslíka na g testovanej chemickej látky (pozri metódu C.5).
- CHSK: Chemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka počas oxidácie testovanej látky alebo prípravku v teplom, okyslenom dvojchrómane; umožňuje meranie množstva prítomnej oxidovateľnej látky; tiež vyjadruje spotrebovaný kyslík v g na g testovanej látky alebo prípravku (pozri metódu C.6).
- DOC: Rozpustený organický uhlík je organický uhlík prítomný v roztoku alebo ten, ktorý prechádza cez 0,45-mikrometrový filter alebo ostáva v supernatante po odstredení pri 40 000 m.s⁻² ($\pm$ 4 000 g) počas 15 minút.
- ThOD: Teoretická spotreba kyslíka (mg) je teoretické množstvo kyslíka, ktoré sa požaduje na kompletnú oxidáciu látky alebo prípravku; vypočíta sa z molekulového vzorca (pozri prílohu II.2) a je tiež vyjadrená v mg kyslíka potrebných na mg testovanej látky.
- ThCO₂: Teoretický oxid uhličitý (mg) je vypočítané množstvo oxidu uhličitého, ktoré sa vytvorí zo známeho alebo odmeraného obsahu uhlíka v testovanej látke alebo prípravku, keď je kompletne mineralizovaná; je tiež vyjadrený v mg oxidu uhličitého uvoľneného z mg testovanej látky alebo prípravku.
- TOC: Celkový organický uhlík vzorky je súhrn organického uhlíka v roztoku a v suspenzii.
- IC: Anorganický uhlík.
- TC: Celkový uhlík je súhrn organického a anorganického uhlíka prítomného vo vzorke.

Primárna biodegradácia:

je zmena v štruktúre látky, spôsobená biologickým účinkom, ktorá má za následok stratu špecifickej vlastnosti tejto látky.

Úplná biodegradácia (aeróbna):

je taká dosiahnutá úroveň degradácie, keď testovanú látku alebo prípravok úplne spotrebujú mikroorganizmy, čoho výsledkom je tvorba oxidu uhličitého, vody, minerálnych solí a nových mikrobiálnych bunkových zložiek (biomasy).

Lahko biodegradovateľné:

je dohodnutá klasifikácia chemických látok, ktoré prešli cez určité špecifické skríningové testy na úplnú biodegradovateľnosť; tieto testy sú také prísne, že sa predpokladá, že takéto látky alebo prípravky sa budú rýchlo a úplne biodegradovať vo vodnom prostredí v aeróbných podmienkach.

Inherentne (prirodzene) biodegradovateľné:

je klasifikácia chemických látok, pre ktoré existuje jednoznačný dôkaz ich biodegradácie (primárnej alebo úplnej) v každom uznanom teste na biodegradovateľnosť.

Odbúrateľnosť:

je poddajnosť látok, aby boli odbúrané počas biologického čistenia odpadovej vody bez škodlivého ovplyvnenia normálneho priebehu procesov čistenia. Všeobecne možno konštatovať, že ľahko biodegradovateľné látky sú odbúrateľné, ale to sa už nedá konštatovať o všetkých vnútorne biodegradovateľných látkach. Do odbúrania môžu byť zapojené aj abiotické procesy.

Fáza lag:

je čas od inokulácie, v teste Die-Away, po dosiahnutí aspoň 10 % degradácie. Fáza lag je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Doba trvania degradácie:

je čas od konca fázy lag až po čas, kým sa nedosiahne 90 % degradácia.

10-dňové okno:

je 10 dní nasledujúcich po dosiahnutí 10 % degradácie.

DODATOK 2

VÝPOČET A STANOVENIE VHODNÝCH SUMÁRNYCH PARAMETROV

Určité sumárne parametre sa budú vyžadovať v závislosti od zvolenej metódy. Nasledujúca časť opisuje odvodenie týchto hodnôt. Použitie týchto parametrov je opísané pri jednotlivých metódach.

1. Obsah uhlíka

Obsah uhlíka sa vypočíta zo známeho elementárneho zloženia alebo sa stanoví elementárnou analýzou testovanej látky.

2. Teoretická spotreba kyslíka (ThOD)

Teoretická spotreba kyslíka (ThOD) sa môže vypočítať, ak je známe elementárne zloženie alebo stanovené elementárnou analýzou. Je pre látku



bez nitrifikácie

$$ThOD_{NH_4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

alebo s nitrifikáciou,

$$ThOD_{NO_3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Chemická spotreba kyslíka (CHSK)

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) je stanovená podľa metódy C.6.

4. Rozpustený organický uhlík (DOC)

Rozpustený organický uhlík (DOC) je v súlade s pojmami organický uhlík každej látky alebo prípravku, alebo zmesi vo vode prechádzajúci cez 0,45-mikrometrový filter.

Vzorky z testovaných nádob sa odoberajú a filtrujú okamžite vo filtračnom prístroji s použitím vhodného membránového filtra. Prvých 20 ml (množstvo sa môže zredukovať, keď sa používajú malé filtre) sa odstráni. Objemy 10 až 20 ml alebo nižšie, ak sú injektované (objem závisí od požadovaného množstva pre analyzátor uhlíka), sa nechávajú na analýzu uhlíka. Koncentrácia DOC sa stanoví pomocou analyzátora organického uhlíka, ktorý je schopný presne merať koncentráciu uhlíka ekvivalentnú alebo nižšiu ako 10 % počiatočnej koncentrácie DOC použitej v teste.

Filtrované vzorky, ktoré sa nemôžu analyzovať v ten istý pracovný deň, sa môžu chrániť skladovaním v chladničke pri teplote 2 – 4 °C počas 48 hodín alebo pri teplote pod –18 °C počas dlhšieho obdobia.

Poznámky:

Membránové filtre sú často impregnované povrchovo aktívnymi látkami kvôli hydrofilizácii. Takto filter môže obsahovať až niekoľko mg rozpustného organického uhlíka, ktorý by interferoval so stanovením biodegradability. Surfaktanty a iné rozpustné organické látky alebo prípravky sa odstraňujú z filtrov varom v deionizovanej vode trikrát po jednej hodine. Filtre sa potom môžu skladovať vo vode jeden týždeň. Ak sa použijú jednorazové filtre, je vždy potrebné sa presvedčiť, či neuvolňujú rozpustný organický uhlík.

V závislosti od typu membránového filtra sa môže testovaná látka alebo prípravok zachytávať adsorpciou. Preto môže byť vhodné uistiť sa, že sa testovaná látka alebo prípravok nezachytáva na filtri.

Odstreďovanie pri $40\,000\text{ m.s}^{-2}$ (4 000 g) počas 15 minút možno použiť na rozlíšenie TOC od DOC namiesto filtrácie. Metóda nie je vhodná pri počiatočnej koncentrácii menšej ako 10 mg DOC/liter, pretože nie sú odstránené všetky baktérie alebo uhlík ako súčasť bakteriálnej plazmy je znovu rozpustený.

LITERATÚRA

- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.
 - Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.
 - DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs-und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß 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.
-

DODATOK 3

VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATELNOSTI SLABO ROZPUSTNÝCH LÁTOK

Pri testoch biodegradovateľnosti slabo rozpustných látok je potrebné venovať pozornosť týmto požiadavkám.

Kým homogénne kvapaliny budú len zriedkavo predstavovať problém pri odbere vzoriek, odporúča sa, aby tuhé materiály boli homogenizované vhodným spôsobom, aby sa tak zabránilo chybám spôsobeným nehomogénnosťou. Špeciálnu pozornosť treba venovať v prípade požiadaviek na reprezentatívne vzorky niekoľkých miligramov zo zmesí látok alebo prípravkov, alebo látok s veľkým množstvom nečistôt.

Počas testov sa môžu použiť rôzne spôsoby miešania. Pozornosť by sa mala venovať len dostatočnému miešaniu, aby sa látka alebo prípravok udržiavali dispergované a aby sa zabránilo prehrievaniu, nadmernému peneniu a prílišným mechanickým silám.

Môže sa použiť emulzifikátor, ktorý zabezpečuje stabilnú disperziu látky alebo prípravku. Nemal by byť toxický pre baktérie a nesmie byť biodegradovateľný alebo spôsobovať penenie v podmienkach testu.

Pre rozpúšťadlá platia rovnaké kritériá ako pre emulzifikátor.

Neodporúča sa použitie pevných nosičov pre tuhé testované látky, ale môžu byť vhodné pre olejovité látky.

Pri použití pomocných látok, ako emulzifikátorov, rozpúšťadiel a nosičov, by sa mal vykonať slepý pokus s pomocnou látkou.

Každý z troch respirometrických testov CO₂, BSK, MITI sa môže použiť na výskum biodegradability slabo rozpustných látok alebo prípravkov.

LITERATÚRA

- (1) de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
 - (2) Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.
-

DODATOK 4

**VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATEĽNOSTI CHEMICKÝCH LÁTOK, PRI KTORÝCH EXISTUJE
PODOZRENIE, ŽE SÚ TOXICKÉ PRE INOKULUM**

Ak sa v teste ľahkej biodegradovateľnosti sa ukáže, že látka alebo prípravok nie sú biodegradovateľné, odporúča sa tento postup, ak je potrebné zistiť, či ide o inertnú látku, alebo dochádza k inhibícii (Reynolds et al., 1987).

Na testovanie toxicity a biodegradovateľnosti by sa mali použiť podobné alebo rovnaké inokulá.

Na vyhodnotenie toxicity látky alebo prípravku, skúmaných v testoch ľahkej biodegradovateľnosti, je vhodné použiť jeden z týchto testov alebo ich kombináciu: test inhibície aktivovaný kalom (inhibičný respirometrický test v aktívnom kale – smernica 88/302/EHS), BSK a/alebo metódy inhibície rastu.

Ak sa chceme vyhnúť inhibícii následkom toxicity, odporúča sa, aby koncentrácie testovanej látky použitej pri testovaní ľahkej biodegradovateľnosti boli menšie ako 1/10 hodnôt EC_{50} (alebo menšie ako hodnoty EC_{20}) získaných pri testovaní toxicity. Nie je pravdepodobné, aby látky s hodnotou EC_{50} väčšou ako 300 mg/liter mali toxické účinky v teste ľahkej biodegradovateľnosti.

Hodnoty EC_{50} menšie ako 20 mg/liter môžu pravdepodobne predstavovať vážne problémy pri následnom testovaní. Mali by sa použiť nízke skúšobné koncentrácie, ale potom je nutné použiť presný a citlivý test „uzavretej fľaše“ alebo použiť materiál označený ^{14}C . Prípadne aj aklimatizované inokulum umožňuje použitie vyšších koncentrácií testovanej látky. Avšak v tomto prípade sa stráca špecifické kritérium testu ľahkej biodegradovateľnosti.

LITERATÚRA

1. Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

DODATOK V

KOREKCIA NA SPOTREBU KYSLÍKA PRI INTERFERENCII NITRIFIKÁCIOU

Chyby spôsobené tým, že sa nitrifikácia neberie do úvahy pri hodnotení spotreby kyslíka pri teste biodegradovateľnosti látok neobsahujúcich dusík, sú okrajové (nie väčšie ako 5 %), a to aj v prípade, keď dochádza k rozdielnej oxidácii amóniového dusíka v teste a v slepom pokuse. V prípade testovaných látok, ktoré obsahujú dusík, však môže dôjsť k vážnym chybám.

Ak došlo k nekompletnej nitrifikácii, pozorovaná spotreba kyslíka reakčnou zmesou môže byť upravená na množstvo kyslíka použitého na oxidáciu amónia na dusitany a dusičnany, ak sú zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov počas inkubácie stanovené na základe týchto rovníc:



Celkovo:



Z rovnice (1) spotreba kyslíka 28 g dusíka obsiahnutého v chloride amónnom (NH_4Cl), ktorý je oxidovaný na dusitan, je 96 g, t. j. faktor 3,43 (96/28). Rovnakým spôsobom z rovnice (3), spotreba kyslíka, 28 g dusíka, ktorý je oxidovaný na dusičnan, je 128 g, t. j. faktor 4,57 (128/28).

Vzhľadom na to, že reakcie sa postupne vykonávajú rôznymi druhmi baktérií, je možné, aby koncentrácia dusitanov stúpala alebo klesala; v druhom prípade by malo dochádzať k ekvivalentnej tvorbe dusičnanov. Takto kyslík spotrebovaný pri tvorbe dusičnanov je 4,57-násobkom vzrastu koncentrácie dusičnanov a kyslík spojený s tvorbou dusitanov je 3,43-násobkom vzrastu koncentrácie dusitanov alebo s poklesom jeho koncentrácie strata kyslíka je - 3,43-násobkom poklesu koncentrácie.

To znamená:

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný na tvorbu dusičnanov} = 4,57 \times \text{nárast koncentrácie dusičnanov} \quad (4)$$

a

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný na tvorbu dusitanov} = 3,43 \times \text{nárast koncentrácie dusitanov} \quad (5)$$

a

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný pri strate dusitanov} = - 3,43 \times \text{pokles koncentrácie dusičnanov} \quad (6)$$

Takže:

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný nitrifikáciou} = \pm 3,43 \times \text{zmena v koncentrácii dusitanov} + 4,57 \times \text{nárast koncentrácie dusičnanov}, \quad (7)$$

a preto

$$\text{O}_2 \text{ spotrebovaný na oxidáciu C} = \text{celková pozorovaná spotreba} - \text{spotreba pri nitrifikácii} \quad (8)$$

Ak je alternatívne stanovený len celkový oxidovaný dusík, spotreba kyslíka nitrifikáciou sa môže považovať v prvom priblížení ako $4,57 \times \text{nárast oxidovaného dusíka}$.

Opravená hodnota spotreby kyslíka na oxidáciu C sa potom porovná s ThOD NH_3 vypočítanou podľa prílohy II.

C.5 DEGRADÁCIA – BIOCHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA**1. METÓDA****1.1. ÚVOD**

Účelom metódy je meranie biochemickej spotreby kyslíka (BSK) tuhými alebo kvapalnými organickými látkami.

Údaje získané týmto testom sú vhodné pre látky rozpustné vo vode; avšak aspoň principiálne sa môžu testovať aj látky prchavé a slabo rozpustné vo vode.

Metóda je použiteľná len pre také testované organické materiály, ktoré neinhibujú baktérie pri koncentrácii použitej v teste. Ak testovaný materiál nie je rozpustný pri testovanej koncentrácii, môžu sa použiť špeciálne opatrenia ako ultrazvuková dispergácia, aby sa dosiahla dobrá dispergácia testovaného materiálu.

Informácie o toxicite látky alebo prípravku môžu byť užitočné na interpretáciu nízkych výsledkov a pri výbere vhodných skúšobných koncentrácií.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Biochemická spotreba kyslíka (BSK) je definovaná ako množstvo rozpusteného kyslíka, ktoré si vyžaduje špecifikovaný objem roztoku látky na proces biochemickej oxidácie za predpísaných podmienok.

Výsledky sú vyjadrené v gramoch biochemickej spotreby kyslíka na gramy testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Je žiaduce použiť vhodnú referenčnú látku na skontrolovanie aktivity inokula.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované v dobre prevzdušnenom vhodnom médiu, sa inokuluje s mikroorganizmami a inkubuje pri konštantnej, definovanej okolitej teplote za tmy.

Biochemická spotreba kyslíka je stanovená rozdielom v obsahu rozpusteného kyslíka na začiatku a na konci testu. Test musí trvať aspoň 5 dní, ale nie dlhšie ako 28 dní.

Hodnota slepého pokusu sa musí stanoviť paralelným meraním za neprítomnosti testovanej látky.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Stanovenie biologickej spotreby kyslíka sa nemôže považovať za platné stanovenie biodegradovateľnosti látky. Tento test sa môže považovať len za skríningový test.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Predbežný roztok alebo disperzia látky sa pripraví s cieľom získať takú koncentráciu biochemickej spotreby kyslíka, ktorá bude kompatibilná s použitou metódou. Biochemická spotreba kyslíka sa potom stanoví akoukoľvek vhodnou vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Biochemická spotreba kyslíka nachádzajúca sa v predbežnom roztoku sa vypočíta podľa vybraných normalizovaných metód a prevedie sa na gramy biochemickej spotreby kyslíka (BSK) na gram testovanej látky.

3. **SPRÁVA**

V správe z testu sa uvedie použitá metóda.

Biochemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou (priemerom) aspoň z troch platných meraní.

Všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov, sa musia uviesť obzvlášť s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné zloženie látky, ktoré by ovplyvňovalo výsledky.

Použitie prídavkov na inhibíciu biochemickej nitrifikácie sa musí takisto uviesť.

4. **ODKAZY**

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. DEGRADÁCIA – CHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Účelom tejto metódy je meranie chemickej spotreby kyslíka tuhých alebo kvapalných organických látok štandardným spôsobom v stanovených laboratórnych podmienkach.

Informácie o vzorci látky budú potrebné pri vykonaní tohto testu a pri interpretácii získaných výsledkov (napr. halogenidy, železnaté soli organických zlúčenín, organochlórové zlúčeniny).

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Chemická spotreba kyslíka je mierou oxidovateľnosti látky vyjadrená v ekvivalentných množstvách kyslíka oxidujúceho reagentu spotrebúvaného látkou v stanovených laboratórnych podmienkach.

Výsledok je vyjadrený v gramoch chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nie je potrebné použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. Referenčné látky slúžia na kalibráciu metódy z času na čas, aby sa umožnilo porovnanie výsledkov, keď sa použije ďalšia metóda.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované vo vode, sa oxiduje dvojchrómanom draselným v médiu obsahujúcom silný roztok kyseliny sírovej a síranu strieborného ako katalyzátora pod refluxom 2 hodiny. Zvyškový dvojchróman je stanovený titráciou so štandardizovaným síranom železnatoamónnym.

V prípade látok obsahujúcich chlór sa pridáva síran ortuťnatý ⁽¹⁾ na zníženie interferencie chlóru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Vzhľadom na dohodnuté podmienky stanovenia je chemická spotreba kyslíka (CHSK) „ukazovateľom oxidovateľnosti“ a ako taký sa používa ako praktická metóda na meranie organickej hmoty.

V tomto teste môžu rušiť chloridy; na stanovenie CHSK môžu mať takisto vplyv anorganické redukčné a oxidačné látky.

Niektoré cyklické látky a mnoho prchavých látok (napr. nižšie mastné kyseliny) nie sú úplne oxidovateľné týmto testovacím postupom.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Prípraví sa počiatočný roztok alebo disperzia látky tak, aby sa dosiahla chemická spotreba kyslíka (CHSK) od 250 do 600 mg/l.

Poznámky:

V prípade slabo rozpustných a nedispergovateľných látok sa približne také množstvo práškovej látky alebo kvapaliny, ktoré zodpovedá 5 mg chemickej spotreby kyslíka, naváži a dá do experimentálneho prístroja s vodou.

⁽¹⁾ S roztokmi obsahujúcimi ortuťnaté soli sa po použití zaobchádza tak, aby nedošlo k prieniku ortuti do životného prostredia.

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) sa často a špeciálne v prípade slabo rozpustných látok stanoví výhodne rôznymi modifikáciami tejto metódy, napr. v uzavretom priestore s vyrovnávaním tlaku (K. Kelkenberg, 1975). V tejto modifikácii látok, ktoré sú len ťažko stanoviteľné konvenčnou metódou – napríklad kyselina octová – sa môžu často úspešne kvantifikovať. Avšak táto metóda zlyháva v prípade pyridínu. Ak sa koncentrácia dvojchrómanu draselného, ako je uvedená v odkaze (1), zvýši na 0,25 N (0,0416 M), priame naváženie 5 mg až 10 mg látky je uľahčené, čo je nevyhnutné pre stanovenie chemickej spotreby kyslíka slabo rozpustných látok vo vode [odkaz (2)].

Chemická spotreba kyslíka sa stanoví akoukoľvek vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Chemická spotreba kyslíka obsiahnutá v experimentálnej banke sa vypočíta podľa vybranej normalizovanej metódy a konvertuje sa na gramy chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

3. SPRÁVA

V správe z testu sa uvedie odkaz na použitú metódu.

Chemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou aspoň z troch platných meraní. Všetky informácie a poznámky, ktoré sú relevantné pre interpretáciu výsledkov, sa uvedú s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné vlastnosti látky (ak sú známe), ktoré by ovplyvňovali výsledky.

Použitie síranu ortuťnatého na minimalizovanie interferencie chloridu sa musí tiež uviesť.

4. ODKAZY

- (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.

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of chemical oxygen demand (CHSK) 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.

C.7. DEGRADÁCIA – ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA: HYDROLÝZA AKO FUNKCIA pH**1. METÓDA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 111 (2004).

1.1. ÚVOD

Chemické látky sa môžu dostávať do povrchových vôd napríklad priamou aplikáciou, rozprášením, odtokom, kanalizáciou, zneškodňovaním odpadu, odpadovými vodami z priemyslu, domácností alebo poľnohospodárstva, atmosférickým vylučovaním a v týchto vodách sa môžu transformovať chemickými (napr. hydrolýzou a oxidáciou), fotochemickými a/alebo mikrobiálnymi procesmi. V tomto usmernení sa opisuje laboratórna testovacia metóda na posudzovanie abiotických hydrolytických transformácií chemických látok vo vodných systémoch pri takých hodnotách pH, aké sú bežné v životnom prostredí (pH 4 – 9) a usmernenie je založené na súčasných usmerneniach [pozri odkazy na literatúru (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7)].

Experimenty sa vykonávajú na stanovenie i) rýchlosti hydrolýzy testovanej látky ako funkcie pH a ii) identity alebo povahy a rýchlosti tvorby a degradácie produktov hydrolýzy, ktorým môžu byť organizmy exponované. Takéto štúdie možno požadovať pre chemické látky, ktoré sa priamo aplikujú do vody alebo ktoré sa môžu dostať do životného prostredia inými uvedenými cestami.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Pozri prílohu 2.

1.3. POUŽITELNOSŤ METÓDY

Táto metóda je vo všeobecnosti použiteľná na chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je dostupná analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na málo prchavé a neprchavé látky s dostatočnou rozpustnosťou vo vode. Test by sa nemal používať na veľmi prchavé chemické látky, ktoré sa z vody ľahko uvoľňujú (napr. vyparujúce sa látky, organické rozpúšťadlá) a nemožno ich udržať v roztoku pri experimentálnych podmienkach na vykonávanie tohto testu. Tento test možno ťažko uskutočniť s látkami, ktoré vykazujú minimálnu rozpustnosť vo vode [(pozri odkaz na literatúru (8)].

1.4. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Do sterilných vodných tlmivých roztokov s rozličnou hodnotou pH (pH 4, 7 a 9) sa pridá testovaná látka a nechajú sa inkubovať v tme za kontrolovaných laboratórnych podmienok (pri konštantnej teplote). Po uplynutí príslušných časových intervalov sa tlmivé roztoky analyzujú z hľadiska testovanej látky a produktov hydrolýzy. Použitím značenej testovanej látky (napr. ^{14}C) možno ľahšie určiť látkovú bilanciú.

Táto testovacia metóda je vypracovaná ako viacstupňový prístup, ktorý je znázornený a vysvetlený v dodatku 1. Každý stupeň vychádza z výsledkov predchádzajúceho stupňa.

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery hydrolýzy možno použiť neznačenú alebo značenú testovaciu látku. Vo všeobecnosti sa pri štúdiu mechanizmu hydrolýzy a určenia látkovej bilancie dáva prednosť značenému materiálu; v osobitných prípadoch však značenie nemusí byť absolútne nevyhnutné. Odporúča sa značenie izotopom ^{14}C , užitočné však môže byť aj značenie inými izotopmi, ako napríklad ^{13}C , ^{15}N alebo ^3H . Pokiaľ je to možné, značka by sa mala umiestniť do najstabilnejšej časti (najstabilnejších častí) molekuly. Ak napríklad molekula testovanej látky obsahuje jeden kruh, požaduje sa značenie na tomto kruhu; ak testovaná látka obsahuje dva kruhy alebo viacero kruhov, môže vzniknúť potreba vykonať individuálne štúdie o vyhodnotení osudu každého značeného kruhu na získanie vhodných informácií o tvorbe produktov hydrolýzy. Čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred vykonaním testu hydrolýzy by mali byť k dispozícii tieto informácie o testovanej látke:

- a) rozpustnosť vo vode [testovacia metóda A.6];
- b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;
- c) tlak pár [testovacia metóda A.4] a/alebo Henryho konštanta;

- d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda [testovacia metóda A.8];
- e) disociačná konštanta (pK_a) [usmernenie OECD 112] (9);
- f) v odôvodnenom prípade rýchlosť priamej a nepriamej fototransformácie vo vode.

Mali by byť dostupné analytické metódy stanovenia množstva testovanej látky, a ak je to dôležité, aj identifikácie a stanovenia množstva produktov hydrolýzy vo vodných roztokoch (pozri aj časť 1.7.2).

1.6. REFERENČNÉ LÁTKY

Ak je to možné, na identifikáciu a stanovenie množstva produktov hydrolýzy spektroskopickými, chromatografickými alebo inými vhodnými citlivými metódami by sa mali použiť referenčné látky.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. Výťažnosť

Analýza aspoň dvoch tlmivých roztokov alebo ich extraktov vykonaná ihneď po pridaní testovanej látky poskytuje prvú indikáciu opakovateľnosti analytickej metódy a jednotnosti aplikačného postupu pre testovanú látku. Výťažnosti pre neskoršie štádiá experimentov vyplývajú z príslušných látkových bilancií (pri použití značeného materiálu). Výťažky by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % (7) pri značených aj neznačených chemických látkach. V prípade, že je technicky náročné dosiahnuť tento rozsah, pre neznačené chemické látky je prijateľná výťažnosť 70 %, treba však uviesť zdôvodnenie.

1.7.2. Opakovateľnosť a citlivosť analytickej metódy

Opakovateľnosť analytickej metódy (analytických metód) používanej (používaných) neskôr na stanovenie množstva testovanej látky a produktov hydrolýzy možno overiť duplikátnou analýzou rovnakých tlmivých roztokov (alebo ich extraktov) po vytvorení dostatočného množstva produktov hydrolýzy na stanovenie množstva.

Analytická metóda by mala byť dostatočne citlivá na stanovenie množstva testovanej látky pri jej koncentrácii 10 % alebo pri nižšej východiskovej koncentrácii. Ak je to relevantné, analytické metódy by mali byť dostatočne citlivé, aby bolo možné stanoviť množstvo akéhokoľvek produktu hydrolýzy predstavujúci 10 % alebo viac aplikovanej (v ktoromkoľvek čase počas vykonávania štúdie) do 25 % alebo ešte menej jeho maximálnej koncentrácie.

1.7.3. Intervaly spoľahlivosti pre kinetické údaje hydrolýzy

Intervaly spoľahlivosti by sa mali vypočítavať a uviesť pre všetky regresné koeficienty, rýchlostné konštanty, polčasy degradácie a akékoľvek ďalšie kinetické parametre (napr. DT50).

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.8.1. Zariadenie a aparatúra

Štúdiá by sa mala vykonávať v sklených nádobách (napr. skúmavkách, malých bankách), v tme a sterilných podmienkach, ak treba, pokiaľ z predchádzajúcich informácií (napr. zo stanovenia rozdeľovacieho koeficientu n-oktanol-voda) nevyplýva, že testovaná látka môže priľnúť ku sklu. V takýchto prípadoch môže nastať nutnosť zvážiť použitie alternatívnych materiálov (napr. teflónu). Takisto je možné problém priľnavosti ku sklu zmierniť použitím jednej alebo viacerých z týchto metód:

- stanovenie hmotnosti testovanej látky a produktov hydrolýzy sorbovaných na testovacej nádobe,
- použitie ultrazvukového kúpeľa,
- zabezpečenie umytia všetkých sklených nádob rozpúšťadlom v každom intervale odberu vzorky,
- použitie zložených produktov,

- použitie zvýšeného množstva prídavného riedidla pri pridávaní testovanej látky do systému; ak sa použije prídavné riedidlo, malo by sa použiť také riedidlo, ktoré nespôsobuje hydrolýzu testovanej látky.

Bežne sa vyžaduje použitie vodných trepačiek s reguláciou teploty alebo termostaticky riadených inkubátorov na inkubáciu rozličných testovacích roztokov.

Ďalej sa vyžaduje štandardné laboratórne vybavenie, najmä toto:

- pH meter,
- analytické prístroje, ako napríklad zariadenia GC, HPLC, TLC, vrátane príslušných detekčných systémov na analyzovanie neznámych a rádioizotopmi značených látok alebo na metódu riedenia inverzných izotopov,
- prístroje na účely identifikácie (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.),
- kvapalinový scintilačný čítač,
- oddeľovacie lieviky na extrakciu kvapaliny kvapalinou,
- zariadenia na koncentrovanie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka),
- zariadenie na reguláciu teploty (napr. vodný kúpeľ).

Medzi používané chemické reagenty patria napríklad:

- organické rozpúšťadlá analytickej čistoty, napr. hexán, dichlórmetán atď.,
- scintilačná kvapalina,
- tlmivé roztoky (podrobnosti pozri v časti 1.8.3).

Všetko laboratórne sklo, čistá voda a tlmivé roztoky používané na testy hydrolýzy by sa mali sterilizovať.

1.8.2. Aplikácia testovanej látky

Testovaná látka by sa mala aplikovať ako vodný roztok do rôznych tlmivých roztokov (pozri prílohu 3). Ak je to potrebné pre správne rozpustenie, povoľuje sa použiť malé množstvá rozpúšťadiel miešateľných s vodou (ako napr. acetonitrilu, acetónu, etanolu) na účely aplikácie a distribúcie testovanej látky, ale toto množstvo by nemalo presiahnuť 1 % v/v. V prípade, že sa uvažuje o použití vyššej koncentrácie rozpúšťadiel (napr. v prípade málo rozpustných testovaných látok), je to povolené len vtedy, ak možno preukázať, že riedidlo nemá vplyv na hydrolýzu testovaných látok.

Bežne sa neodporúča používať zložené produkty, pretože nemožno vylúčiť ovplyvnenie procesu hydrolýzy zloženými prísadami. Pri testovaných látkach, ktoré sú málo rozpustné vo vode, alebo pri látkach s priľnavosťou ku sklu (pozri časť 1.8.1) môže byť použitie zloženého materiálu vhodnou alternatívou.

Mala by sa používať jedna koncentrácia testovanej látky; táto koncentrácia by nemala byť vyššia ako 0,01 M alebo vyššia ako polovica nasýtenej koncentrácie (pozri prílohu 1).

1.8.3. Tlmivé roztoky

Test hydrolýzy by sa mal vykonávať pri hodnotách pH 4, 7 a 9. Na tento účel by sa mali pripraviť tlmivé roztoky použitím čistých chemikálií a vody. Niektoré užitočné tlmivé roztoky sú uvedené v dodatku 3. Treba poznamenať, že použitý systém tlmivého roztoku môže mať vplyv na rýchlosť hydrolýzy, a keď sa takýto jav pozoroval, mal by sa použiť tlmivý roztok s inými zložkami⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Mabey a Mill odporúčali používať tlmivé roztoky bóritanu a acetátu namiesto fosfátu (11).

Hodnota pH každého tlmivého roztoku by sa mala prekontrolovať kalibrovaným pH-metrom, pri požadovanej teplote má byť presnosť aspoň 0,1 jednotky pH.

1.8.4. Podmienky vykonania testu

1.8.4.1. Teplota pre teste

Experiment s hydrolyzou by sa mal vykonávať pri konštantných teplotách. Na účely extrapolácie je dôležité udržiavať teplotu s presnosťou aspoň v rozmedzí $\pm 0,5$ °C.

Ak nie je známe hydrolytické správanie sa testovanej látky, predbežný test (stupeň 1) by sa mal vykonávať pri teplote 50 °C. Kinetické testy vyššieho stupňa by sa mali vykonávať aspoň pri troch teplotách (vrátane testu pri 50 °C), pokiaľ nebolo v teste prvého stupňa stanovené, že testovaná látka je hydrolyticky stabilná. Navrhovaný teplotný rozsah je od 10 °C do 70 °C (prednostne s využitím jednej teploty nižšej ako 25 °C), ktorý zahŕňa uvádzanú teplotu 25 °C a väčšinu teplôt, ktoré sú v danom prostredí bežné.

1.8.4.2. Svetlo a kyslík

Všetky testy hydrolyzy by sa mali vykonávať s použitím akejkoľvek vhodnej metódy, aby sa zabránilo fotolytickému efektu. Pri všetkých meraniach sa treba vyhnúť prítomnosti kyslíka (napr. prebublávaním hélia, dusíka alebo argónu po dobu 5 minút pred prípravou roztoku).

1.8.4.3. Doba trvania testu

Predbežný test by mal trvať 5 dní kým testy vyššieho stupňa by mali trvať taký čas, aby zhydrolyzovalo 90 % testovanej látky alebo 30 dní, podľa toho, čo nastane skôr.

1.8.5. Vykonanie testu

1.8.5.1. Predbežný test (stupeň 1)

Predbežný test sa vykonáva pri teplote 50 °C $\pm$ 0,5 °C a pri hodnote pH 4,0, 7,0 a 9,0. Ak po 5 dňoch pozoruje hydrolyza nižšia ako 10 percent, ($t_{0,5\ 25\ ^\circ\text{C}} > 1$ rok), testovaná látka sa pokladá hydrolyticky za stabilnú a bežne sa nevyžadujú ďalšie testy. Ak je látka známa ako nestabilná pri teplotách bežných v životnom prostredí⁽¹⁾, predbežný test sa nevyžaduje. Analytická metóda musí byť dostatočne presná a citlivá na detekciu zníženia celkovej pôvodnej koncentrácie o 10 percent.

1.8.5.2. Hydrolyza nestabilných látok (stupeň 2)

Test vyššieho stupňa (pokročilý test) by sa mal vykonať pri hodnotách pH, pri ktorých bola zistená nestabilita testovanej látky, ako je to vymedzené v uvedenom predbežnom teste. Pufrované roztoky testovanej látky by sa mali uchovávať v termostatoch pri zvolených teplotách. Na vykonanie testu na reakcie prvého rádu by sa mal každý reakčný roztok analyzovať v časových intervaloch, ktorými sa získa minimálne šesť oddelených časových údajov, väčšinou v čase medzi 10 % až 90 % hydrolyzou testovanej látky. Jednotlivé vzorky opakovaných testov (minimálne dve duplikátne vzorky obsiahnuté v samostatných reakčných nádobách) by sa mali odobrať a ich obsah treba analyzovať v každom z minimálne šiestich intervaloch odberu vzoriek (aspoň pri dvanástich opakovaných údajových bodoch). Použitie jednej veľkej vzorky, z ktorej sa odoberajú jednotlivé malé množstvá testovaných roztokov v každom intervale odoberania vzoriek, sa pokladá za nevhodné, pretože neumožňuje sa tým analyzovať premenlivosť údajov a môže dôjsť k problémom súvisiacim s kontamináciou testovaného roztoku. Na konci testu vyššieho stupňa by sa mali vykonať testy potvrdenia sterility (t. j. pri 90 % hydrolyze alebo po 30 dňoch). Ak sa však nepozorovala žiadna degradácia (t. j. transformácia), vykonanie testov sterility sa nepokladá za potrebné.

1.8.5.3. Identifikácia produktov hydrolyzy (stupeň 3)

Všetky hlavné produkty hydrolyzy predstavujúce > 10 % aplikovanej dávky látky treba identifikovať vhodnými analytickými metódami.

1.8.5.4. Voliteľné testy

V prípade hydrolyticky nestabilnej testovanej látky môže byť potrebné vykonať ďalšie testy pri iných hodnotách pH ako 4, 7 a 9. Napríklad sa môže vyžadovať test v kyslejšom prostredí (napr. pri pH 1,2) pri jednej fyziologicky relevantnej teplote (37 °C).

⁽¹⁾ Takéto informácie môžu pochádzať z iných zdrojov, ako sú napríklad údaje o hydrolyze štruktúrne podobných zlúčenín z literatúry alebo z iných predbežných, polokvantitatívnych testov hydrolyzy s testovanou látkou v skoršom štádiu vývoja.

2. ÚDAJE

Množstvo testovanej látky a produktov hydrolyzy, ak vznikajú, sa uvádzajú ako % z pôvodne aplikovanej koncentrácie, prípadne ako mg/l pre každý interval odberu vzorky pre jednotlivé hodnoty pH a teploty pri teste. Okrem toho by sa mala uviesť látková bilancia v percentách pôvodne aplikovanej koncentrácie, ak bola použitá značená testovaná látka.

Malo by sa uviesť grafické znázornenie log-transformovaných údajov koncentrácií testovanej látky oproti času. Mali by sa identifikovať všetky hlavné produkty hydrolyzy, aspoň tie, ktoré predstavujú > 10 % aplikovanej dávky, a potom treba graficky zaznamenať ich log-transformované koncentrácie rovnakým spôsobom ako pre materskú látku, aby bolo možné zobraziť rýchlosť ich tvorby a degradácie.

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Presnejšie stanovenie hodnôt polčasov degradácie alebo DT_{50} sa dosiahne použitím výpočtov podľa vhodného kinetického modelu. Hodnoty polčasu degradácie a/alebo DT_{50} (vrátane medzí spoľahlivosti) by sa mali uviesť pre každú hodnotu pH a teplotu spolu s opisom použitého modelu, kinetického poriadku a koeficientu stanovenia (r^2). Výpočty by sa mali v prípade vhodnosti použiť aj pre produkty hydrolyzy.

V prípade, že sa štúdie rýchlosti hydrolyzy vykonávajú pri rôznych teplotách, mali by sa opísať pseudorýchlostné konštanty hydrolyzy prvého rádu (k_{obs}) ako funkcia teploty. Výpočet by mal byť založený jednak na rozdelení k_{obs} na rýchlostné konštanty pre hydrolyzu kyslou katalýzou, neutrálnou a bázickou katalýzou (k_H , $k_{neutral}$, respektíve k_{OH}) a jednak na vzťahoch Arrheniovej rovnice:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kde A_i a B_i sú regresné koeficienty úseku priamky respektíve sklonu najvhodnejších priamok vytvorených z lineárne klesajúceho $\ln k_i$ oproti prevrátenej hodnote absolútnej teploty v Kelvinoch (T). Pomocou využitia Arrheniových vzťahov pre hydrolyzu kyslú, neutrálnu a bázickú je možné vypočítať rýchlostné konštanty pseudoprvého rádu, a tým taktiež polčasy degradácie pre ostatné teploty, pre ktoré priame experimentálne stanovenie rýchlostnej konštanty nie je vykonateľné (10).

2.2. VYHODNOTENIE A VÝKLAD VÝSLEDKOV

Väčšina hydrolytických reakcií sa riadi zjavnými reakčnými rýchlosťami prvého rádu, a preto sú polčasy degradácie nezávislé od koncentrácie (pozri rovnicu 4 v dodatku 2). To zvyčajne umožňuje používanie laboratórnych výsledkov stanovených pri 10^{-2} až 10^{-3} M v podmienkach v životného prostredia ($< 10^{-6}$ M) (pozri odkaz na literatúru 10). Mabey a Mill (pozri odkaz 11) uviedli viacero príkladov zhody medzi rýchlosťami hydrolyzy nameranej ako v čistej, tak aj v prírodnej vode pri mnohých chemických látkach s tým, že sa merala hodnota pH aj teplota.

3. VYPRACOVANIE SPRÁVY

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

- bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec (s vyznačením umiestnenia značky, ak sa používa značkovanie rádioaktívnym izotopom) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri časť 1.5),
- čistota (nečistoty) testovanej látky,
- čistota značky chemickej látky značenej rádioaktívnym izotopom a mólová aktivita (ak je to vhodné).
- Tlmivé roztoky
- dátumy a podrobnosti o príprave,

- použité tlmivé roztoky a použité vody,
- molarita a hodnota pH tlmivých roztokov.

Podmienky vykonávania testu:

- dátumy vykonávania štúdií,
- množstvo aplikovanej testovanej látky,
- metóda a rozpúšťadlá (typ a množstvo) použité na aplikáciu testovanej látky,
- objem inkubovaných tlmivých roztokov testovanej látky,
- opis použitého inkubačného systému,
- hodnota pH a teplota počas vykonávania štúdie,
- časy odberu vzoriek,
- metóda (metódy) extrakcie,
- metódy stanovenia a identifikácie testovanej látky a jej produktov hydrolýzy v tlmivých roztokoch,
- počet opakovaní.

Výsledky:

- opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,
- výťažnosť (% hodnoty sú pre platné štúdie uvedené v časti 1.7.1),
- opakované údaje a stredné hodnoty v tabuľkovej forme,
- látková bilancia počas vykonávania štúdií a na jeho konci (pri použití značenej testovanej látky),
- výsledky predbežného testu,
- rozbor a výklad výsledkov,
- všetky pôvodné údaje a čísla.

Nasledujúce informácie sa vyžadujú iba pri stanovení rýchlosti hydrolýzy:

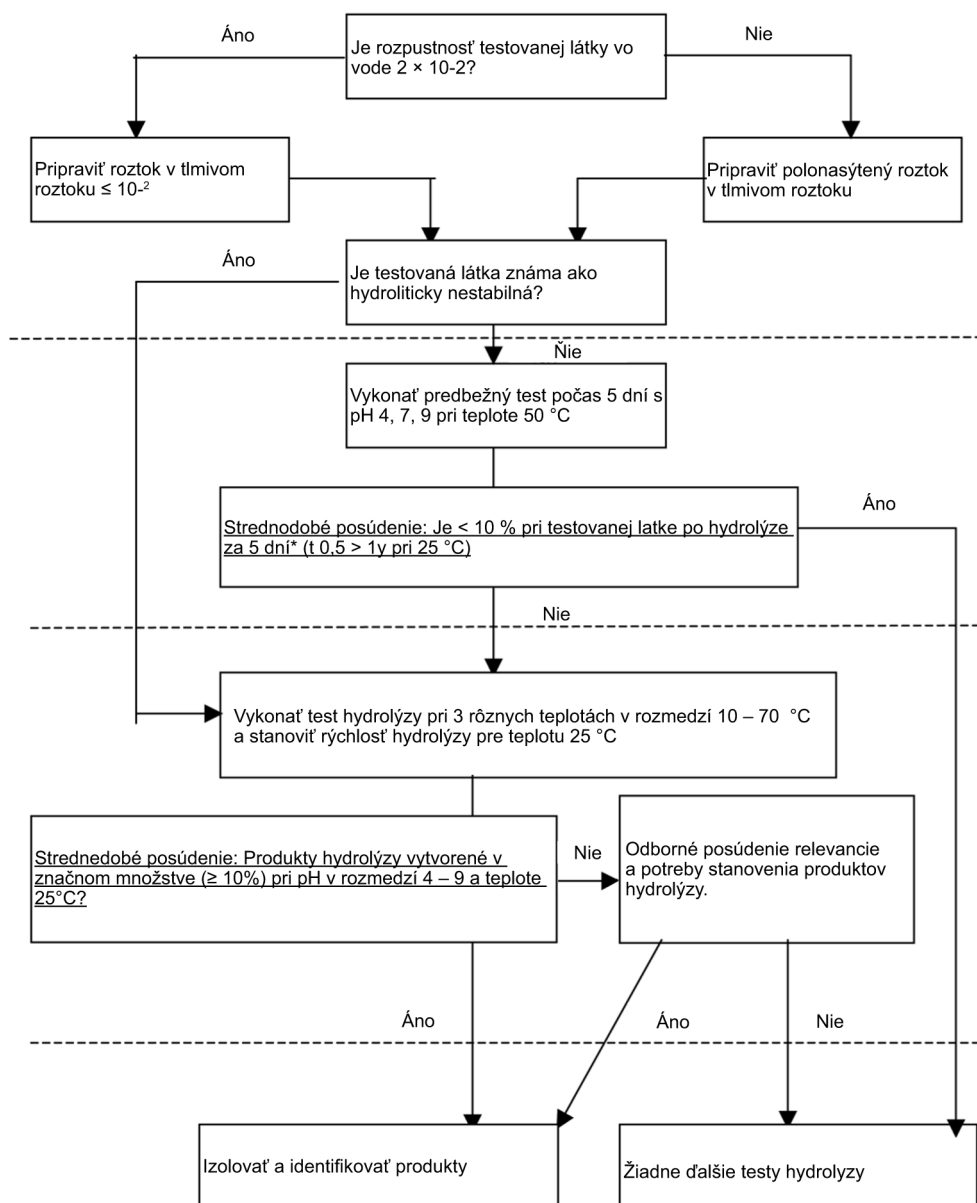
- grafické znázornenie koncentrácií v prípade testovanej látky oproti času, a ak je to vhodné, aj v prípade produktov hydrolýzy pre každú hodnotu pH a teplotu,
- tabuľky výsledkov Arrheniovej rovnice pre teplotu 20 °C/25 °C, s uvedením hodnoty pH, rýchlostnej konštanty [h^{-1} alebo deň^{-1}], polčasu degradácie alebo DT_{50} , teploty [°C] vrátane medzí spoľahlivosti a korelačných koeficientov (r^2) alebo porovnateľné informácie,
- navrhovaný mechanizmus hydrolýzy.

4. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (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) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.
- (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.

DODATOK 1

Schéma stupňovitého testu hydrolýzy



* 10 % hydrolýza testovanej látky pri teplote 50 °C zodpovedá polčas rozpadu v dĺžke približne 30 dní, čo zodpovedá približne 1 roku pri teplote 25 °C.

PRÍLOHA 2

Vymedzenie pojmov a jednotky

Štandardné medzinárodné (SI) jednotky by sa mali používať v každom prípade.

Testovaná látka: akákoľvek látka, či už materská zlúčenina alebo relevantné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré sú výsledkom biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej látky.

Produkty hydrolýzy: všetky látky, ktoré sú výsledkom hydrolytických transformačných reakcií testovanej látky.

Hydrolýza znamená reakciu testovanej látky RX s vodou, s čistou výmenou skupiny X za skupinu OH v reakčnom jadre:



Rýchlosť, ktorou sa znižuje koncentrácia RX v tomto zjednodušenom procese, je daná týmto vzťahom:

rýchlosť = $k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}]$ reakcia druhého rádu

alebo

rýchlosť = $k [\text{RX}]$ reakcia prvého rádu

v závislosti od rýchlosti určujúceho kroku. Pretože voda je v porovnaní s testovanou látkou prítomná vo veľkej prevahe, tento druh reakcie sa zvyčajne opisuje ako reakcia pseudoprvého rádu, v ktorej je pozorovaná rýchlostná konštanta daná vzťahom

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

a možno ju stanoviť z rovnice (*)

$$k_{\text{obs}} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

kde

t = čas

a C_0 , C_t = koncentrácia RX v čase 0 a v čase t.

Jednotky tejto konštanty majú rozmery (čas)⁻¹ a polčasu degradácie reakcie (čas na reakciu 50 % RX) a sú dané vzťahom

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \quad [4]$$

Polčas degradácie: ($t_{0,5}$) je čas potrebný na 50 % hydrolýzu testovanej látky, ak reakciu možno opísať kinetikou prvého rádu: nezávisí od koncentrácie.

DT₅₀ (čas úbytku 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %; je odlišný od polčasu degradácie $t_{0,5}$, ak sa reakcia neriadi kinetikou prvého rádu.

(*) Ak grafické znázornenie log-transformovaných údajov oproti času neindikuje lineárnu funkciu (zodpovedajúcu pomeru reakcie prvého rádu), potom nie je použitie rovnice [3] vhodné na stanovenie rýchlostnej konštanty hydrolýzy testovanej zložky.

Odhad rýchlostnej konštanty k pri rozdielnych teplotách

Ak sú známe hodnoty rýchlostnej konštanty pri dvoch teplotách, rýchlostnú konštantu pri inej teplote možno vypočítať použitím Arrheniovej rovnice:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ alebo } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Grafické znázornenie $\ln k$ proti $1/T$ vykazuje rovnú čiaru so sklonom $-E/R$,

kde:

k = rýchlostná konštanta zmeraná pri rozličných teplotách,

E = aktivačná energia [kJ/mol],

T = absolútna teplota [K],

R = plynová konštanta [8,314 J/mol.K].

Aktivačná energia sa vypočítala pomocou regresnej analýzy alebo tejto rovnice:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kde: $T_2 > T_1$.

DODATOK 3

Tlmivé systémy

A. CLARK AND LUBS:

Tlmivé zmesi CLARK a LUBS (*)

Zloženie	pH
0,2 N HCl a 0,2 N KCl pri 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	2,2
0,1 M hydrogénftalán draselný + 0,1 N HCl pri 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,8
0,1 M hydrogénftalán draselný + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,8

(*) Hodnoty pH uvedené v týchto tabuľkách sa vypočítali na základe potenciálnych meraní pomocou Sørensenových štandardných rovníc (1909). Zodpovedajúce hodnoty pH sú o 0,04 jednotiek vyššie ako hodnoty v tabuľkách.

Zloženie	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	6,0

Tlmiivé zmesi CLARK a LUBS (pokračovanie)

0,1 M dihydrogénfosforečnan draselný + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml 100 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	8,0
0,1 M H₃BO₃ v 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,2

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF A VLEESCHHOUWER:**

Citranové tlmivé roztoky KOLTHOFF a VLEESCHHOUWER

Zloženie	pH
0,1 M citran draselný a 0,1 N HCl pri 18 °C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,6
0,1 0,2 M citran draselný a 0,1 N NaOH pri 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	6,0

(*) Pridajte drobný kryštál tymolu alebo podobnej látky, aby sa zabránilo rastu plesní.

C. SÖRENSEN:

Boritanové zmesi SÖRENSEN

Zloženie		Sörensen 18 °C	Walbum, pH pri		
ml boraxu	ml HCl/ NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M bórax + 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 bórax + 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

Fosforečnanové zmesi podľa SÖRENSEN

Zloženie	pH
0,0667 M dihydrogénfosforečnan draselný + 0,0667 M hydrogénfosforečnan disodný pri 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6
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

C.8. TOXICITA NA DÁŽĎOVKÁCH

UMELOPÔDNY TEST

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

V tomto laboratórnom teste sa testovaná látka pridáva do umelej pôdy, v ktorej sú po dobu 14 dní umiestnené dážďovky. Po tomto čase (alternatívne po 7 dňoch) sa zisťuje letálny efekt testovanej látky na dážďovky. Test poskytuje metódu na relatívne krátkodobé sledovanie účinku chemických látok na dážďovky cez príjem pokožkou a tráviacim traktom.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

LC₅₀: Koncentrácia testovanej látky, ktorá usmrtí 50 % testovacích organizmov počas doby experimentu.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Referenčná látka sa periodicky používa na preukázanie, že citlivosť testovacieho systému sa významne nezmenila.

Ako referenčná látka sa odporúča chloroacetamid analytickej čistoty.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Pôda je variabilné médium, a preto sa v tomto teste používa presne definovaná ílovitá umelá pôda. Dospelé dážďovky druhu *Eiseniafoetida* (pozri poznámku v dodatku) sú uchovávané v definovanej umelej pôde v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej látky. Obsah nádoby sa po 14 dňoch (alternatívne po 7 dňoch) od začiatku testu vysype na tácku a pre každú testovanú koncentráciu sa počíta množstvo prežívajúcich dážďoviek

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Test je navrhnutý tak, aby bol v maximálnej miere reprodukovateľný vzhľadom na použitú testovanú látku a organizmus. Mortalita v kontrole nesmie presiahnuť na konci testu 10 %, v opačnom prípade je test neplatný.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Materiál

1.6.1.1. Testovací substrát

Ako základný substrát je používaná presne definovaná umelá pôda.

a) Základný substrát (percentá sú uvedené pre sušinu)

- 10 % rašeliny (pH čo najbližšie k 5,5 až 6,0, bez viditeľných rastlinných zvyškov a jemne rozdrvená),
- 20 % kaolínovej hliny s obsahom kaolínu prednostne vyšším ako 50 %,
- približne 69 % priemyselného kremenného piesku (prevažne jemný piesok, kde viac ako 50 % častíc má veľkosť 0,05 až 0,2 mm). Ak látka nie je dostatočne dispergovateľná vo vode, 10 g látky na jednu testovaciu nádobu by malo byť ponechané na dodatočné zmiešanie s testovanou látkou,
- približne 1 % uhličitanu vápenatého (CaCO₃), práškový, chemicky čistý, pridávaný na vyrovnanie pH k 6,0 ± 0,5.

b) Testovací substrát

Testovací substrát obsahuje základný substrát, testovanú látku a deionizovanú vodu.

Obsah vody je približne 25 až 42 % sušiny základného substrátu. Obsah vody v substráte sa určuje vysušením vzorky na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kľúčovým kritériom vlhkosti umelej pôdy je neprítomnosť stojacej vody. Pozorne treba dohliadať na rovnomerné premiešanie testovanej látky a substrátu. Spôsob zapracovania testovanej látky do substrátu musí byť uvedený.

c) Kontrolný substrát

Kontrolný substrát obsahuje základný substrát a vodu. Ak je použitá nejaká aditívna látka, dodatočná kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo tejto aditívnej látky.

1.6.1.2. Testovacie nádoby

Testovacími nádobami sú sklenené nádoby s objemom približne 1 liter (primerane zakryté plastovými vŕchnákmi, miskami alebo fóliou s vetracími otvormi) naplnené testovacím alebo kontrolným substrátom, ktorý zodpovedá 500 g sušiny substrátu.

1.6.2. Podmienky testu

Nádoby by mali byť uskladnené v klimatizovaných miestnostiach pri teplote 20 ± 2 °C a pri stálom osvetlení. Intenzita svetla sa odporúča 400 – 800 luxov.

Doba experimentu je 14 dní, ale mortalita môže byť alternatívne hodnotená po 7 dňoch od začatia testu.

1.6.3. Postup testu

Testovacie koncentrácie

Koncentrácie testovanej látky sú vyjadrené ako hmotnosť látky na hmotnosť sušiny základného substrátu (mg/kg).

Test na vyhľadávanie rozsahu

Rozpätie koncentrácií spôsobujúcich mortalitu od 0 do 100 % môže byť stanovené v teste na vyhľadávanie rozsahu, pri ktorom sa získajú informácie o tom, ktoré koncentrácie sa použijú v konečnom teste.

Látka by mala byť testovaná v nasledovných koncentráciách: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg látky/kilogram testovacieho substrátu (sušiny).

Ak sa uskutočňuje konečný test v plnom rozsahu, v teste na vyhľadávanie rozsahu by mala byť dostačujúca jedna testovacia skupina na koncentráciu a jedna neovplyvnená kontrola, každá po 10 jedincov.

Konečný test

Výsledky testu na vyhľadávanie rozsahu sa použijú na výber najmenej 5 koncentrácií v geometrickom rade tak, aby pokrývali rozpätie mortality 0 až 100 % a odlišujúcich sa od seba konštantným faktorom nepresahujúcim hodnotu 1,8.

Testy s použitím týchto koncentrácií by mali umožniť čo najpresnejšie stanovenie koncentrácie LC_{50} a jej hranice významnosti.

V konečnom teste sú zahrnuté najmenej 4 testované skupiny na koncentráciu a 4 neovplyvnené kontroly, každá po 10 jedincov. Výsledky v paralelných skupinách sa uvádzajú ako priemer a smerodajná odchýlka.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8 dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota LC_{50} .

Zmes základného testovacieho substrátu a testovanej látky

Testovací substrát by podľa možnosti mal byť pripravený bez akýchkoľvek prísad iných ako voda. Bezprostredne pred začatím testu sa emulzia alebo disperzia testovanej látky v deionizovanej vode alebo inom rozpúšťadle zmieša so základným testovacím substrátom, alebo je na substrát rovnomerne nastriekaná jemným chromatografickým alebo podobným sprejom.

Ak je testovaná látka nerozpustná vo vode, môže byť rozpustená v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexán, acetón alebo chloroform).

Na rozpustenie, dispergovanie alebo emulgovanie testovanej látky môžu byť použité len činidlá, ktoré sú ľahko prchavé. Testovací substrát musí byť pred použitím prevzdušnený. Množstvo vyparenej vody treba nahradiť. Kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo akejkoľvek aditívnej látky.

Ak testovaná látka nie je rozpustná, dispergovateľná alebo emulgovateľná v organickom rozpúšťadle, je potrebné zmiešať 10 g zmesi jemne rozdrveného kremenného piesku a testovanej látky v množstve potrebnom na ovplyvnenie 500 g sušiny umelej pôdy so 490 g sušiny testovacieho substrátu.

Pre každú testovaciu skupinu sa do sklenenej nádoby umiestni vlhký testovací substrát v množstve 500 g sušiny a na povrch substrátu sa uloží 10 dážďoviek, ktoré boli 24 hodín pred pokusom vystavené podmienkam podobným vlhkému základnému substrátu a následne umyté a prebytočná voda odsatá filtračným papierom.

Aby sa zabránilo vysychaniu substrátu, nádoby sú zakryté perforovanými plastovými vrchnákmi, miskami alebo fóliou a v týchto testovacích podmienkach sú uchovávané 14 dní.

Hodnotenie by sa malo uskutočňovať 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu. Substrát sa rozvrství na sklenenú platňu alebo platňu z nehrdzavejúcej ocele. Pozorujú sa dážďovky a počíta sa množstvo prežívajúcich jedincov. Dážďovka sa považuje za mŕtvu, ak nereaguje na jemný mechanický podnet v prednej časti tela.

Ak sa vyhodnotenie robí na 7. deň, nádoby sa opätovne naplnia substrátom a prežívajúce dážďovky sa umiestnia na povrch toho istého testovacieho substrátu.

1.6.4. Testovacie organizmy

Testovacími organizmami sú dospelé jedince druhu *Eisenia foetida* (pozri dodatok) (najmenej 2 mesiace staré s vyvinutým klitelom) s hmotnosťou 300 až 600 mg vo vlhkom stave. (Metóda chovu, pozri dodatok).

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Koncentrácie testovanej látky sa vyjadrujú vo vzťahu k príslušným percentám odumretých jedincov.

Ak sú údaje adekvátne, hodnota LC_{50} a hranice významnosti ($p = 0,05$) sa určujú štandardnými metódami (Litchfield a Wilcoxon, 1949, pre ekvivalentnú metódu). Hodnota LC_{50} sa udáva v mg testovanej látky na kilogram testovacieho substrátu (sušina).

V prípadoch, keď je sklon koncentračnej krivky príliš strmý na prepočet hodnoty LC_{50} , postačuje grafický odhad tejto hodnoty.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8, dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota LC_{50} .

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje podľa možnosti tieto informácie:

- vyhlásenie, že test bol uskutočnený v súlade s vyššie uvedenými kritériami kvality,
- uskutočnený test (test na vyhľadávanie rozsahu a/alebo konečný test),
- presný opis testovacích podmienok a vyhlásenie, že test bol prevedený v súlade s metódou; akákoľvek odchýlka musí byť uvedená,
- presný opis zmiešania testovacej látky so základným substrátom,
- informáciu o testovacích organizmoch (druh, vek, priemer a rozpätie hmotnosti, podmienky udržiavania a chovu, dodávateľ),
- metódu použitú na určenie hodnoty LC_{50}
- výsledky, vrátane všetkých použitých údajov,
- opis pozorovaných prejavov alebo zmien správania testovacích organizmov,
- mortalita v kontrolách,
- hodnotu LC_{50} alebo najvyššiu testovanú koncentráciu bez mortality a najnižšiu testovanú koncentráciu s mortalitou 100 % 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu,
- znázornenie koncentračnej krivky/krivky odpovede,
- výsledky získané použitím referenčnej látky, buď v spojení s prezentovaným testom, alebo z predchádzajúcej kontroly kvality.

4. LITERATÚRA

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 s.
- (3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecology et Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 s.
- (4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, s. 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-und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in kunstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Dodatok

Chov a udržiavanie dážďoviek pred testom

Na chov dážďoviek sa používa chovná nádoba s čerstvým substrátom, do ktorej sa na 14 dní umiestni 30 až 50 dospelých jedincov. Tieto jedince sa potom môžu použiť na ďalšie chovné sady. Dážďovky vyľahnuté z kokónov sa po dosiahnutí dospelosti používajú na testovanie (pri uvedených podmienkach je to po 2 až 3 mesiacoch).

Podmienky udržiavania a chovu

Klimatizovaná miestnosť: teplota 20 ± 2 °C, prednostne s kontinuálnym osvetlením (intenzita 400 až 800 luxov),

Chovné nádoby: primerané plytké nádoby s objemom 10 až 20 litrov.

Substrát: *Eisenia foetida* sa môže pestovať v rôznych živočíšnych exkrementoch. Ako chovné médium sa doporučuje zmes 50 % rašeliny a 50 % kravského alebo konského hnoja. Médium by malo mať pH približne 6 až 7 (regulované prídavkom uhličitanu vápenatého) a nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mmhos alebo 0,5 % solí).

Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý.

Okrem vyššie uvedenej metódy sa môžu použiť aj iné úspešné postupy.

Poznámka: *Eisenia foetida* sa vyskytuje v dvoch líniiach, ktoré niektorí taxonomisti rozdelili do druhov (Bouche, 1972). Sú morfológicky podobné, ale *Eisenia foetida foetida* má typické priečne prúžkovanie na článkoch a *Eisenia foetida andrei* nemá uvedené prúžkovanie a má nepravidelné načervenalé zafarbenie. Podľa možnosti je vhodné použiť dážďovky *Eisenia foetida andrei*. Ak je k dispozícii potrebná metodika, môžu byť použité aj iné druhy.

C.9. BIODEGRADÁCIA

ZAHN-WELLENISOV TEST

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Účelom tejto metódy je hodnotenie potenciálnej konečnej biodegradovateľnosti vo vode rozpustných, neprchavých organických látok v stacionárnom teste pri vystavení vysokým koncentráciám mikroorganizmov.

Môže sa vyskytnúť fyzikálno-chemická adsorpcia na suspendované pevné látky, a preto ju treba brať do úvahy pri interpretácii výsledkov (pozri 3.2).

Študované látky sa používajú v koncentráciách zodpovedajúcich hodnotám DOC v rozmedzí 50 až 400 mg/liter alebo hodnotám COD v rozmedzí 100 až 1 000 mg/liter [DOC = dissolved organic carbon (rozpustený organický uhlík); COD = chemical oxygen demand (chemická spotreba kyslíka)]. Takéto relatívne vysoké koncentrácie majú výhodu analytickej spoľahlivosti. Zlúčeniny s toxickými vlastnosťami môžu oddialiť alebo inhibovať degradačný proces.

V tejto metóde sa na zistenie biodegradovateľnosti testovanej látky využíva meranie rozpusteného organického uhlíka a chemická spotreba kyslíka.

Súčasnité použitie špecifickej analytickej metódy môže umožniť zhodnotenie primárnej biodegradácie látky (odstránenie pôvodnej chemickej štruktúry).

Metóda je aplikovateľná len na tie testované organické látky, ktoré pri koncentráciách použitých v teste vykazujú nasledujúce vlastnosti:

- sú pri testovacích podmienkach rozpustné vo vode,
- pri testovacích podmienkach majú zanedbateľný tlak pár,
- nepôsobia inhibične na baktérie,
- v testovacom systéme sú adsorbované len v limitovanom množstve,
- z testovacieho roztoku sa nestrácajú penením.

Informácia o relatívnom pomere hlavných zložiek testovaného materiálu sa použije pri interpretácii získaných výsledkov, obzvlášť v prípadoch, kde sú výsledky slabé alebo okrajové.

Informácia o toxicite látky na mikroorganizmy je žiaduca pri interpretácii slabých výsledkov a pri výbere vhodných testovacích koncentrácií.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Stupeň biodegradácie dosiahnutý na konci testu sa udáva ako „Biodegradovateľnosť v Zahn-Wellensovom teste“:

$$D_T (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

kde:

DT = biodegradácia (%) v čase T,

CA = DOC (alebo COD) hodnota v testovanej zmesi meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l) (DOC = rozpustený organický uhlík, COD = chemická spotreba kyslíka),

CT = DOC alebo COD hodnota testovanej zmesi v čase odberu vzorky (mg/l),

CB = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu v čase odberu vzorky (mg/l),

CBA = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l).

Rozsah degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento.

Percentuálna degradácia sa stanovuje ako percento úbytku DOC (alebo COD) z testovanej látky.

Rozdiely medzi hodnotami nameranými po 3 hodinách od začatia testu a prepočítanými alebo prednostne nameranými počiatočnými hodnotami poskytujú vhodnú informáciu o eliminácii látky (pozri 3.2, Interpretácia výsledkov).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

V prípade skúmania novej testovanej látky je vhodné použiť referenčnú látku, avšak špecifickú referenčnú látku nie je zatiaľ možné odporučiť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Aktivovaný kal, minerálne živiny a testovaný materiál ako jediný zdroj uhlíka vo vodnom roztoku sú spolu umiestnené do sklenenej nádoby s objemom 1 až 4 litre vybavenej miešadlom a prevzdušňovačom. Zmes sa premiešava a prevzdušňuje pri teplote 20 až 25 °C pod difúznym osvetlením alebo v tme po dobu 28 dní. Proces degradácie sa monitoruje vo filtrovanom roztoku stanovovaním hodnoty DOC (alebo COD) denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch. Pomer eliminovaných DOC (alebo COD) v každom časovom intervale k hodnote získanej po 3 hodinách od začiatku testu sa vyjadruje ako percento biodegradácie a slúži na meranie rozsahu degradácie v danom čase. Výsledok je znázornený v biodegradačnej krivke v závislosti od času.

Pri použití špecifickej analytickej metódy sa môže merať zmena koncentrácie pôvodnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Dostatočná reprodukovateľnosť tohto testu bola potvrdená kruhovým testom.

Citlivosť metódy je do značnej miery určená variabilitou slepej vzorky a v menšej miere presnosťou stanovenia hodnoty DOC a hladiny testovanej zlúčeniny v médiu.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Príprava

1.6.1.1. Reagenčné látky

Testovacia voda: pitná voda s obsahom organického uhlíka menej ako < 5 mg/liter. Koncentrácia iónov vápnika a horčíka nesmie spolu presiahnuť 2,7 mmol/liter; v opačnom prípade sa požaduje riedenie s deionizovanou alebo destilovanou vodou.

Kyselina sírová, analytickej čistoty (p.a.): 50 g/l

Roztok hydroxidu sodného (p.a.): 40 g/l

Roztok minerálnych živín: rozpustiť v 1 litri deionizovanej vody:

chlorid amónny, NH_4Cl , (p.a.): 38,5 g

dihydrogénfosforečnan sodný, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (p.a.): 33,4 g,

dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4 , (p.a.): 8,5 g,

hydrogénfosforečnan draselný, K_2HPO_4 , (p.a.): 21,75 g.

Zmes slúži jednak ako zdroj živín aj ako tlmivý roztok.

1.6.1.2. Prístroje

Sklenené nádoby s objemom 1 až 4 litre (napr. cylindrické nádoby).

Miešadlo so skleneným alebo kovovým rotorom na vhodnom pieste (miešadlo by malo rotovať približne 5 až 10 cm nad dnom nádoby). Namiesto takéhoto miešadla môže byť použitý aj magnetický rotor s miešadlom dlhým 7 až 10 cm.

Sklená trubka s vnútorným priemerom 2 až 4 mm na vŕhanie vzduchu. Koniec trubky s otvorom by mal byť približne 1 cm nad dnom nádoby.

Centrifúga (približne 3 550 g).

pH meter.

Prístroj na meranie rozpusteného kyslíka.

Papierové filtre.

Membránová filtračná aparátúra.

Membránové filtre s pórami o veľkosti 0,45 µm. Vhodné sú membránové filtre, ktoré neumožňujú únik uhlíka ani absorpciu látky počas filtrácie.

Analytické zariadenie na stanovenie obsahu organického uhlíka a chemickej spotreby kyslíka.

1.6.1.3. Príprava inokula

Aktivovaný kal z biologickej čističky sa premýva (opakovanou) centrifugáciou alebo sedimentovaním s testovacou vodou.

Aktivovaný kal musí byť vo vhodnom stave. Takýto kal je dostupný zo správne pracujúcej čističky odpadových vôd. Aby sa získal čo najväčší počet rôznych druhov bakteriálnych kmeňov, uprednostňuje sa zmiešať inokulá z rôznych zdrojov (napr. rôzne čističky, pôdne extrakty, riečne vody a pod.). Zmes sa spracováva podľa vyššie uvedeného postupu.

Na kontrolu aktivity aktivovaného kalu pozri nižšie „Funkčná kontrola“.

1.6.1.4. Príprava testovacích roztokov

Do testovacej nádoby sa pridá 500 ml testovacej vody, 2,5 ml/liter roztoku minerálnych živín a aktivovaný kal v množstve zodpovedajúcom 0,2 až 1,0 g/liter sušiny v celkovom objeme. Následne sa pridá také množstvo zásobného roztoku testovanej látky, aby výsledná koncentrácia DOC v celkovej zmesi bola 50 až 400 mg/liter. Zodpovedajúce hodnoty COD sú 100 až 1 000 mg/liter. Doplní sa testovacou vodou do celkového objemu 1 ž 4 litre. Voľba celkového objemu závisí od počtu vzoriek, u ktorých stanovujeme DOC alebo COD a od objemu nevyhnutného na analytické postupy.

Bežne môžeme považovať objem 2 litre za dostačujúci. Paralelne s každou testovanou skupinou sa spúšťa kontrolná nádoba (slepý test); obsahuje iba aktivovaný kal a roztok minerálnych živín zarobený s testovacou vodou do celkového objemu rovnakého ako v testovanej skupine.

1.6.2. Vykonanie testu

Testovacie nádoby sú premiešavané magnetickými miešadlami alebo skrutkovitou vrtulou pri difúznom osvetlení alebo v tmavej miestnosti pri teplote 20 až 25 °C. Prevzdušňovanie sa vykonáva stlačeným vzduchom, ktorý je, ak je to nevyhnutné, prečistený cez bavlneno-vlnené sitko a premývaciu fľašu. Musí byť zaručené, že kal sa neusadí a koncentrácia kyslíka nepoklesne pod 2 mg/liter.

Hodnota pH sa musí kontrolovať v pravidelných intervaloch (napr. denne), a ak je to nevyhnutné, upravuje sa na pH 7 – 8.

Straty spôsobené vyparovaním sa dopĺňajú deionizovanou alebo destilovanou vodou v požadovaných množstvách tesne pred každým odberom vzorky. Vhodným krokom je zaznačiť si hladinu kvapaliny v nádobe pre začatím testu. Po každom odbere vzoriek sa robia nové značky (bez miešania a prevzdušňovania). Prvé vzorky sa vždy odoberajú 3 hodiny po začatí testu, aby sa určila adsorpcia testovaného materiálu aktivovaným kalom.

Následne po eliminácii testovaného materiálu sa denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch stanovujú hodnoty DOC alebo COD. Vzorky z testovacích nádob a zo slepého pokusu sa prefiltrujú cez dôkladne premytý papierový filter. Prvých 5 ml testovacieho roztoku sa odstráni. Kal, ktorý sa ťažko filtruje, sa

môže ešte predtým odstrániť centrifugáciou 10 minút. DOC a COD hodnoty sa stanovujú duplicitne. Test prebieha 28 dní.

Poznámka: Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre. Membránové filtre nesmú prepúšťať alebo adsorbovať žiadny organický materiál.

Kontrola funkčnosti aktivovaného kalu

Na kontrolu funkčnej kapacity aktivovaného kalu beží paralelne s každou testovanou sériou nádoba obsahujúca známu látku. Na tento účel sa najčastejšie využíva dietylenglykol.

Adaptácia

Ak sa analýzy uskutočňujú v relatívne krátkych časových intervaloch (napr. denne), môžeme z deštruktívnej krivky jasne pozorovať adaptáciu (pozri obrázok 2). Test by preto nemal začínať tesne pred víkendom.

Ak je adaptácia pozorovaná na konci periódy, test môže byť predĺžený, až kým nie je degradácia ukončená.

Poznámka: V prípade, že sú potrebné širšie poznatky o správaní sa adaptovaného kalu, aktivovaný kal je opätovne vystavený rovnakému testovanému materiálu podľa nasledujúceho postupu:

Vypne sa miešadlo a prevzdušňovač a nechá sa usadiť aktivovaný kal. Odčerpá sa supernatant a nádoba sa naplní opäť 2 litrami testovacej vody. Mieša sa 15 minút a znovu sa nechá usadiť. Po opätovnom odčerpaní supernatantu sa zvyšný kal použije na opakovanie testu s tým istým testovaným materiálom podľa 1.6.1.4 a 1.6.2. Aktivovaný kal možno izolovať okrem usadzovania aj centrifugáciou.

Adaptovaný kal sa môže zmiešať s čerstvým kalom do koncentrácie 0,2 až 1 g sušiny/liter.

Analytické prostriedky

Bežne sa vzorky filtrujú cez dôkladne premyté papierové filtre (na premývanie sa používa deionizovaná voda).

Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre (0,45 µm).

Hodnoty DOC sa vo filtrátoch zo vzoriek stanovujú duplicitne (prvých 5 ml sa odstráni) prostredníctvom TOC zariadenia. Ak filtrát nie je možné analyzovať v ten istý deň, musí sa uskladňovať v chladničke do ďalšieho dňa. Dlhšie skladovanie sa neodporúča.

Koncentrácie COD sa stanovujú vo filtrátoch zo vzoriek COD analýzou postupom uvedeným v literatúre pod bodom (2).

2. ÚDAJE A HODNOTENIE

DOC a/alebo COD koncentrácie sa stanovujú zo vzorky najmenej duplicitne podľa uvedeného odseku 1.6.2. Degradácia v čase T sa prepočíta podľa vzorca (s definíciami) uvedeného v odseku 1.2.

Miera degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento. Množstvo degradácie dosiahnuté na konci testu sa vyjadruje ako „Biodegradovateľnosť v Zahn -Wellensovom teste“.

Poznámka: Ak sa dosiahne úplná degradácia ešte pred koncom testu a tento výsledok sa potvrdí aj druhou analýzou nasledujúci deň, test môže byť uzavretý.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje podľa možnosti nasledujúce informácie:

- počiatočnú koncentráciu testovanej látky,
- všetky ostatné informácie a výsledky experimentov týkajúcich sa testovanej látky, referenčnej látky, ak bola použitá, a slepého pokusu,
- koncentráciu po 3 hodinách,
- biodegradačnú krivku s opisom,
- dátum a miesto, odkiaľ boli testovacie organizmy odobraté, stav adaptácie, použité koncentrácie a pod.,
- vedecké zdôvodnenie akejkoľvek zmeny testovacieho procesu.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Úbytok DOC (COD), ktorý sa vyskytuje postupne v priebehu dní alebo týždňov, naznačuje, že látka je biodegradovaná.

V niektorých prípadoch však môže hrať úlohu fyzikálno-chemická adsorpcia a táto je indikovaná, ak sa vyskytne úplný alebo čiastočný úbytok do prvých troch hodín od začiatku testu a ak rozdiel medzi kontrolným a testovaným supernatantom zostáva na nečakane nízkej úrovni.

Ak rozdiely spadajú medzi biodegradáciu (alebo parciálnu biodegradáciu) a adsorpciu, sú nevyhnutné ďalšie testy.

Toto sa môže uskutočniť rôznymi spôsobmi, ale najpresvedčivejšie je použitie supernatantu alebo kalu ako inokula v základnom teste (prednostne respirometrický test).

Testovaná látka, ktorá vykazuje vysoký, neadsorpčný úbytok DOC (COD) v tomto teste, sa môže považovať za potenciálne biodegradovateľnú. Čiastočný, neadsorpčný úbytok naznačuje, že látka je predmetom aspoň čiastkovej biodegradácie. Nízky alebo nulový úbytok DOC (COD) môže byť zapríčinený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou, čo možno tiež spozorovať lýzou alebo stratou kalu za vzniku kalných supernatantov. Test treba v týchto prípadoch zopakovať použitím nižších koncentrácií testovanej látky.

Použitie zložkovo špecifickej analytickej metódy alebo ¹⁴C-značenej testovanej látky môže zabezpečiť vyššiu citlivosť. V prípade použitia ¹⁴C-značenej testovanej zložky potvrdzuje prítomnosť biodegradácie objavenie ¹⁴CO₂.

Ak sa výsledky uvádzajú vo forme primárnej biodegradácie, treba podľa možnosti priložiť vysvetlenie zmeny chemickej štruktúry, ktorá vedie k strate reakcie pôvodnej testovanej látky.

Platnosť analytickej metódy sa musí uviesť spolu s reakciou zistenou v testovacom médiu v slepom pokuse.

4. LITERATÚRA

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 19.9.1984, p. 1).

Dodatok

PRÍKLAD VYHODNOTENIA

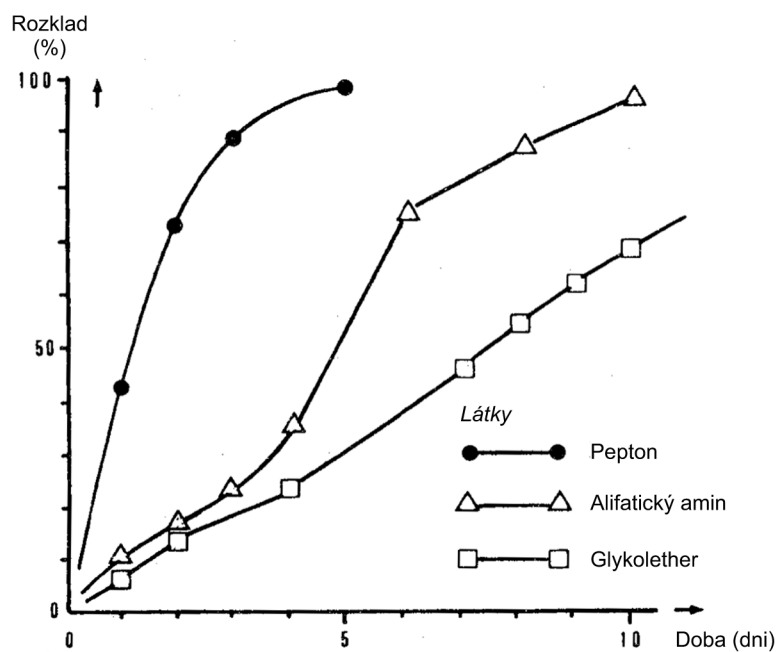
Organická zložka:	kyselina 4-etoxybenzoová
Teoretická testovaná koncentrácia:	600 mg/l
Teoretická hodnota DOC:	390 mg/l
Inokulum:	čistička odpadových vôd z ...
Koncentrácia:	1 g sušiny/liter
Stav adaptácie:	neadaptovaný
Analýza:	stanovenie DOC
Množstvo vzorky:	3ml
Kontrolná látka:	dietylenglykol
Toxicita zložky:	žiadny toxický efekt pod 1 000 mg/l
	Použitý test: Skúmavkový test fermentácie tabuľka

Doba testu	Kontrolná látka				Testovaná látka		
	Slepý pokus DOC ⁽¹⁾ (mg/liter)	DOC ⁽¹⁾ (mg/liter)	DOC Čistý (mg/liter)	% degradácie	DOC ⁽¹⁾ (mg/liter)	DOC Čistý (mg/liter)	% degradácie
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 hodiny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,2	6
1 deň	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dní	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dní	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dní	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dní	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dní	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dní	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

⁽¹⁾ Stredná hodnota troch stanovení DOC.

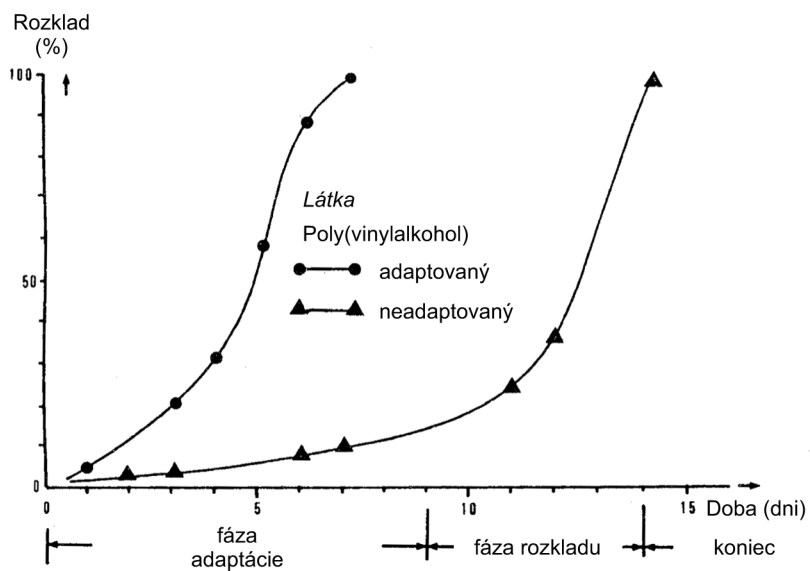
Obrázok č. 1

Príklady biodegradačných kriviek



Obrázok č. 2

Príklady adaptácie kalu



C.10. BIODEGRADÁCIA

SIMULAČNÉ TESTY NA AKTIVOVANOM KALE

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

1.1.1. Všeobecné poznámky

Metóda je aplikovateľná iba na tie organické látky, ktoré pri koncentráciách použitých v teste vykazujú nasledujúce vlastnosti:

- sú rozpustné vo vode v rozsahu potrebnom na prípravu testovacích roztokov,
- pri testovacích podmienkach majú zanedbateľný tlak pár,
- nepôsobia inhibične na baktérie.

Informácia o relatívnom zastúpení hlavných zložiek testovaného materiálu sa použije pri interpretácii získaných výsledkov, obzvlášť v tých prípadoch, keď sú výsledky slabé alebo okrajové.

Informácia o toxicite látky k mikroorganizmom sa požaduje pri interpretácii slabých výsledkov a pri výbere vhodných testovacích koncentrácií.

1.1.2. Stanovenie konečnej biodegradovateľnosti (DOC/COD analýza)

Účelom tejto metódy je stanoviť konečnú biodegradovateľnosť meraním úbytku látky a iných metabolitov v modele čističky s aktivovaným kalom v koncentrácii zodpovedajúcej > 12 mg DOC/liter (alebo približne 40 mg COD/liter); koncentrácia 20 mg DOC/liter sa považuje za optimálnu. (DOC = rozpustený organický uhlík; COD = chemická spotreba kyslíka).

V testovanom materiáli musí byť stanovený obsah organického uhlíka (alebo chemická spotreba kyslíka).

1.1.3. Stanovenie primárnej biodegradovateľnosti (špecifická analýza)

Účelom metódy je určenie primárnej biodegradovateľnosti látky v modele čističky s aktivovaným kalom v koncentrácii približne 20 mg/liter použitím špecifickej analytickej metódy (ak to dovoľuje analytická metóda a toxicita látky, môžu byť použité aj nižšie alebo vyššie koncentrácie). Týmto je umožnený odhad primárnej biodegradovateľnosti látky (strata pôvodnej chemickej štruktúry).

Účelom metódy nie je určenie mineralizácie testovanej látky.

Na stanovenie testovanej látky musí byť k dispozícii primeraná analytická metóda.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

1.2.1. DOC/COD analýza

Stupeň úbytku látky je daný ako:

$$TD = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100 \% \quad [1(a)]$$

kde

GRD = stupeň úbytku v percentách DOC (alebo COD) v rámci daného priemerného retenčného času vzhľadom na testovaný materiál,

T = koncentrácia testovaného materiálu pri vstupe v mg DOC/liter (alebo mg COD/liter),

- E = DOC (alebo COD) koncentrácia pri výtoku z testovanej jednotky v mg DOC/liter
- E_o = DOC (alebo COD) koncentrácia pri výtoku z slepého pokusu v mg DOC/liter (alebo mg COD/liter).

Degradácia je definovaná ako percentuálny DOC (alebo COD) úbytok v danom retenčnom čase vzhľadom na testovaný materiál.

1.2.2. Špecifická analýza

Percentuálny úbytok testovanej látky z vodnej fázy (R_w) v danom retenčnom čase je daný ako:

$$R_w = \frac{C_i - C_o}{C_i} \times 100 \% \quad [1(b)]$$

kde:

C_i = koncentrácia látky pri vstupe do testovacej jednotky (mg látky/liter, stanovené špecifickou analýzou),

C_o = koncentrácia látky vo výtoku z testovacej jednotky (mg látky/liter, stanovené špecifickou analýzou).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

V prípade, že vyšetrujeme novú látku, je vhodné použiť referenčnú látku, avšak špecifickú referenčnú látku zatiaľ nie je možné odporučiť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACÍCH METÓD

Na stanovenie konečnej biodegradovateľnosti bežia paralelne dve pokusné jednotky aktivovaného kalu (OECD overovací test alebo test „pórovitej nádoby“). Testovaná látka sa pridáva pri vstupe (syntetické médium alebo domáce splaškové vody) jednej jednotky, zatiaľ čo do druhej sa pridávajú len samotné splaškové vody. Na stanovenie primárnej biodegradovateľnosti špecifickou analýzou vo vstupe a výstupe sa používa iba jedna jednotka.

DOC (alebo COD) koncentrácie sa merajú vo výstupe alebo je koncentrácia látky určená špecifickou analýzou.

Koncentrácia DOC sa vzhľadom k testovanému materiálu nemeria, ale je jednoducho stanovená.

Predpokladá sa, že rozdiely pri meraní koncentrácie DOC (alebo COD) medzi testovaným a kontrolným výtokom sú spôsobené nedegradovaným testovaným materiálom.

Ak sa uskutočňujú špecifické analýzy, je možné merať koncentráciu pôvodnej molekuly (primárnu biodegradáciu).

Jednotky možno uviesť do behu podľa „systému spojených jednotiek“ transinokulačným postupom.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Počiatková koncentrácia látky závisí od typu uskutočnenej analýzy a jej obmedzení.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*1.6.1.1. *Prístroje*

Nevyhnutná je dvojica jednotiek rovnakého typu okrem prípadov, keď sa používajú špecifické analýzy. Možno použiť dva postupy:

Potvrdzujúci test podľa OECD

Zariadenie (dodatok č. 1) pozostáva zo zásobnej nádoby (A) pre syntetické médium, dávkovacej pumpy (B), prevzdušňovacej nádoby (C), separátora (D), vzduchovej pumpy (E) na recykláciu aktivovaného kalu a nádoby (F) na zber spracovaného výtoku.

Nádoby (A) a (F) musia byť zo skla alebo vhodného plastu a musia mať kapacitu aspoň 24 litrov. Pumpa (B) musí zabezpečiť nepretržitý tok syntetického média do prevzdušňovacej nádoby; na zabezpečenie vstupného toku a koncentrácie sa môže použiť akýkoľvek vhodný systém. Počas normálneho fungovania je výška separátora tak zafixovaná, aby objem zmesi v prevzdušňovacej nádobe bol 3 litre. Kremičitanová prevzdušňovacia fritá (G) je zavesená v nádobe (C) na vrchole kónusu. Množstvo vzduchu pretečeného cez prevzdušňovač sa môže monitorovať rotametrom.

Vzduchová pumpa je zavedená tak, že aktivovaný kal zo separátora sa kontinuálne a pravidelne recykluje do prevzdušňovacej nádoby (C).

Test „pórovitej nádoby“

Pórovitá nádoba je zostrojená z plátov pórovitého polyetylénu (hrúbka 2 mm, veľkosť pórov maximálne 95 µm), ktoré sú zostavené do valca s priemerom 14 cm a s kónickou základňou 45° (obrázok č. 1 a 2 v dodatku č. 2). Pórovitá nádoba sa nachádza v nepriepustnej nádobe z vhodného plastu s priemerom 15 cm s výstupom vo výške 17,2 cm vo valcovitej časti, ktorá určuje objem (3 litre) v nádobe. Pevný podporný kruh z vhodného plastu na vrchu vnútornej nádoby je umiestnený tak, že vytvára medzi vnútornou a vonkajšou nádobou výtokový priestor 0,5 cm.

Pórovité nádoby môžu byť umiestnené v teplotne regulovanom vodnom kúpeli. Do spodnej časti vnútornej nádoby, na ktorej je umiestnený vhodný difúzer, je zabezpečený prívod vzduchu.

Nádoby (A) a (E) musia byť zo skla alebo vhodného plastu a musia mať kapacitu aspoň 24 litrov. Pumpa (B) musí zabezpečiť nepretržitý tok syntetického média do prevzdušňovacej nádoby; na zabezpečenie vstupného toku a koncentrácie sa môže použiť akýkoľvek vhodný systém.

Potrebné je mať náhradnú pórovitú nádobu na výmenu v prípade, že pôvodná nádoba sa upchá, upchaté nádoby sa čistia ponorením do roztoku chlórnanu na 24 hodín a následným dôkladným opláchnutím vo vode z vodovodu.

1.6.1.2. *Filtrácia*

Membránová filtračná aparatura a membránové filtre s pórmí s veľkosťou 0,45 µm. Vhodné sú také membránové filtre, ktoré počas filtrácie neumožňujú prepúšťanie uhlíka ani adsorpciu látky.

1.6.1.3. *Splaškové vody*

Môže sa použiť vhodné syntetické médium alebo domáce splaškové vody.

Príklad syntetického média

V jednom litri vody z vodovodu sa rozpustí:

pepton:	160 mg,
mäsový extrakt:	10 mg,
močovina:	30 mg,

NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ .2H ₂ O:	4 mg,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	2 mg,
K ₂ HPO ₄ :	28 mg.

Domáce odpadové vody

Odoberajú sa čerstvé každý deň z výtoku z primárnej usadzovacej nádoby čističky, ktorá spracováva predovšetkým domáce odpadové vody.

1.6.1.4. Zásobný roztok testovaného materiálu

Roztok testovaného materiálu, napr. 1 %, sa pripravuje ako prídavok do testovacej jednotky. Koncentrácia materiálu musí byť stanovená, aby bol známy vhodný objem, ktorý treba pridať do splaškov alebo priamo do testovacej jednotky cez druhú pumpu na získanie požadovanej testovacej koncentrácie.

1.6.1.5. Inokulum

Poznámka: Ak sa používajú domáce odpadové vody, nie je dôvod použiť inokulum s nízkou koncentráciou baktérií. Aktivovaný kal však možno použiť.

Môžu byť použité rôzne druhy inokúl.

Uvedené sú tri príklady vhodných inokúl:

a) Inokulum zo sekundárneho výtoku

Inokulum by malo byť získané zo sekundárneho výtoku dobrej kvality a odobraté z čističky spracovávajúcej prevažne domáce odpadové vody. V čase medzi odobratím vzorky a použitím sa musí výtok držať v aeróbnych podmienkach. Pri príprave inokula sa vzorka filtruje cez hrubý filter, prvých 200 ml sa odstráni. Až do použitia sa filtrát udržiava aeróbny. Inokulum sa musí použiť v deň odberu. Na inokuláciu sa použijú najmenej 3 ml.

b) Zložené inokulum

Inokulum zo sekundárneho výtoku:

Pozri vyššie uvedený opis.

Inokulum z pôdy:

100 g záhradnej pôdy (úrodnej, nie sterilnej) sa rozpustí v 1 000 ml bezchlórovej pitnej vody. (Pôdy s extrémne vysokým zastúpením ílu, piesku alebo humusu sú nevhodné). Po premiešaní sa nechá suspenzia usadzovať 30 minút. Supernatant sa filtruje cez hrubý filtračný papier, prvých 200 ml sa odstráni. Filtrát sa prevzdušňuje ihneď a až do použitia. Inokulum sa musí použiť v deň odberu.

Inokulum z povrchovej vody:

Ďalšie čiastkové inokulum je možné odobrať z mezosaprobickej povrchovej vody. Vzorka sa filtruje cez hrubý filter, prvých 200 ml sa odstráni. Až do použitia sa filtrát udržiava aeróbny. Inokulum sa musí použiť v deň odberu.

Rovnaké objemy čiastkových inokúl sa spoja, dobre premiešajú a konečné inokulum sa odoberie z tejto zmesi. Na inokuláciu sa použijú najmenej 3 ml.

c) Inokulum z aktivovaného kalu

Ako inokulum sa použije aktivovaný kal (nie viac ako 3 litre) s obsahom rozpustených pevných častíc do 2,5 g/liter, ktorý bol odobratý z prevzdušňovacej nádrže čističky spracovávajúcej prevažne domáce odpadové vody.

1.6.2. *Postup*

Test prebieha pri izbovej teplote, ktorá by mala byť v rozmedzí 18 až 25 °C.

Ak je to vhodné, test možno vykonať aj pri nižšej teplote (do 10 °C); ak je látka degradovaná, nie je potrebná ďalšie testovanie. Ak sa však látka nedegraduje, test sa uskutoční pri stabilnej teplote medzi 18 až 25 °C.

1.6.2.1. Doba zábehu: Formovanie kalu/stabilizácia jednotiek

Čas rastu kalu/stabilizácie je čas, počas ktorého koncentrácia suspendovaných častíc aktivovaného kalu a výkonnosť jednotiek narastá do stabilnej hodnoty za použitých prevádzkových podmienok.

Doba zábehu je doba, ktorá trvá od prvého pridania testovanej látky po čas, keď jej úbytok dosiahne relatívne konštantnú hladinu. Táto doba nesmie presiahnuť 6 týždňov.

Hodnotiace obdobie je trojtýždňové, 3 týždne od času, keď úbytok testovanej látky dosiahol relatívne konštantnú a zvyčajne vysokú hladinu. Pre tie látky, ktoré vykazujú nízku alebo žiadnu degradáciu počas prvých 6 týždňov, sa ako hodnotiace obdobie berú do úvahy nasledujúce 3 týždne.

Na začiatku treba jednotku potrebnú na jeden test naplniť inokulom zmiešaným s prítokom.

Prevzdušňovač [a vzduchová pumpa (E) v prípade použitia OECD overovacieho testu] a dávkovacie zariadenie (B) sa spustí do behu.

Prítok bez testovacej látky musí prejsť cez prevzdušňovaciu nádobu (C) rýchlosťou 1 liter za hodinu alebo pol litra za hodinu; zabezpečiť sa tak priemerný retenčný čas 3 alebo 6 hodín.

Rýchlosť prevzdušňovania sa reguluje tak, aby bol obsah nádoby (C) konštantne v suspenznom stave a obsah rozpusteného kyslíka bol aspoň 2 mg/liter.

Vhodným spôsobom treba zabrániť peneniu. Nesmú sa použiť odpeňovače, ktoré inhibujú aktivovaný kal.

Kal, ktorý sa zhromažďil na vrchu prevzdušňovacej nádoby (C) [a v prípade OECD overovacieho testu na dne usadzovacej nádoby (D) a v obehových častiach], treba vrátiť do zmesi najmenej raz za deň zoškrabaním alebo iných vhodným spôsobom.

Ak kal nesedimentuje, možno jeho hustotu zvýšiť pridaním 2 ml 5 % roztok chloridu železitého, opakuje sa podľa potreby.

Výtok sa zhromažďuje v nádobe (E alebo F) 20 až 24 hodín a vzorka sa odoberá po dôkladnom premiešaní. Nádoba (E alebo F) musí byť starostlivo vyčistená.

S cieľom monitorovania a kontroly účinnosti procesu sa najmenej dvakrát do týždňa meria chemická spotreba kyslíka (COD) alebo rozpustený organický uhlík (DOC) vo filtráte z akumulovaného výtoku, ako aj vo filtrovanom prítoku (použijú sa membrány s veľkosťou pórov 0,45 µm, prvých približne 20 ml filtrátu sa odstráni).

Znižovanie hodnôt COD alebo DOC by sa malo ustáliť, ak dochádza k približne pravidelnej dennej degradácii.

Obsah sušiny v aktivovanom kale z prevzdušňovacej nádrže sa stanovuje dvakrát do týždňa (v g/liter). Jednotky môžu pracovať jedným z dvoch spôsobov: buď sa obsah sušiny v aktivovanom kale stanovuje dvakrát týždenne, a ak je viac ako 2,5 g/liter, tak sa nadbytok aktivovaného kalu odstráni, alebo sa 500 ml zmesi odstráni z každej nádoby denne, aby sa získal priemerný retenčný čas kalu 6 dní.

Keď sú namerané a stanovené parametre [účinnosť procesu (v úbytku COD alebo DOC)], koncentrácia kalu, sedimentovateľnosť kalu, turbidita výtokov a pod.) dvoch jednotiek dostatočne stabilné, môže sa do prítoku jednej jednotky aplikovať testovaná látka, pozri odsek 16.2.2.

Alternatívne sa môže testovaná látka pridať na začiatku doby rastu kalu (1.6.2.1), obzvlášť, ak sa kal pridáva ako inokulum.

1.6.2.2. Postup testu

Pri zachovaní prevádzkových podmienok doby zábehu sa pridá príslušné množstvo (približne 1 %) zásobného roztoku testovaného materiálu do vtoku testovacej jednotky tak, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia testovaného materiálu v odpadovej vode (približne 10 až 20 mg DOC/liter alebo 40 mg COD/liter). To možno dosiahnuť vmiešaním zásobného roztoku do odpadovej vody denne alebo pomocou oddeleného tlakového systému. Táto koncentrácia sa môže dosiahnuť postupne. Ak nie je pozorovaný žiadny toxický účinok testovanej látky na aktivovaný kal, môžu byť testované aj vyššie koncentrácie.

Jednotka slepého pokusu je naplnená iba vtokom bez prídavku testovanej látky. Na analýzu sa odoberajú príslušné objemy výtoku a filtrujú sa cez membránové filtre (0,45 µm), pričom prvých približne 20 ml filtrátu sa odstráni.

Prefiltrované vzorky sa analyzujú v ten istý deň, v opačnom prípade musia byť zakonzervované vhodnou metódou, napr. použitím 0,05 ml 1 % roztoku chloridu ortuťnatého (HgCl₂) na každých 10 ml filtrátu alebo uskladnením pri teplote 2 až 4 °C 24 hodín, alebo na dlhšie obdobie pri teplote pod -18 °C.

Doba zábehu s prídavkom testovanej látky by nemala presiahnuť 6 týždňov a doba hodnotenia by nemala byť kratšia ako 3 týždne, napr. približne 14 až 20 stanovení by malo byť k dispozícii pre výpočet konečného výsledku.

Systém spojených jednotiek

Spojenie jednotiek sa dosiahne výmenou 1,5 litra zmesi (vrátane kalu) z prevzdušňovacej nádoby s aktivovaným kalom medzi dvoma jednotkami raz denne. V prípade silne sa absorbujúceho testovaného materiálu sa odoberie len 1,5 litra supernatantu z usadzovacej nádoby a naleje sa do nádoby s aktivovaným kalom druhej jednotky.

1.6.2.3. Analýza

S cieľom sledovať správanie látky sa môžu vykonávať dva typy analýz:

DOC a COD

Koncentrácie DOC sa stanovujú duplicitne pomocou analyzátora uhlíka a/alebo COD hodnoty sa určujú podľa literatúry pod bodom (2).

Špecifická analýza

Koncentrácie testovanej látky sa stanovujú vhodnou analytickou metódou. Ak je to možné, vykoná sa špecifické stanovenie látky adsorbovanej na kale.

2. ÚDAJE A HODNOTENIE

2.1. SYSTÉM SPOJENÝCH JEDNOTIEK

Pri použití „systému spojených jednotiek“ sa denné stupne úbytku (GRD) vypočítajú podľa odseku 1.2.1.

Tieto denné stupne úbytku GRD sa upravujú na DRc pre prenos materiálu spôsobený transinokulačným postupom rovnicou [2] pre trojhodinový alebo rovnicou [3] pre šesťhodinový priemerný retenčný čas.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Vypočíta sa priemer série hodnôt DRc a okrem toho sa určí smerodajná odchýlka podľa rovnice [4]

$$S_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DRc} - DRc_i)^2}{n-1}} \quad [4]$$

kde:

S_{DRc} = smerodajná odchýlka série hodnôt DRc

$\overline{DRc}$ = priemer hodnôt DRc

n = počet stanovení

Hodnoty ležiace mimo DRc sérií sa eliminujú podľa vhodnej štatistickej metódy, napr. Nalimov (6), na hladine pravdepodobnosti 95 % a prepočíta sa priemer a smerodajná odchýlka DRc sérií bez hodnôt ležiacich mimo sérií DRc.

Konečný výsledok sa potom vypočíta podľa rovnice [5] ako

$$DRc = \overline{DRc} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{DRc} \quad [5]$$

kde:

$t_{n-1; \alpha}$ = tabuľková hodnota t pre n párov hodnôt E a E_0 a štatistická spoľahlivosť P ($P = 1 - \alpha$), kde P je pri 95 % (1).

Výsledok je uvedený ako priemer s limitami tolerancie na hladine pravdepodobnosti 95 %, príslušná smerodajná odchýlka a počet údajov súboru hodnôt DRc bez hodnôt ležiacich mimo sérií, počet hodnôt ležiacich mimo sérií, napríklad

DRc = 98,6 ± 2,3 % úbytku DOC,

s = 4,65 % úbytku DOC,

n = 18,

x = počet hodnôt ležiacich mimo sérií.

2.2. SYSTÉM NESPOJENÝCH JEDNOTIEK

Fungovanie jednotiek sa môže skontrolovať nasledujúco:

$$\text{percento úbytku COD alebo DOC} = \frac{\text{COD alebo DOC kalu} - \text{COD alebo DOC výtoku}}{\text{COD alebo DOC kalu}} \times 100$$

Tieto denné úbytky možno znázorniť graficky, aby sa odhalili akékoľvek trendy, napr. k aklimatizácii.

2.2.1. Použitie COD/DOC stanovení

Denný stupeň úbytku GRD sa vypočíta podľa 1.2.1.

Vypočíta sa priemer série hodnôt GRD a okrem toho sa určí jeho smerodajná odchýlka podľa:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

kde:

S_{DR} = smerodajná odchýlka série hodnôt GRD.

$\overline{DR}$ = priemer hodnôt GRD_i ,

n = počet stanovení.

Hodnoty ležiace mimo GRD sérií sa eliminujú podľa vhodnej štatistickej metódy, napr. Nalimov (6), na hladine pravdepodobnosti 95 % a prepočíta sa priemer a smerodajná odchýlka GRD sérií bez hodnôt ležiacich mimo sérií GRD.

Konečný výsledok sa potom vypočíta podľa rovnice (7) ako

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1; \alpha} S}{\sqrt{n}} \quad [7]$$

$t_{n-1; \alpha}$ = tabuľková hodnota t pre n párov hodnôt E a E_0 a štatistická spoľahlivosť P ($P = 1 - \alpha$), kde P je pri 95 % (1).

Výsledok je uvedený ako priemer s limitami tolerance na hladine pravdepodobnosti 95 %, príslušná smerodajná odchýlka a počet údajov súboru hodnôt GRD bez hodnôt ležiacich mimo sérií, počet hodnôt ležiacich mimo sérií, napríklad

GRD = $(98,6 \pm 2,3)$ % úbytku DOC,

s = 4,65 % úbytku DOC,

n = 18,

x = počet hodnôt ležiacich mimo sérií.

2.2.2. Použitie špecifickej analýzy

Percentuálna eliminácia testovanej látky z vodnej fázy (R_w) sa vypočíta podľa odseku 1.2.2.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje podľa možnosti nasledujúce informácie:

- formulár uvedený v dodatku č. 3, obsahujúci podmienky počas priebehu testu,
- ktoré prístroje boli použité (potvrdzujúci test OECD alebo test „pórovitej nádoby“),
- ktorý operačný systém bol použitý: systém spojených jednotiek alebo nie,
- aké odpadové vody: syntetické médium alebo domáce odpadové vody – v prípade domácich treba uviesť dátum a miesto odberu vzorky,
- aké inokulum sa použilo, s dátumom a miestom odberu vzorky,
- vyhlásenie s opisom analytickej metódy v prípade, že sa použila špecifická analýza,
- znázornenie COD alebo DOC v závislosti od času, vrátane doby zábehu a doby hodnotenia,

- analytické vyjadrenie znovunadobudnutia testovanej látky ako hodnota COD z DOC hodnoty zásobného roztoku,
- ak sa uskutočnili špecifické analýzy, znázornenie percentuálneho úbytku testovanej látky z vodnej fázy v závislosti od času (doba zábehu a doba hodnotenia),
- priemerný úbytok DOC alebo COD hodnoty testovanej látky a smerodajná odchýlka sa vypočítajú z výsledkov z doby hodnotenia, napr. ak sa vyskytuje stabilný úbytok testovaného materiálu alebo doba stabilného priebehu,
- znázornenie koncentrácie aktivovaného kalu v závislosti od času,
- akékoľvek poznámky týkajúce sa aktivovaného kalu (odstránenie nadbytočného kalu, zväčšovanie objemu, FeCl_3 a pod.),
- koncentráciu látky použitej v teste,
- akékoľvek výsledky týkajúce sa analýzy vykonanej na kale,
- všetky informácie a experimentálne výsledky týkajúce sa testovanej látky a referenčnej látky, ak bola použitá,
- vedecké zdôvodnenie akýchkoľvek zmien v postupe.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Nízky úbytok testovanej látky z vodnej fázy môže byť zapríčinený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou. Rovnako sa to môže prejavovať lýzou a stratou kalu za vzniku zakaleného supernatantu, ako aj poklesom účinnosti COD (alebo DOC) úbytku testovacej čističky.

Niekedy zohráva úlohu fyzikálno-chemická adsorpcia. Rozdiely medzi biologickým účinkom na molekulu a fyzikálno-chemickou adsorpciou je možné odhaliť analýzou, ktorá sa uskutočňuje na kale po príslušnej desorpcii.

Ak rozdiely spadajú medzi biodegradáciu (alebo čiastočnú biodegradáciu) a adsorpciu, nevyhnutné sú ďalšie testy.

To sa môže vykonať viacerými spôsobmi, ale najvhodnejšie je použiť supernatant ako inokulum v základnom teste (prednostne respirometrický test).

Ak sú pozorované vysoké úbytky DOC alebo COD, je to spôsobené biodegradáciou, zatiaľ čo pri nízkych úbytkoch sa nedá biodegradácia odlíšiť od eliminácie. Napríklad, ak rozpustná zložka vykazuje vysokú adsorpcnú konštantu 98 % a miera straty nadbytočného kalu je 10 % denne, možno uvažovať o eliminácii až do 40 %; ak je miera straty nadbytočného kalu 30 %, eliminácia spôsobená adsorpciou a odstránením s nadbytočným kalom môže vzrásť až na 65 % (4).

Ak sa používajú špecifické metódy, treba upriamiť pozornosť na vzťah medzi štruktúrou látky a použitou špecifickou analýzou. V tomto prípade nemôže byť pozorovaný fenomén interpretovaný ako mineralizácia látky.

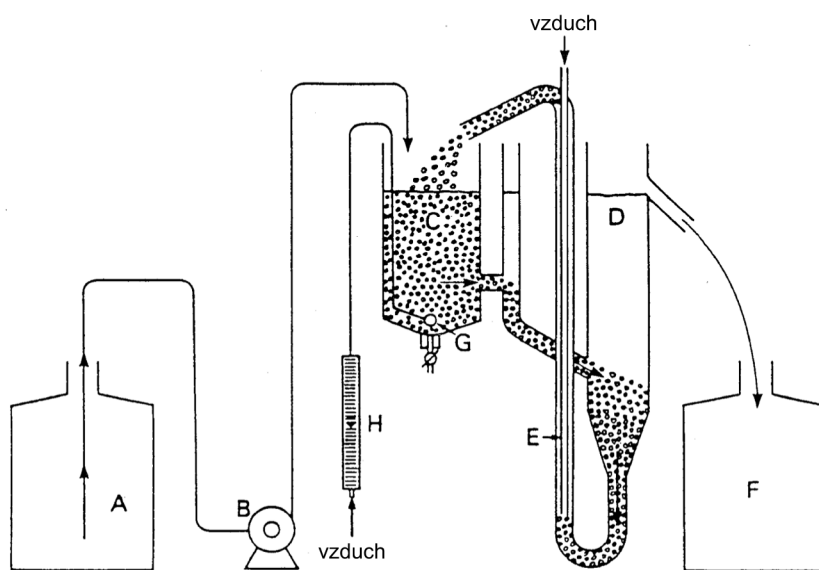
4. LITERATÚRA

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) Annex V C9 Degradation Test-Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 19.9.1984, p. 1).

-
- (3) Painter, H. A., King, E. F., WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.
 - (4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, s. 161 – 171.
 - (5) Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC (OJ L 109, 22.4.1982, p. 1) amending Council Directives 73/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents (OJ L 347, 17.12.1973, p. 51).
 - (6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), s. 406 – 408.

Dodatok 1

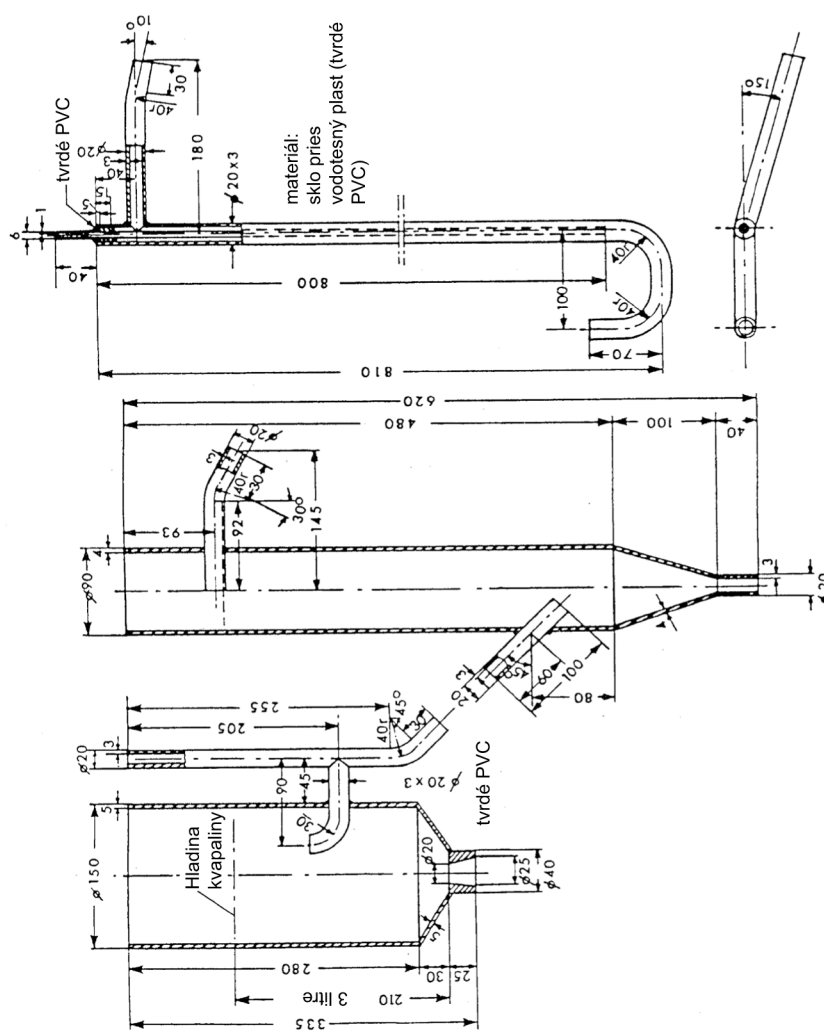
Obrázok č. 1



A = zásobná nádoba
B = dávkovacie čerpadlo
C = prevzdušňovacia nádoba
(kapacita 31)
D = usadzovacia nádrž

E = mamutie čerpadlo
F = zberná nádrž
G = prevzdušňovač
H = vzduchový prietokomer

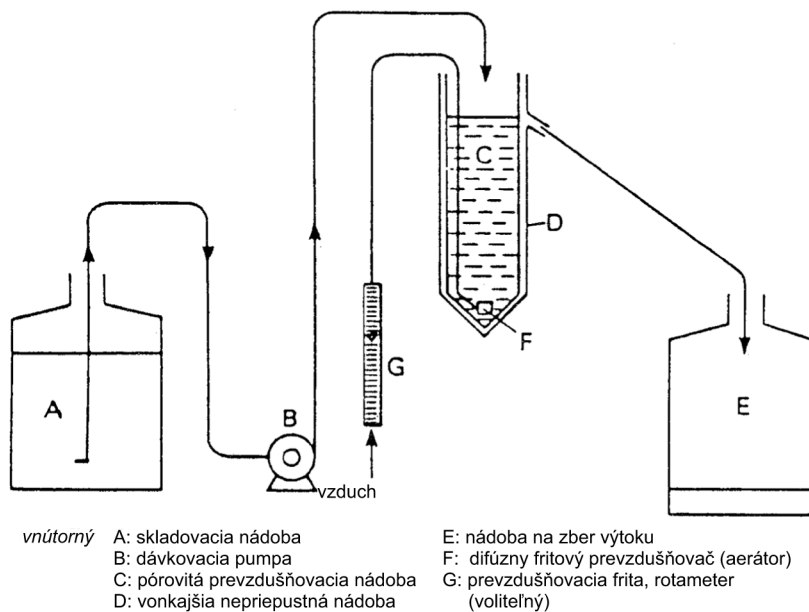
Obrázok č. 2



Dodatok 2

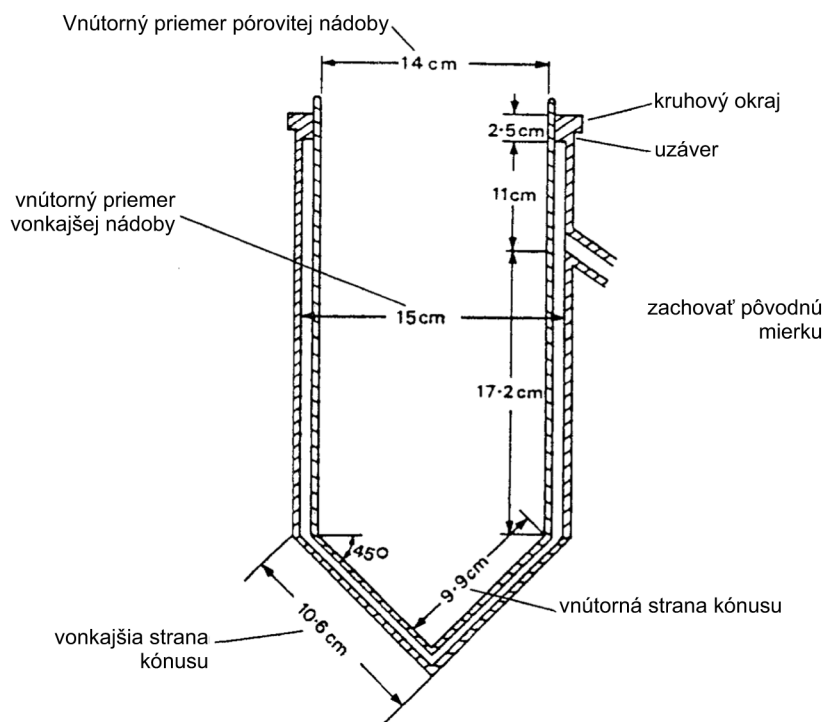
Obrázok č. 1

Zariadenie používané na hodnotenie biodegradability



Obrázok č. 2

Detaily trojlitrovej revzdušňovacej pórovitej nádoby



Dodatok 3

Operačné podmienky pre simulačný test aktivovaného kalu*V každej skupine sa skontroluje**Prístroje*

Potvrdzujúci test podľa OECD
Pórovitá nádoba

Spôsob fungovania

Jedna jednotka
Spojené jednotky
Nespojené jednotky

Transinokulácia

Žiadna
Aktivovaný kal
Supernatant

Stredný retenčný čas

Tri hodiny
Šesť hodín

Základné živiny

Domáce splaškové vody
Syntetické médium

Inokulum

Sekundárny výtok
Zložené
Aktivovaný kal

Prídavok testovaného materiálu

Od začiatku
Postupne
Po vytvorení kalu

Analýza

Špecifická analýza
Chemická spotreba kyslíka
Rozpustený organický uhlík

C.11. BIODEGRADÁCIA

TEST RESPIRAČNEJ INHIBÍCIE AKTIVOVANÉHO KALU

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Opísaná metodika stanovuje vplyv testovanej látky na mikroorganizmy meraním miery respirácie v definovaných podmienkach a v prítomnosti odlišných koncentrácií testovanej látky.

Účelom metódy je poskytnúť rýchly skrining, pomocou ktorého by boli identifikované látky nepriaznivo vplyvajúce na aeróbnou mikrobiálnu čističku odpadových vôd a indikované vhodné neinhibičné koncentrácie testovaných látok použiteľných v testoch biodegradovateľnosti.

Predbežné určenie rozsahu sledovaných koncentrácií testovanej látky môže predchádzať samotný test. Týmto spôsobom sa získajú informácie o škále koncentrácií použiteľných v hlavnom teste.

V teste musia byť zahrnuté aj dve kontroly bez testovanej látky, jedna kontrolná vzorka na začiatku a druhá na konci testovanej série koncentrácií. Každá dávka aktivovaného kalu by mala byť kontrolovaná aj voči referenčnej látke.

Test je aplikovateľný a vysokospôľahlivý hlavne pri látkach, ktoré sú rozpustné vo vode a zároveň stabilné, takže pravdepodobne zotrávajú v určitej forme vo vodách.

Pri látkach, ktoré majú obmedzenú rozpustnosť v testovacom médiu, nie je možné stanoviť EC₅₀.

Výsledky založené na spotrebe kyslíka môžu viesť k chybným záverom v prípade, že testovaná látka vedie k odpojeniu oxidatívnej fosforylácie.

Pred vykonaním testu sa odporúča mať nasledujúce informácie:

- rozpustnosť vo vode,
- tlak nasýtených pár,
- podrobný vzorec chemickej štruktúry,
- čistota testovanej látky.

Odporúčanie:

Aktivovaný kal môže potencionálne obsahovať patogénne organizmy, a preto s ním treba zaobchádzať so zvýšenou opatrnosťou.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Miera respirácie je spotreba kyslíka mikroorganizmami odpadových vôd v aeróbnom kale znečistených vôd vyjadrená všeobecne v mg kyslíka (O₂) na mg kalu za hodinu.

S cieľom vypočítať inhibičný efekt testovanej látky pri určitej koncentrácii je miera respirácie vyjadrená ako percento priemeru dvoch kontrolných mier respirácie:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \text{percento inhibície}$$

kde:

R_s = miera spotreby kyslíka pri testovanej koncentrácii testovanej látky,

R_{c1} = miera spotreby kyslíka, kontrola 1,

R_{c2} = miera spotreby kyslíka, kontrola 2.

EC_{50} pri tomto teste predstavuje koncentráciu testovanej látky, pri ktorej je miera respirácie 50 % v porovnaní s kontrolou, za podmienok stanovených touto metódou.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Ako referenčnú látku sa odporúča použiť 3,5-dichlórfenol, ako známy inhibitor respirácie a tester EC_{50} , a to na každej vzorke aktivovaného kalu, kde je prostriedkom kontroly abnormálnej citlivosti kalu.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Miera respirácie aktivovaného kalu vyživovaného štandardným množstvom syntetického média sa meria po kontaktnom čase 30 minút alebo po troch hodinách, alebo v oboch časoch. Miera respirácie toho istého aktivovaného kalu v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej látky v inak rovnakých podmienkach sa meria tiež. Inhibičný efekt testovanej látky v určitej koncentrácii sa vyjadruje ako percento z priemeru mier respirácie dvoch kontrol. Hodnota EC_{50} sa vypočíta z výsledkov získaných pri rôznych koncentráciách testovanej látky.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Platnosť výsledkov testu je splnená, ak:

- hodnoty získané v dvoch kontrolách miery respirácie neprekračujú rozdiel 15 %,
- EC_{50} (po 30 minútach a/alebo 3 hodinách) pri 3,5-dichlórfenole nepresahuje rozmedzie hodnôt 5 mg/liter až 30 mg/liter.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Reagenčné látky

1.6.1.1. Roztoky testovanej látky

Roztoky testovanej látky musia byť čerstvo pripravené na začiatku testu zo zásobného roztoku. Odporúča sa koncentrácia zásobného roztoku 0,5 g/liter, ak sa postupuje podľa popísaného protokolu.

1.6.1.2. Roztok referenčnej látky

Roztok 5,5-dichlórfenolu môže byť pripravený napríklad rozpustením 0,5 g 3,5-dichlórfenolu v 10 ml 1M NaOH, predtým rozriedeným v približne 30 ml destilovanej vody, pridaním za miešania s 0,5M H_2SO_4 do bodu počiatočného zrážania – vyžaduje sa približne 8 ml 0,5M H_2SO_4 – a následným zriedením zmesi na jeden liter s destilovanou vodou. Predpokladané pH v pripravenej zmesi sa pohybuje v rozmedzí 7 až 8.

1.6.1.3. Syntetické médiá

Syntetické médiá sa vytvoria rozpustením nasledovných množstiev látok v 1 litri vody:

- 16 g peptónu,
- 11 g mäsového extraktu,
- 3 g močoviny,
- 0,7 NaCl,
- 0,4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$,

- 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
- 2,8 g K_2HPO_4 .

Poznámka 1: Dané syntetické médium má 100-násobne vyššiu koncentráciu, ako je opísané v Technickej správe OECD: „Navrhnuté metódy pre stanovenie biodegradovateľnosti surfaktantov používaných v syntetických detergentoch“ (11. jún 1976) s doplnením hydrogenfosforečnanu didraselného.

Poznámka 2: Ak pripravené médium nie je okamžite použité, môže byť skladované v tme pri 0 až 4 °C, ale nie dlhšie ako 1 týždeň, v podmienkach, ktoré nevyvolávajú možné zmeny v jeho zložení. Médium môže byť pred uskladnením sterilizované, prípadne sa peptón a mäsový extrakt pridajú krátko pred prevedením testu. Pred použitím musí byť médium dôkladne premiešané a pH musí byť upravené na požadovanú hodnotu.

1.6.2. Prístroje

Meracie prístroje: presný dizajn nie je rozhodujúci. Predná časť by mala byť dostatočne priestorná a sonda by mala priliehať tesne ku hrdlu meracej nádoby.

Vyžaduje sa normálne laboratórne vybavenie a špeciálne nasledovné:

- merací prístroj,
- prevzdušňovacie zariadenie,
- pH elektródy a meracie zariadenie,
- kyslíková elektróda.

1.6.3. Príprava inokula

V teste sa ako mikrobiálne inokulum používa aktivovaný kal z čističky odpadových vôd, spracovávajúcej prevažne domáce splaškové vody.

Ak je to potrebné, v laboratórnych podmienkach môžu byť pred použitím odstránené hrubé nečistoty, a to usadzovaním počas kratšej doby, približne 15 minút a následným stoením vrchnej vrstvy jemnejších pevných častíc. Alternatívou k uvedenému postupu môže byť miešanie kalu počas niekoľkých sekúnd za použitia miešadla.

Okrem toho, ak sa predpokladá prítomnosť inhibičného materiálu, môže byť aktivovaný kal premývaný s vodou z vodovodu alebo s izotonickým roztokom. Po centrifugácii sa supernatant zleje a procedúra sa opakuje trikrát.

Malé množstvo kalu sa zváži a vysuší. Z výsledkov sa vypočíta množstvo vlhkého kalu, ktoré musí byť suspendované vo vode s cieľom získania aktivovaného kalu s obsahom pevných častíc v rozmedzí od 2 – 4 g/liter po zmiešaní s kvapalinou. Týmto spôsobom sa dosiahne hladina koncentrácie v rozmedzí od 0,8 – 1,6 g/liter v testovanom médiu, ak sú predchádzajúce doporučená danej procedúry dodržané.

Ak kal nie je možné spracovať v deň odberu vzorky, pridá sa 50 ml syntetického kalu na každý liter aktivovaného kalu pripraveného podľa predchádzajúcich doporučení, a takto spracovaná zmes je potom prevzdušňovaná cez noc pri teplote 20 ± 2 °C a následne aj počas celého dňa pred použitím. Pred samotným testom sa skontroluje pH a ak je to potrebné, tak sa upraví na 6 až 8. Pevné častice prítomné v kvapalnej zmesi sa môžu stanoviť podľa predchádzajúcich doporučení.

Ak sa vzorky z toho istého aktivovaného kalu spracujú počas viacerých nasledovných dní (maximálne štyri dni), pridáva sa ďalších 50 ml syntetického média na liter kalu na konci každého pracovného dňa.

1.6.4. Vykonalie testu

Trvanie/kontaktný čas:	30 minút a/alebo tri hodiny, počas ktorých sa prevzdušňuje
Voda:	Pitná voda (ak je potrebné, s odstránením chlóru)
Vzduch:	Čistý vzduch, bez olejových stôp. Prúd vzduchu je 0,5 – 1 l/minútu
Merací prístroj:	Fläsa s plochým rovným dnom, ako BSK-nádoba

Merač kyslíka:	Vhodná kyslíková elektróda, s rekordérom
Živný roztok:	Syntetické médium (pozri vyššie)
Testovaná látka:	Testovaná látka je čerstvo pripravená na začiatku testu
Referenčná látka:	3,5-dichlórfenol (aspoň v troch koncentráciách)
Kontroly:	Inokulované vzorky bez testovanej látky
Teplota:	20 ± 2 °C

Navrhnutá experimentálna procedúra, podľa ktorej sa postupuje v prípade testovanej aj referenčnej látky počas trojhodinovej kontaktnej doby, je nasledovná:

Používajú sa oddelené nádoby (napr. 1-litrové kadičky).

Testovaná látka sa pripraví aspoň v piatich koncentráciách, pričom jednotlivé koncentrácie by sa mali zväčšovať o konštantný faktor nepresahujúci hodnotu 3,2.

V čase „0“ sa pridá 16 ml syntetického média do vody do objemu 300 ml. Následne sa pridá 200 ml mikrobiálneho inokula a pripravená zmes v objeme 500 ml sa preleje do prvej nádoby (prvá kontrola C₁).

Testovacie nádoby by mali byť kontinuálne prevzdušňované. Malo by sa zabezpečiť, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka v zmesi neklesla pod 2,5 mg/liter a aby tesne pred meraním miery respirácie bola koncentrácia O₂ približne 6,5 mg/liter.

Po „15 minútach“ (15 minút je náhodný, ale konvenčne stanovený čas) sa predchádzajúce meranie zopakuje, ale s pridaním 100 ml testovanej látky zo zásobného roztoku k 16 ml syntetického média pred doplnením vody do 300 ml a potrebného množstva mikrobiálneho inokula, aby sa pripravila zmes s výsledným objemom 500 ml. Pripravená zmes sa preleje do druhej nádoby a prevzdušňuje sa podľa predchádzajúceho postupu. Tento proces sa opakuje v 15-minútových intervaloch s rôznymi objemami zásobného roztoku testovanej látky, čím sa získa séria nádob obsahujúcich rôzne koncentrácie testovanej látky. Nakoniec sa pripraví druhá kontrola (C₂).

Po troch hodinách sa zmeria pH a dôkladne premiešaný obsah prvej nádoby sa preleje do meracieho prístroja, kde sa odmeria miera respirácie počas doby nie dlhšej ako 10 minút.

Meranie sa opakuje vo všetkých pripravených nádobách v 15-minútových intervaloch tak, aby kontaktný čas pri každej nádobe boli tri hodiny.

Referenčná látka je testovaná pri každej vzorke mikrobiálneho inokula rovnakým spôsobom.

Ak sa jednotlivé merania vykonávajú v kontaktnom čase 30 minút, je nevyhnutné použiť odlišný režim (viac ako jeden kyslíkový merač).

Ak sa vyžaduje meranie chemickej spotreby kyslíka, pripraví sa ďalšie nádoby obsahujúce testovanú látku, syntetické médium a vodu, ale bez aktivovaného kalu. Spotreba kyslíka sa meria a zaznamenáva pri prevzdušňovaní po 30 minútach alebo 3 hodinách (kontaktný čas).

2. ÚDAJE A PLATNOSŤ

Miera respirácie sa vypočítava zo zhotoveného záznamu medzi hodnotami približne 6,5 mg O₂/liter a 2,5 mg O₂/liter alebo po 10 minútach, počas ktorých bola miera respirácie nízka. Časť respiračnej krivky, nad ktorou sa meria miera respirácie, by mala byť lineárna.

Ak rozdiel v miere respirácie medzi dvoma kontrolami prekračuje 15 %, alebo ak EC₅₀ (v kontaktnom čase 30 minút a/alebo 3 hodiny) referenčnej látky prekračuje akceptovateľné rozmedzie hodnôt (5 až 30 mg/liter pri 3,5-dichlórfenole), test je neplatný a musí sa zopakovať.

Percento inhibície sa vypočítava pri každej koncentrácii testovanej látky (pozri 1.2). Percento inhibície je vynášané do grafu proti koncentrácii testovanej látky na logaritmicom alebo log-normálnom papieri a odvodí sa hodnota EC₅₀.

95 % úroveň spoľahlivosti pre EC₅₀ sa určuje podľa štandardných postupov.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Písomná správa by mala v rámci možností obsahovať nasledujúce údaje:

- testovaná látka: údaje o chemických vlastnostiach,
- testovací systém: zdroj, koncentrácia a prípadné predchádzajúce ošetrenie aktivovaného kalu,
- testovacie podmienky:
 - pH reakčnej zmesi pred meraním respirácie,
 - teplota počas testu,
 - trvanie testu,
 - referenčná látka a namerané EC_{50} ,
 - abiotická spotreba kyslíka (ak je),
- výsledky:
 - všetky údaje z meraní,
 - inhibičná krivka a metódy pre výpočet EC_{50} ,
 - EC_{50} , a ak je to možné, 95 % úroveň spoľahlivosti, EC_{20} a EC_{80} ,
 - všetky pozorovania a akékoľvek odchýlky od testovacích metód, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky.

3.2. INTERPRETÁCIA ÚDAJOV

Hodnota EC_{50} sa považuje len za pomôcku pri určovaní pravdepodobnej toxicity testovanej látky pre spracovanie odpadových vôd aktivovaným kalom alebo pre mikroorganizmy prítomné v odpadových vodách. Komplexné interakcie, ktoré sa vyskytujú v životnom prostredí, nemôžu byť presne simulované v laboratórnych podmienkach. Okrem toho, testované látky, ktoré majú tendenciu inhibovať oxidáciu amoniaku, môžu tiež viesť k tvorbe atypických inhibičných kriviek. Preto interpretácia týchto kriviek vyžaduje zvýšenú pozornosť.

4. LITERATÚRA

- (1) Medzinárodný štandard ISO 8192-1986.
- (2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, s. 165.
- (3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, s. 245.
- (4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103*, tiež opísané podľa:
- (5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, s. 80.
- (6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, s. 247.
- (7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Decision of the Council C(84) 30 final.

C.12. BIODEGRADÁCIA

MODIFIKOVANÝ SCAS-TEST

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Cieľom metódy je zhodnotiť potencióálnu konečnú biodegradovateľnosť vo vode rozpustných, stabilných organických látok, ak sú vystavené účinku relatívne vysokej koncentrácie mikroorganizmov počas dlhšieho časového obdobia. Životaschopnosť mikroorganizmov je udržiavaná počas tejto doby denným pridávaním živín sedimentovaných v odpadových vodách. (Počas víkendu môžu byť odpadové vody skladované pri 4 °C, alebo sa ako alternatíva môže použiť umelé syntetické médium podľa testov schválených OECD.)

Pri interpretácii výsledkov sa musí zobrať do úvahy možnosť fyzikálno-chemickej adsorpcie pri pevných látkach v testovacom systéme (pozri 3.2.).

V dôsledku dlhej detekčnej doby kvapalnej fázy (36 hodín) a prerušovaného pridávania živín, test nesimuluje také experimentálne podmienky, aké sa docielia pri čističke odpadových vôd. Výsledky získané pri rôznych testovaných látkach indikujú vysoký biodegradačný potenciál testu.

Podmienky navodené testom sú vysoko priaznivé k selekcii a/alebo adaptácii mikroorganizmov, ktoré majú schopnosť degradovať testované látky. (Procedúra môže byť využitá aj pre prípravu aklimatizovaného inokula, ktoré je prispôbené použitiu v ďalších testoch.)

V tejto metóde sa na stanovenie podľaľhnutia testovanej látky biodegradácii používa nameraná koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC). Uprednostňuje sa stanovenie rozpusteného organického uhlíka (DOC) po acidifikácii a prečistení ako rozdiel $C_{\text{celkové}} - C_{\text{anorganické}}$.

Simultánne využitie špecifických analytických metód umožňuje stanoviť primárnu degradáciu látky (nedá sa už detekovať parentálna chemická štruktúra).

Metóda je aplikovateľná len na tie organické látky, ktoré pri danej koncentrácii použitej v teste:

- sú rozpustné vo vode (aspoň 20 mg rozpusteného organického uhlíka/liter),
- majú zanedbateľný tlak nasýtených pár,
- nepôsobia inhibične na baktérie,
- nedochádza u nich k signifikantnej adsorpcii v testovacom systéme,
- nemôže pri nich dôjsť k úbytku v testovacom roztoku penením.

V materiáli použitom v teste sa musí stanoviť obsah organického uhlíka.

Pri interpretácii získaných výsledkov sú vhodné informácie o relatívnom zložení hlavných komponentov v testovacom materiáli, najmä v prípadoch nízkych alebo marginálnych hodnôt výsledkov.

Pri interpretácii nízkych hodnôt výsledkov a pri selekcii vhodných testovacích koncentrácií sú užitočné informácie o možnej toxicite testovanej látky voči mikroorganizmom.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

C_T = koncentrácia testovanej látky vo forme organického uhlíka, ktorý je prítomný alebo pridaný do média na začiatku prevzdušňovania (mg/liter),

C_i = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v teste pri ukončení prevzdušňovania (mg/liter),

C_c = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v kontrole testu po ukončení prevzdušňovania (mg/liter).

V tejto metóde je biodegradácia definovaná ako vymiznutie organického uhlíka. Biodegradácia môže byť vyjadrená ako:

1. Percento úbytku D_{da} z množstva látky pridanej denne:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \quad [1]$$

kde

D_{da} = degradácia/denný prídavok.

2. Percento úbytku D_{ssd} množstva látky prítomnej na začiatku každého dňa:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 (b)]$$

kde

D_{ssd} = degradácia/látka na začiatku dňa,

indexy i a $(i + 1)$ sa vzťahujú na deň merania.

Vzorec 2 a) sa odporúča, ak hodnota rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente lavíruje zo dňa na deň, kým vzorec 2 b) sa používa v prípade relatívne konštantnej hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente počas dní merania.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

V určitých prípadoch, ak to výskum novej látky vyžaduje, odporúča sa využiť referenčnú látku. Žiadna konkrétna referenčná látka sa pri tomto teste neuvádza.

Údaje o niektorých látkach, vyhodnotené prostredníctvom kruhového testu, sa uvádzajú hlavne v dodatku 1, kvôli prípadnej kalibrácii metódy alebo pre porovnanie výsledkov získaných v ďalšej použitej metóde.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Aktivovaný kal z čističky odpadových vôd je umiestnený do semikontinuálnej jednotky aktivovaného kalu – SCAS jednotky. Pridá sa testovaná látka a sediment z domácich splaškových vôd a zmes sa prevzdušňuje 23 hodín. Po zastavení prevzdušňovania sa kal nechá usadiť a supernatant nad usadeninou sa odstráni.

Zostávajúci usadený kal v prevzdušňovacej komore sa zmieša s alikvótnym množstvom testovanej látky a sedimentom splaškových vôd a celý cyklus sa zopakuje.

Biodegradácia sa stanovuje určením obsahu rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante. Táto hodnota sa porovná s hodnotou získanou v kontrolnej vzorke, ktorá je tvorená len usadenými odpadovými vodami.

Pri použití špecifických analytických metód, môžu byť odmerané zmeny, ktoré nastali v koncentrácii parentálnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť tejto metódy založenej na úbytku rozpusteného organického uhlíka (DOC) zatiaľ nebola preukázaná. (Ak uvažujeme primárnu biodegradovateľnosť, veľmi presné údaje sa získajú pri látkach, ktoré sú degradované vo veľkom rozsahu.)

Citlivosť metódy je do veľkej miery ovplyvnená variabilitou slepého pokusu a v menšej miere presnosťou stanovenia rozpusteného organického uhlíka (DOC) a hladinou testovanej látky v počiatočnom objeme na začiatku každého cyklu.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

Použije sa čistá prevzdušňovacia aparátúra vo vhodnej veľkosti alebo, ako alternatíva, zostavená pôvodná 1,5 l SCAS jednotka s prívadovou trubicou vzduchu (obr. 1) pre každú testovanú látku a kontroly. Stlačený vzduch dodávaný do testovacích jednotiek po prečistení cez vatový filter by mal byť bez prímеси organického uhlíka a vopred saturovaný vodou, aby sa zabránilo strate vyparovaním.

Vzorka zmesi, obsahujúca 1 až 4 g suspendovanej pevnej látky/liter, sa získa z aktivovaného kalu čističky odpadových vôd spracovávajúcej domáce splaškové vody. Na jednu prevzdušňovaciu jednotku sa vyžaduje približne 150 ml tejto zmesi.

Zásobné roztoky testovanej látky sa pripravujú v destilovanej vode, pričom normálne vyžadovaná koncentrácia je 400 mg/liter vo forme organického uhlíka, z čoho vyplýva, že koncentrácia testovanej zložky na začiatku každého cyklu prevzdušňovania je 20 mg/liter vo forme uhlíka, ak nedochádza k biodegradácii.

Ak to umožňuje toxicita látky voči mikroorganizmom, môže sa použiť aj vyššia koncentrácia.

Meria sa obsah organického uhlíka v zásobnom roztoku.

1.6.2. *Podmienky testu*

Teplota pri teste sa má pohybovať v rozmedzí 20 °C až 25 °C.

Používa sa vysoká koncentrácia aeróbných mikroorganizmov (1 g/liter až 4 g/liter suspendovanej pevnej látky) a efektívna detenčná doba je 36 hodín. Uhlíkový materiál zo živín odpadových vôd podlieha rýchlo oxidácii, v normálnych podmienkach zoxiduje po ôsmich hodinách od začiatku každého cyklu prevzdušňovania. Potom do ukončenia cyklu prevzdušňovania kal respiruje endogénne a počas tejto doby je jediným dostupným zdrojom testovaná látka, ak aj táto nie je ľahko metabolizovateľná. Tieto charakteristiky v kombinácii s každodennou inokuláciou a za použitia domácich splaškových vôd ako média poskytujú vysokovhodné podmienky pre aklimatizáciu ako aj pre vysokú mieru biodegradácie.

1.6.3. *Vykonanie testu*

Odoberie sa vzorka zmesi z kalu aktivovaného domácimi splaškovými vodami z čističky alebo laboratórnej jednotky a udržiava sa v aeróbnom stave až do jej spracovania v laboratóriu. Každá prevzdušňovacia jednotka ako aj kontrolná jednotka sa naplní 150 ml roztoku zmesi (v prípade použitia originálneho testu SCAS sa vynásobí uvedený objem desiatimi) a následne sa začne prevzdušňovať. Po 23 hodinách sa prevzdušňovanie ukončí a kal sa nechá 45 minút sedimentovať. Po otočení kohútika na každej nádobe sa odoberie 100 ml supernatantu. Vzorka sedimentu z domácich splaškových vôd sa získava tesne pred použitím a pridá sa 100 ml kalu, ktorý zostal v jednotlivých prevzdušňovacích jednotkách. Prevzdušňovanie sa následne obnoví. V tomto štádiu sa nepridáva žiadny testovaný materiál, ale do jednotky sa dodáva denne zmes domácich splaškových vôd, až pokým sa nevytvorí po sedimentácii čistý supernatant. Tento proces zvyčajne prebieha dva týždne, počas ktorých sa približuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante konštantnej hodnote na konci každého cyklu prevzdušňovania.

Na konci tejto periódy sa jednotlivé usadené kaly zmiešajú a 50 ml výsledného zloženého kalu sa pridá do každej jednotky.

Do kontrolnej jednotky sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml vody, do testovacích jednotiek sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml z vhodného zásobného roztoku testovanej látky (400 mg/liter). Znovu sa začne s prevzdušňovaním počas nasledujúcich 23 hodín. Kal sa nechá sedimentovať 45 minút, supernatant sa odoberie a analyzuje sa obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC).

Opísaný postup pridávania a odberov sa prevedie denne počas celého trvania testu.

Pred sedimentáciou je potrebné očistiť steny prevzdušňovacej jednotky, aby sa zabránilo akumulácii pevných častíc nad hladinou kvapaliny. V každej jednotke sa musí použiť iná škrabka alebo kečka, aby nedošlo ku prenosu kontaminácie medzi jednotkami.

V ideálnom prípade sa stanovuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante denne, ale prípustné sú aj menej frekvencované analýzy. Pred samotnou analýzou sa supernatant filtruje cez premyté 0,45 µm membránové filtre alebo sa scentrifuguje. Membránové filtre sú prípustné, ak je potvrdené, že sa z nich neuvolňuje uhlík, alebo že nevyvolávajú adsorpciu pevných častíc počas filtrácie. Teplota vzorky počas centrifugácie nesmie presiahnuť 40 °C.

Dĺžka trvania testu pri látkach, ktoré vykazujú len malú alebo žiadnu biodegradáciu, nie je určená, ale skúsenosti naznačujú, že by to malo byť vo všeobecnosti aspoň 12 týždňov, ale nie dlhšie ako 26 týždňov.

2. ÚDAJE A PLATNOSŤ

Zistené hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante testovacích aj kontrolných jednotiek sa vynesú do grafov v závislosti od času.

Pri dosiahnutí biodegradácie sa výsledky zistené v teste začínú približovať kontrolným výsledkom. Ak je v troch nasledujúcich meraniach zistený konštantný rozdiel medzi testovacími a kontrolnými jednotkami, vykoná sa už len taký počet meraní, aby bolo možné údaje štatisticky spracovať a vypočítať percento biodegradácie testovanej látky alebo prípravku (D_{da} alebo D_{ssd} , pozri odsek 1.2).

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí, ak je to možné, obsahovať tieto informácie:

- všetky informácie o type odpadových vôd, type použitých jednotiek, o experimentálnych výsledkoch zahŕňajúcich testovanú látku, referenčnú látku, ak bola použitá a slepú vzorku,
- teplotu,
- úbytkovú krivku aj s opisom, spôsob výpočtu (pozri 1.2),
- dátum a lokalita, kde boli odobraté vzorky aktivovaného kalu a odpadovej vody, stav adaptácie, koncentrácie atď.,
- vedecké odôvodnenie akýchkoľvek zmien v testovacej metóde,
- podpis a dátum.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Keďže látka testovaná danou metódou zvyčajne nie je ľahko biodegradovateľná, normálny úbytok organického uhlíka v dôsledku samotnej biodegradácie bude v priebehu dní až týždňov postupný, okrem tých prípadov, keď dôjde k náhlej aklimatizácii sprevádzanej rapidným vymiznutím uhlíka po niekoľkých týždňoch.

Významnú úlohu zohráva však v niektorých prípadoch fyzikálno-chemická adsorpcia, čo sa dá indikovať na základe úplného alebo čiastočného úbytku rozpusteného organického uhlíka (DOC) pridaného na začiatku procedúry. Nasledujúci proces závisí od faktorov, ako sú stupeň adsorpcie alebo koncentrácia suspendovaných pevných častíc v odstránenom effluente. Zvyčajne sa rozdiel medzi koncentráciou rozpusteného organického uhlíka v kontrolnom a testovanom supernatante postupne zvyšuje z pôvodnej nízkej hodnoty a tento rozdiel sa potom udržiava na určitej novej hodnote po zvyšok experimentu, pokiaľ nedôjde k aklimatizácii.

Pre zistenie rozdielu medzi biodegradáciou (alebo čiastočnou biodegradáciou) a adsorpciou je potrebné použiť ďalšie testy. Existuje viacero možných spôsobov, ale najvýhodnejšie je využiť supernatant alebo kal ako inokulum v základnej sade testov, pričom sa preferuje respirometrický test.

Testovaná látka, ktorá v teste vykazuje vysoký úbytok rozpusteného organického uhlíka, a to nie v dôsledku adsorpcie, sa považuje za potencionálne biodegradovateľnú. Čiastočný úbytok (nie v dôsledku adsorpcie) indikuje, že testovaná látka podlieha aspoň určitej obmedzenej biodegradácii.

Nízky alebo žiadny úbytok rozpusteného organického uhlíka môže byť spôsobený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou. Dôkazom je lýza alebo strata kalu za tvorby zakaleného supernatantu. V tom prípade sa test môže zopakovať s použitím nižšej koncentrácie testovanej látky.

Vyššiu citlivosť poskytujú niektoré špecifické analytické metódy alebo použitie testovanej látky so značeným ^{14}C uhlíkom. V prípade značeného ^{14}C uhlíka v testovanej látke, sa uskutočnená biodegradácia potvrdzuje zachytením $^{14}\text{CO}_2$.

V prípade interpretácie výsledkov v zmysle primárnej biodegradácie by sa v rámci možností malo uviesť aj vysvetlenie zmien chemickej štruktúry, ktoré zabránili detekovať pôvodnú testovanú látku.

Spolu s výsledkami získanými v slepej vzorke (banku) musí byť uvedená aj validácia analytických metód.

4. LITERATÚRA

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.

Dodatok 1

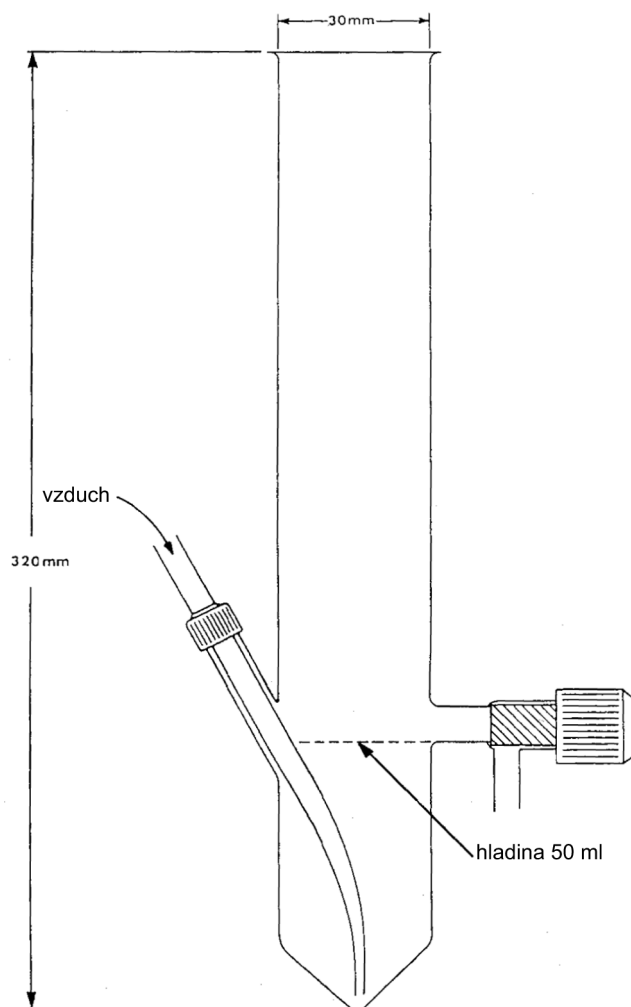
Test SCAS: príklad výsledkov

Látka	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	% biodegradácie (D_{ds})	Trvanie testu (dni)
4-acetyl aminobenzén sulfonát	17,2	2,0	85	40
tetrapropylénbenzén sulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
dietylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
anilín	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentan tetrakarboxylát	17,9	3,2	81,1	120

Dodatok 2

Príklad testovacieho prístroja

Obrázok č. 1



C.13 BIOKONCENTRÁCIA: PRIETOKOVÝ RYBÍ TEST

1. METÓDA

Táto metóda je prevzatá z OECD TG 305 (1996).

1.1. ÚVOD

Táto metóda opisuje postup, ktorý sa používa na charakterizáciu potenciálu látok na biokoncentrovanie v rybách pri prietochných podmienkach. Prednosť sa dáva prietochným testovacím režimom, no pod podmienkou splňania kritérií platnosti možno použiť aj poloprietochné režimy.

Metóda poskytuje dostatok podrobností na uskutočnenie testu a súčasne poskytuje primeranú voľnosť na prispôbenie pokusného usporiadania podmienkam jednotlivých laboratórií a rozličným charakteristikám testovaných látok. Najplatnejším spôsobom ju možno použiť pri stálych organických chemických zlúčeninách s hodnotami $\log P_{ow}$ medzi 1,5 a 6,0 (1), no dá sa ešte použiť aj pre superlipofilné látky (s hodnotou $P_{ow} > 6,0$). Predbežne odhadnutá hodnota biokoncentračného faktora (BCF), ktorý sa niekedy označuje ako K_B , týchto superlipofilných látok bude pravdepodobne vyššia ako hodnota rovnovážneho biokoncentračného faktora (BCF_{ss}), ktorú možno dosiahnuť v laboratórnych pokusoch. Predbežné odhady biokoncentračného faktora organických látok s hodnotami $\log P_{ow}$ do 9,0 možno získať pomocou rovnice Bintena a spol. (2). Medzi parametre, ktoré charakterizujú biokoncentračný potenciál, patria vychytávací konštanta/konštanta rýchlosti vychytávania (k_1), konštanta rýchlosti depurácie/vylučovania (k_2) a BCF_{ss} .

Analýzovanie vzoriek vody i rýb uľahčuje použitie rádioaktívne označených látok, na základe ktorých sa dá overiť, či treba uskutočniť identifikáciu a kvantifikáciu degradačných produktov. Pri meraní celkových rádioaktívnych zvyškov (napríklad spaľovaním alebo solubilizáciou tkanív) je BCF založený na materskej látke, všetkých jej metabolitoch zadržaných v organizme a tiež na asimilovanom uhlíku. Hodnoty BCF, ktoré sú založené na celkovom množstve rádioaktívnych zvyškov, preto nemožno priamo porovnávať s hodnotami BCF získanými pomocou špecifickej chemickej analýzy iba materskej látky.

Na stanovenie BCF založeného iba na materskej látke možno v štúdiách s rádioaktívne označenými látkami použiť čistiace postupy a v prípade potreby možno stanovovať najvýznamnejšie metabolity. Je tiež možná kombinácia rybej metabolickej štúdie a biokoncentračnej štúdie, pri ktorej sa analyzujú a identifikujú metabolity v tkanivách.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Biokoncentrácia/bioakumulácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme (jeho určenom tkanive) vzhľadom na jej koncentráciu v okolitom prostredí.

Biokoncentračný faktor (BCF alebo K_{SB}) v ktoromkoľvek čase počas vychytávacej fázy tohto akumulačného testu predstavuje koncentráciu testovanej látky v/na rybe alebo jej určenom tkanive [C_f ako $\mu\text{g/g}$ (ppm)], vydelenú koncentráciou tejto látky v okolitom prostredí [C_w ako $\mu\text{g/ml}$ (ppm)].

Rovnovážny biokoncentračný faktor (BCF_{ss} alebo K_B) sa počas dlhého časového obdobia významne nemení, koncentrácia testovanej látky v okolitom prostredí je počas tohto obdobia stála.

Platô alebo rovnovážny stav nastáva pri grafickom znázornení závislosti obsahu testovanej látky v rybe (C_f) od času vtedy, keď sa priebeh krivky stáva paralelný s časovou osou a tri po sebe idúce analýzy C_f uskutočnené na vzorkách odobratých minimálne v dvojdňových intervaloch, sa od seba neodlišujú o viac ako $\pm 20\%$ a ak počas týchto troch odberov vzoriek nedochádza k žiadnym významným zmenám. Pri analyzovaní spájaných vzoriek je potrebné vykonať najmenej štyri bezprostredne za sebou idúce analýzy. Pri pomaly sa vychytávajúcich látkach je primeranejší interval sedem dní.

Biokoncentračné faktory vypočítané priamo z kinetických konštánt (k_1/k_2) sa nazývajú kinetický koncentračný faktor (BCF_K).

Rozdeľovací koeficient oktanol-voda (P_{ow}) je pomer rozpustnosti chemickej zlúčeniny v n-oktanele a vo vode pri rovnovážnych podmienkach (metóda A.8), tiež označovaný ako K_{ow} . Dekadický logaritmus veličiny P_{ow} sa používa na vyjadrenie potenciálu chemickej látky na biokoncentráciu vo vodných živočíchoch.

Expozičná alebo vychytávací fáza je čas, počas ktorého sú ryby vystavené testovanej chemickej látke.

Rýchlostná konštanta vychytávania (k_1) je číselná hodnota, ktorá definuje rýchlosť zvyšovania koncentrácie testovanej látky v/na testovaných rybách (alebo ich určenom tkanive), keď sú ryby vystavené jej prítomnosti (k_1 sa vyjadruje ako deň^{-1}).

Poexpozičná alebo depuračná (vyučovacia) fáza je čas, ktorý nasleduje po premiestnení testovaných rýb z prostredia obsahujúceho testovanú látku do média, v ktorom táto látka nie je prítomná a počas ktorého sa skúma depurácia (alebo čisté vyučovanie) látky z testovacích rýb (alebo z ich určených tkanív).

Rýchlostná konštanta depurácie (vyučovania) (k_2) je číselná hodnota definujúca rýchlosť znižovania koncentrácie testovanej látky v testovacích rybách (alebo ich určených tkanivách) po premiestnení testovacích rýb z média obsahujúceho testovanú látku do média, ktoré túto látku neobsahuje (k_2 sa vyjadruje ako deň^{-1}).

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test pozostáva z dvoch fáz, t. j. z expozičnej (vychytávacej) a poexpozičnej (depuračnej) fázy. Počas vychytávacej fázy sa dve oddelené skupiny jedného druhu rýb vystavujú najmenej dvom koncentráciám testovanej látky. Potom sa premiestnia do prostredia, ktoré testovanú látku neobsahuje, a začne prebiehať depuračná fáza. Okrem prípadov, v ktorých dochádza počas vychytávacej fázy iba k nevýznamnému vychytávaniu testovanej látky (t. j. hodnota BCF je nižšia ako 10), je depuračná fáza vždy potrebná. Počas oboch fáz testu sa sleduje koncentrácia testovanej látky v/na rybách (alebo ich určených tkanivách). Okrem dvoch testovaných koncentrácií sa kontrolná skupina rýb vystavuje prostrediu s úplne identickými podmienkami, ktoré však neobsahuje testovanú látku. Účelom tejto skupiny je vzťahnutie možných nepriaznivých účinkov pozorovaných počas biokoncentračného testu na príslušné kontroly a získanie koncentrácie testovanej látky v pozadí.

S výnimkou prípadov, v ktorých sa preukáže dosiahnutie rovnovážneho stavu skôr, trvá vychytávací fáza 28 dní. Predpovedanie dĺžky vychytávacej fázy potrebnej na dosiahnutie rovnovážneho stavu možno uskutočniť na základe rovnice, ktorá je uvedená v dodatku 3. Depuračná fáza sa začne premiestnením rýb do čistej nádrže s úplne rovnakým prostredím, ktoré však neobsahuje testovanú látku. Vždy keď je to možné, sa biokoncentračný faktor prednostne vypočíta ako pomer (BCF_{ss}) koncentrácie testovanej látky v rybách (C_f) a vo vode (C_w) pri zjavnom rovnovážnom stave a tiež ako kinetický biokoncentračný faktor (BCF_k), ako pomer rýchlostných konštánt vychytávania (k_1) a depurácie (k_2) za predpokladu, že proces sa riadi kinetikou prvého poriadku. V prípadoch, v ktorých sa proces zjavne neriadi kinetikou prvého poriadku, treba použiť komplexnejšie modely (dodatok 5).

Ak sa rovnovážny stav nedosiahne do 28 dní, potom je potrebné pokračovať vo vychytávacej fáze až do jeho dosiahnutia alebo počas 60 dní podľa toho, čo nastane prv. Potom sa začína depuračná fáza.

Na základe modelu, ktorý najlepšie opisuje namerané koncentrácie testovanej látky v rybách a vo vode, sa vypočíta rýchlostná konštanta vychytávania, rýchlostná koncentrácia depurácie (vyučovania) (alebo rýchlostné konštanty v prípade komplexnejších modelov), biokoncentračný faktor a tam, kde je to možné, aj intervaly spoľahlivosti každého z týchto parametrov.

BCF sa vyjadruje ako funkcia celkovej vlhkej hmotnosti rýb. Z osobitných dôvodov sa však môžu v prípadoch dostatočnej veľkosti rýb niekedy použiť určené tkanivá alebo orgány (napríklad sval, pečeň), alebo sa môžu ryby rozdeliť na jadrá (rezy/filety) alebo nejadrá časti (vnútornosti). Pretože pri mnohých organických látkach sa pozoruje jasná súvislosť medzi ich biokoncentračným potenciálom a lipofilitou, existuje tiež príslušná súvislosť medzi obsahom tuku v testovaných rybách a pozorovanou biokoncentraciou týchto látok. V záujme znižovania takéhoto zdroja variability výsledkov testovania by sa pri veľmi lipofilných látkach (t. j. ak je ich $\log P_{\text{ow}} > 3$) mala biokoncentrácia vyjadrovať okrem celkovej telesnej hmotnosti rýb aj na obsah tuku.

Ak je to možné, obsah tuku by sa mal stanovovať v rovnakom biologickom materiáli, ktorý sa použil na stanovenie koncentrácie testovanej látky.

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Pred uskutočnením testu na zisťovanie biokoncentrácie treba mať k dispozícii tieto informácie o testovanej látke:

— rozpustnosť vo vode,

- rozdeľovací koeficient oktanol-voda P_{ow} (označovaný aj ako K_{ow} , stanovený pomocou metódy HPLC uvedenej v A.8),
- hydrolyzu,
- fototransformáciu vo vode, stanovenú pri slnečnom alebo simulovanom slnečnom svetle a pri takých svetelných podmienkach, pri akých sa bude uskutočňovať test na stanovenie biokoncentrácie (3),
- povrchové napätie (t. j. pri látkach, pri ktorých nemožno stanoviť $\log P_{ow}$),
- tlak nasýtených pár,
- okamžitú biodegradáciu (ak je to potrebné).

Medzi ďalšie požadované informácie patrí toxicita pre druh rýb použitý v teste, podľa možnosti vyjadrená ako asymptotická LC_{50} (t. j. nezávislá od času). Na kvantifikáciu testovanej látky v testovaných roztokoch a v biologickom materiáli musí byť k dispozícii primeraná analytická metóda so známou presnosťou a spoľahlivosťou. Musia byť známe aj údaje o príprave a skladovaní vzorky. Treba tiež poznať analytický prah detekcie testovanej látky vo vode a v rybích tkanivách. Pri používaní testovaných látok označených uhlíkom ^{14}C treba poznať aj percentuálne zastúpenie rádioaktivity spojené s nečistotami/prímesami.

1.5. PLATNOSŤ TESTU

Aby bol test platný, musia byť dodržané tieto podmienky:

- výkyvy teploty menšie ako $\pm 2^{\circ}C$,
- koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie klesnúť pod 60 % saturácie,
- koncentrácia testovanej látky v komorách sa musí udržiavať v rozmedzí $\pm 20\%$ priemeru hodnôt nameraných počas vychytávacej fázy,
- úhyn alebo iné nepriaznivé vplyvy/choroby sú na konci testu u testovaných aj kontrolných rýb nižšie ako 10 %; pri trvaní testu počas niekoľkých týždňov alebo mesiacov musí byť úhyn alebo iné nepriaznivé javy nižšie ako 5 % za týždeň a celkovo nesmie presiahnuť 30 %.

1.6. REFERENČNÉ ZLÚČENINY

V prípade potreby možno experimentálne postupy overiť pomocou referenčných zlúčenín so známym biokoncentračným potenciálom. Nemožno však zatiaľ odporúčať žiadne konkrétne látky.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. Prístrojové vybavenie

Pri všetkých súčiastiach zariadení sa treba vyhýbať používaniu materiálov, ktoré sa môžu rozpúšťať, absorbovať a vylúhovávať a ktoré môžu mať na ryby nepriaznivé účinky. Možno používať bežné nádrže pravouhlého alebo valcovitého tvaru z vhodného materiálu a takej veľkosti, ktorá zodpovedá veľkosti násady rýb. Pokiaľ možno, treba sa vyhýbať používaniu hadičiek a rúrok z mäkkých plastických látok. Prednostne treba používať hadičky, rúrky vyrobené z teflónu®, nehrdzavejúcej ocele alebo skla. Zo skúseností vyplýva, že pri látkach s vysokým absorpčným koeficientom (napríklad pri syntetických pyretroidoch) môže byť potrebné používať posilizované sklo. V takýchto prípadoch je potrebné zariadenia po skončení pokusu zlikvidovať.

1.7.2. Voda

Pri testoch sa vo všeobecnosti používa prírodná voda, ktorá musí byť získavaná z nekontaminovaných zdrojov s jednotnou kvalitou. Riediacu vodu musí mať takú kvalitu, aby umožnila prežívanie zvoleného druhu rýb počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa pri nich prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. V ideálnom prípade treba preukázať, že testovaný druh dokáže vo vode používanej na riedenie prežívať, rásť a rozmnožovať sa (napríklad pomocou testu v laboratórnej kultúre alebo testu toxicity pre životný cyklus). Vodu treba charakterizovať najmenej z hľadiska pH, tvrdosti, celkového obsahu tuhých látok

a organicky viazaného uhlíka a pokiaľ možno tiež obsahu amoniaku, dusitanov a alkalitov a pri morských druhoch aj z hľadiska slanosti. Hoci sú parametre, ktoré sú potrebné na zaručenie optimálneho blahobytu rýb, dobre známe, v dodatku 1 sú uvedené odporúčané maximálne koncentrácie celého radu parametrov charakterizujúcich sladkú aj morskú vodu.

Voda musí mať počas celého trvania testu stálu kvalitu. Hodnota pH by sa mala pohybovať v rozmedzí 6,0 až 8,5, no počas daného testu by nemala kolísať o viac ako $\pm 0,5$ jednotiek pH. Aby voda neovplyvňovala neprimeraným spôsobom výsledky testovania (napríklad vznikáním komplexov testovanej látky) alebo aby nemal nepriaznivý vplyv na násadu testovacích rýb, je potrebné zabezpečiť v pravidelných intervaloch odber vzoriek na analýzu. Ak je známe, že voda má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej bude napríklad raz za každé tri mesiace stanovovať obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a kationov (napríklad Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), pesticídov (napríklad celkové organofosforečné a organochloridové pesticídy), celkového organicky viazaného uhlíka a rozsuspendovaných tuhých častíc. Ak si voda preukázateľne zachováva stálu kvalitu počas najmenej jedného roka, potom možno vykonávať tieto stanovenia menej často (napríklad každých šesť mesiacov).

Obsah prirodzených tuhých častíc aj celkového organicky viazaného uhlíka by mal byť v riediacej vode čo možno najnižší, aby sa zabránilo absorpcii testovanej látky na organickú hmotu, v dôsledku čoho by sa mohla znížiť jej biologická dostupnosť (4). Maximálny prípustný obsah tuhých častíc je 5 mg/l (suchá hmotnosť, neprechádzajúca cez 0,45 µm filter) a celkového organicky viazaného uhlíka 2 mg/l (pozri dodatok 1). V prípade potreby treba vodu pred použitím filtrovať. Príspevok testovacích rýb (exkrementy) a zvyškov krmiva k obsahu organicky viazaného uhlíka vo vode by mal byť čo možno najnižší. Koncentrácia organicky viazaného uhlíka v testovacej nádrži by nemala počas celého trvania testu prekročiť koncentráciu organicky viazaného uhlíka, pochádzajúcu z testovanej látky, prípadne použitého solubilizačného činidla, o viac ako 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3. Testovacie roztoky

Prípraví sa zásobný roztok testovanej látky s vhodnou koncentráciou. Zásobný roztok treba podľa možnosti pripraviť jednoduchým zmiešaním alebo trepaním testovanej látky v rozpúšťacej vode. Použitie rozpúšťadiel alebo disperzných činidiel (rozpúšťajúcich činidiel) sa neodporúča, hoci v niektorých prípadoch to môže byť v záujme prípravy zásobného roztoku s vhodnou koncentráciou potrebné. Medzi rozpúšťadlá, ktoré možno použiť, patrí etanol, metanol, etylénglykol, momometyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol. Ako disperzné činidlá možno použiť Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metylcelulózu a HCO-40. Činidlá, ktoré ľahko podliehajú biodegradácii, treba používať opatrne, pretože môžu v prietokových testoch spôsobovať problémy s rastom baktérií. Testovanú látku možno označiť rádioaktívnym izotopom a musí mať najvyššiu možnú čistotu (napríklad podľa možnosti > 98 %).

Pri prietokových testoch je potrebný systém pre nepretržitý prívod a zriedovanie zásobného roztoku testovanej látky (napríklad dávkovacie čerpadlo, úmerný dávkovač, saturátorový systém), ktorým sa zabezpečuje jej prívod do testovacích komôr. Objem každej testovacej komory by sa mal denne vymeniť aspoň päťkrát. Treba uprednostniť prietokový systém, hoci tam, kde to nie je možné (malo by to napríklad nepriaznivý vplyv na testovací organizmus) sa môžu pod podmienkou splnenia kritérií validity použiť aj poloprietokové usporiadania. Prietokovú rýchlosť zásobného roztoku aj zriedovacej vody je potrebné skontrolovať 48 hodín pred začatím pokusu a potom najmenej raz denne počas celého jeho trvania. Treba pri tom kontrolovať aj rýchlosť prietoku cez každú testovaciu komoru a zabezpečiť, aby výkyvy prietoku v rámci komôr i medzi nimi nepresahovali 20 %.

1.7.4. Voľba biologických druhov

Pri voľbe biologických druhov sa treba riadiť týmito kritériami: musia byť ľahko dostupné, možno ich získať vo výhodnej veľkosti a možno ich uspokojivo udržiavať v laboratóriu. Ako ďalšie kritériá pri voľbe vhodných druhov rýb treba brať do úvahy ich rekreačný, komerčný a ekologický význam, ako aj ich pomernú citlivosť, úspešnosť použitia v minulosti a podobne.

Odporúčané testovacie druhy sú uvedené v dodatku 2. Možno použiť aj iné druhy, postup testovania však treba upraviť tak, aby sa dosiahli vhodné testovacie podmienky. Použitie daného druhu a pokusnej metódy treba v takomto prípade odôvodniť.

1.7.5. Uchovávanie rýb

Aklimatizujte zásobnú populáciu rýb najmenej dva týždne vo vode a pri testovacej teplote. Počas celej aklimatizácie ich krmte dostatočným množstvom stravy, ktorá sa bude používať aj počas pokusu.

Po 48-hodinovej privykacej-adaptačnej fáze sa zaznamená úhyn a uplatnia sa tieto selekčné kritériá:

— úhyn za sedem dní prevyšuje 10 % celej populácie: celá násada sa vyradí,

- úhyn za sedem dní je medzi 5 a 10 % populácie: aklimatizovať ďalších sedem dní,
- úhyn za sedem dní je nižší ako 5 % populácie: násadu možno použiť; ak je úhyn počas ďalších siedmich dní vyšší ako 5 %, celá násada sa vyradí.

Treba zabezpečiť, aby boli použité testovacie ryby bez zjavných chorôb a abnormalít. Všetky choré ryby treba z pokusu vyradiť. Dva týždne pred testom ani počas jeho trvania nesmú byť ryby ošetrované proti ochoreniam.

1.8. PRIEBEH TESTU

1.8.1. Predbežná skúška

V záujme optimalizácie podmienok hlavného testovania môže byť užitočné vykonať predbežný pokus zameraný napríklad na voľbu koncentrácie/koncentrácií testovanej látky a trvanie vychytávacej a depuračnej fázy.

1.8.2. Podmienky vystavenia testovanej látke

1.8.2.1. Trvanie vychytávacej fázy

Trvanie vychytávacej fázy možno predpovedať na základe praktických skúseností (napríklad na základe predchádzajúcej štúdie alebo znalosti o akumulácii príbuznej látky) alebo na základe istých empirických vzťahov vychádzajúcich buď z rozpustnosti danej látky vo vode, alebo z jej rozdeľovacieho koeficientu v systéme oktanol/voda (pozri dodatok 3).

Okrem prípadov, v ktorých nastane rovnovážny stav preukázateľne skôr, by mala vychytávacia fáza trvať 28 dní. Ak sa rovnovážny stav do 28 dní nedosiahne, potom treba vychytávaciu fázu a analyzovanie vzoriek predĺžiť buď do jeho dosiahnutia, alebo na 60 dní, podľa toho, čo nastane skôr.

1.8.2.2. Trvanie depuračnej fázy

Na dosiahnutie dostatočného odstránenia (napríklad 95 %) testovanej látky z tela zvyčajne stačí polovičný čas trvania vychytávacej fázy (tento odhad je vysvetlený v dodatku 3). Ak je čas potrebný na 95 % odstránenie testovanej látky z praktického hľadiska prídlhý a je napríklad dva razy dlhší ako trvanie vychytávacej fázy (t. j. viac ako 56 dní), potom možno použiť kratšie obdobie (napríklad kým koncentrácia testovanej látky nebude nižšia ako 10 % rovnovážnej koncentrácie). V prípade látok, ktorých vychytávame a depurácia sa riadia zložitejším priebehom ako pri jednodukomorovom rybom modeli s kinetikou prvého poriadku, treba použiť na stanovenie rýchlostnej konštanty depurácie dlhšie obdobie. Podmienkou však je, aby bola koncentrácia testovanej látky počas takéhoto predĺženého obdobia vždy vyššia, ako je prah analytickej detekcie.

1.8.2.3. Počty testovacích rýb

Počet testovacích rýb na testovanú koncentráciu voľte tak, aby boli pri každom odbere vzoriek k dispozícii najmenej štyri kusy na jedno meranie. V prípade potreby vyššej štatistickej sily treba na jednu vzorku viac rýb.

V prípade použitia dospelých rýb zaznamenajte, či sa pokus vykonáva na samčekoch, alebo samičkách, alebo na oboch pohlaviach. Pri používaní oboch pohlaví treba ešte pred začatím testovania zdokumentovať, že rozdiel v obsahu tuku medzi nimi nie je významný. Môže byť potrebné spájanie všetkých samčekov i samičiek.

Pri každom odbere vzoriek treba vyberať ryby podobnej veľkosti, tak aby najmenšie z nich neboli menšie ako dve tretiny hmotnosti najväčších. Všetky musia byť z rovnakého roka a musia pochádzať z toho istého zdroja. Vek a hmotnosť majú podľa všetkého niekedy na hodnoty BCF významný vplyv (1), a preto je potrebné tieto údaje presne zaznamenávať. Odporúča sa, aby sa priemerná hmotnosť rýb zistila pomocou odvážania subpopulácie rýb ešte pred uskutočnením testovania.

1.8.2.4. Veľkosť násady

Používa sa vysoký pomer vody k rybám, aby sa minimalizovalo znižovanie C_w spôsobené pridaním rýb na začiatku pokusu a aby sa zabránilo znižovaniu koncentrácie rozpusteného kyslíka. Je dôležité, aby veľkosť násady zodpovedala použitému druhu rýb. V každom prípade sa však odporúča zvyčajná veľkosť násady v rozmedzí 0,1 do 1,0 g rýb (vlhká hmotnosť) na liter vody a deň. Možno použiť aj vyššie násady, treba však zabezpečiť udržiavanie požadovanej koncentrácie testovanej látky v rozmedzí povolených výkyvov ± 20 % a koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie klesnúť pod 60 % saturácie.

Pri voľbe primeraných režimov nasadzovania treba brať do úvahy bežné prirodzené prostredie daného druhu. Napríklad ryby žijúce pri dne si môžu vyžadovať väčšiu plochu dna nádrže pri rovnakom objeme vody ako druhy žijúce pri hladine.

1.8.2.5. Kŕmenie

Počas aklimatizačnej aj testovacej fázy sa ryby krmia primeranou stravou so známym obsahom tukov a celkových bielkovín v množstve dostatočnom na udržiavanie rýb v dobrom zdravotnom stave a na príberanie telesnej hmotnosti. Počas aklimatizačnej aj testovacej fázy sa ryby krmia denne množstvom, ktoré zodpovedá približne 1 až 2 % telesnej hmotnosti. Takýto režim kŕmenia zabezpečí počas celého testu relatívne stálu koncentráciu lipidov. Množstvo krmiva treba pravidelne prepočítavať, napríklad raz týždenne, aby sa zabezpečila jednotná telesná hmotnosť aj obsah tukov. Na účely takéhoto výpočtu možno hmotnosť rýb nachádzajúcich sa v testovacej komore odhadnúť na základe hmotnosti rýb odobratých z danej komory pri poslednom odbere vzoriek. Ryby, ktoré zostávajú v pokusnej komore, sa nesmú vážiť.

Neskonzumované krmivo aj výkaly sa z testovacej komory denne odsávajú, a to krátko po skončení kŕmenia (do pol až jednej hodiny). Testovacie komory treba počas celého testovacieho obdobia udržiavať v čo možno najčistejšom stave, aby sa na čo možno najnižšiu úroveň znižovala aj koncentrácia organickej hmoty. Prítomnosť organicky viazaného uhlíka totiž môže obmedzovať biologickú dostupnosť testovanej látky (1).

Mnohé krmivá obsahujú rybciu múčku, krmivo je preto potrebné analyzovať na prítomnosť testovanej látky. Je žiaduce, aby sa v krmive stanovoval aj obsah pesticídov a ťažkých kovov.

1.8.2.6. Svetlo a teplota

Dĺžka fotoperiód je zvyčajne 12 až 16 hodín a teplota (± 2 °C) by mala byť primeraná druhu testovacích rýb (dodatok 2). Musí byť známy typ osvetlenia a jeho charakteristiky. Treba zachovávať opatrnosť z hľadiska možnosti fototransformácie testovanej látky pod vplyvom svetelných podmienok štúdie. Treba udržiavať primerané osvetlenie, aby sa ryby nevystavovali účinkom neprirodzených fotoproduktov. V niektorých prípadoch môže byť potrebné používať filtre na elimináciu ultrafialového žiarenia s vlnovou dĺžkou nižšou ako 290 nm.

1.8.2.7. Testované koncentrácie

Ryby sa v prietochných podmienkach vystavujú najmenej dvom koncentráciám testovanej látky vo vode. Vyššia (alebo najvyššia) koncentrácia testovanej látky sa zvyčajne volí tak, aby predstavovala približne 1 % jej akútnej asymptotickej LC_{50} a aby bola najmenej desať ráz vyššia ako jej prah detegovateľnosti pomocou používanej analytickej metódy.

Najvyššiu testovanú koncentráciu tiež možno stanoviť vydelení hodnoty akútnej 96-hodinovej LC_{50} príslušným pomerom akútnej/chronickej koncentrácie (príslušné pomery sa môžu pri niektorých chemikáliách pohybovať od 3 to 100). Ak je to možné, druhú (prípadne ďalšie) z testovaných koncentrácií treba voliť tak, aby sa od prvej odlišovala/odlišovali o faktor 10. Ak to z dôvodu kritéria 1 % hodnoty LC_{50} alebo analytického prahu nie je možné, potom možno použiť faktor nižší ako 10 alebo treba uvažovať o označení testovanej látky izotopom¹⁴ C. Nesmú sa používať koncentrácie, ktoré sú vyššie ako rozpustnosť testovanej látky.

V prípade použitia solubilizačného činidla nesmie byť jeho koncentrácia vyššia ako 0,1 ml/l a malo by byť rovnaké pre všetky pokusné nádrže. Musí byť známe, akým spôsobom prispievajú spoločne s testovanou látkou k celkovému obsahu organicky viazaného uhlíka v testovanej vode. V každom prípade treba urobiť všetko pre to, aby sa tieto látky nemuseli vôbec používať.

1.8.2.8. Kontroly

Okrem pokusných skupín je potrebné mať aj kontrolnú skupinu udržiavanú iba v riediacej vode a v príslušných prípadoch aj kontrolnú skupinu udržiavanú v riediacej vode s prídavkom iba solubilizačného činidla. Podmienkou je, aby solubilizačné činidlo nemalo na ryby žiadny účinok. Ak takýto účinok má, potom je potrebné zaradiť do pokusu obidve kontrolné skupiny.

1.8.3. Frekvencia merania kvality vody

Počas testu treba vo všetkých nádržiach sledovať obsah rozpusteného kyslíka, TOC, pH a teplotu. Pri kontrolnej skupine a v jednej nádrži s vyššou (najvyššou) koncentráciou treba merať celkovú tvrdosť, a ak to prichádza do úvahy, aj slanosť vody. Množstvo rozpusteného kyslíka, a ak to prichádza do úvahy, aj slanosť je počas vychytávacej fázy potrebné merať minimálne tri razy, t. j. na jej začiatku, približne v strede a na konci. Počas

depuračnej fázy treba tieto hodnoty merať raz týždenne. TOC sa musí merať na začiatku testu (24 a 48 hodín pred začatím vychytávacej fázy) pred pridaním rýb a potom najmenej raz týždenne počas vychytávacej aj depuračnej fázy. Teplotu treba merať denne, pH na začiatku a konci každého obdobia a tvrdosť raz počas každého testu. Aspoň v jednej nádrži by sa malo zabezpečiť kontinuálne meranie teploty.

1.8.4. Odber a analyzovanie vzoriek rýb a vody

1.8.4.1. Harmonogram odoberania vzoriek rýb a vody

Voda na stanovenie koncentrácie testovanej látky sa z testovacích nádrží odoberá pred pridaním rýb a počas vychytávacej i depuračnej fázy. Vzorky vody sa ako minimum odoberajú v rovnakom čase ako ryby a tiež pred kŕmením. Počas vychytávacej fázy sa merajú koncentrácie testovanej látky, aby sa overovalo splňanie kritéria platnosti.

Vzorky rýb sa odoberajú najmenej päť ráz počas vychytávacej a najmenej štyri razy počas depuračnej fázy. Dostatočne presné hodnoty BCF sa niekedy pri takomto počte vzoriek vypočítavajú veľmi ťažko, najmä ak sa depurácia zjavne riadi inou ako jednoduchou kinetikou prvého poriadku. V takýchto prípadoch je žiaduce robiť odber počas oboch fáz častejšie (pozri dodatok 4). Navyše odobraté vzorky sa uskladňujú a analyzujú iba vtedy, ak sa výsledky prvého kola analýz ukážu byť pre výpočet BCF s požadovanou presnosťou nedostatočné.

Príklad prijateľného harmonogramu odberu vzoriek je uvedený v dodatku 4. Jednoducho možno vypočítať aj iné harmonogramy, použijúc pri tom iné predpokladané hodnoty P_{ow} potrebné na výpočet dĺžky vystavenia, ktorá je potrebná na dosiahnutie 95 % vychytávania.

Počas vychytávacej fázy pokračujú odbery až po dosiahnutie rovnovážneho stavu alebo počas 28 dní, podľa toho, čo nastane skôr. Ak sa rovnovážny stav do 28 dní nedosiahne, odbery pokračujú až do jeho dosiahnutia alebo počas 60 dní, podľa toho, čo nastane skôr. Pred začatím depuračnej fázy sa ryby premiestnia do čistej nádrže.

1.8.4.2. Odber a príprava vzoriek

Vzorky vody sa na analyzovanie odoberajú napríklad odsávaním pomocou inertnej hadičky zo stredu testovacej nádrže. Oddelenie frakcií testovanej látky dostupných pre biodegradáciu od frakcií pre biodegradáciu nedostupných často nemožno uskutočniť ani filtráciou, ani centrifugáciou (najmä v prípade superlipofilných chemikálií s hodnotou $\log P_{ow} > 5$ (1) (5)), takže podrobovať vzorky týmto postupom nemusí byť potrebné.

Namiesto toho treba vykonávať také opatrenia, ktoré zabezpečia čo možno najlepšiu čistotu nádrží, a počas vychytávacej aj depuračnej fázy treba sledovať obsah celkového organicky viazaného uhlíka.

Pri každom odbere vzoriek sa z testovacích nádrží odoberie primeraný počet rýb (zvyčajne minimálne štyri). Odobraté ryby sa rýchle opláchnu, osušia pomocou absorpčného materiálu a pomocou najprimeranejšej a najhumánnejšej metódy ihneď usmrtia a odvážia.

Voda aj ryby by sa mali analyzovať podľa možnosti ihneď po odbere, čím sa predídde degradácii alebo iným stratám. Priebežne počas vykonávania testu treba vypočítavať približné rýchlosti vychytávania a depurácie. Okamžitým vykonávaním analýz predídeme aj oddialeniu identifikácie dosiahnutia rovnovážneho stavu.

Pri oddialení analýz treba vzorky primeraným spôsobom uskladniť. Pred začatím štúdie sa treba oboznámiť so správnym spôsobom skladovania danej testovanej látky – napríklad zamrazením, skladovaním pri 4 °C, extrahovaním atď.

1.8.4.3. Kvalita analytických metód

Celý postup v zásade závisí od presnosti a citlivosti analytických metód používaných pri testovanej látke. Treba preto experimentálne overiť, či sú presnosť a reprodukovateľnosť chemických analýz, ako aj úroveň opätovného získania testovanej látky z vody aj z rýb pre danú metódu uspokojivé. Treba tiež overiť, či nie je testovaná látka v detegovateľných množstvách prítomná v riediackej vode.

V prípade potreby sa hodnoty C_w a C_f získané z testu upravujú podľa úrovne opätovného získania testovanej látky a hodnôt pozadia zistených pri kontrolách. So vzorkami rýb aj vody je potrebné počas celého testovania zaobchádzať tak, aby sa minimalizovala koncentrácia a straty (vznikajúce napríklad v dôsledku absorpcie na odoberacie zariadenie).

1.8.4.4. Analyzovanie rybích vzoriek

V prípade použitia rádioaktívne označeného materiálu možno stanovovať celé množstvo označenej látky (t. j. materskú zlúčeninu aj jej metabolity) alebo možno vzorky prečistiť a stanovovať materskú látku osobitne. V rovnovážnom stave alebo na konci vychytávacej fázy, podľa toho, čo nastane skôr, možno charakterizovať aj hlavné metabolity. V prípadoch, v ktorých je hodnota BCF vyjadreného celkovým množstvom rádioaktívnych zvyškov $\geq 1\,000\%$, môže byť žiaduce a pre niektoré kategórie chemických látok, ako sú pesticídy, sa to dôrazne odporúča, aby sa identifikovali a kvantifikovali tie degradačné produkty testovanej látky, ktoré v rybích tkanivách predstavujú v rovnovážnom stave $\geq 10\%$ celkového množstva zvyškov. Po identifikácii a kvantifikácii degradačných produktov, ktoré predstavujú v rybích tkanivách $\geq 10\%$ celkového množstva rádioaktívnych zvyškov, sa tiež odporúča identifikácia a kvantifikácia takýchto degradačných produktov aj v testovanej vode.

Koncentráciu testovanej látky je zvyčajne potrebné stanoviť v každej jednej odváženej rybe. Ak to nie je možné, potom možno vzorky odobraté pri rovnakom odbere spájať, hoci spájaním sa obmedzujú štatistické metódy, ktoré možno použiť pri spracúvaní výsledkov. Ak má niektorá štatistická metóda a stupeň štatistickej významnosti osobitnú dôležitosť, potom je potrebné použiť v teste taký počet rýb, ktorý umožní uskutočniť požadovaný spôsob spájania vzoriek (6) (7).

BCF je potrebné vyjadriť ako funkciu celkovej vlhkej hmotnosti a v prípade vysoko lipofilných látok aj ako funkciu obsahu tuku. Ak je to možné, obsah tuku treba stanoviť pri každom odbere vzoriek. Obsah tuku treba stanoviť pomocou vhodnej metódy (literárne odkazy 8 a 2 v dodatku 3). Ako štandardnú metódu možno odporúčať extrakciu zmesou chloroformu a metanolu (9). Jednotlivé metódy neposkytujú rovnaké výsledky (10), pri každej z nich je preto dôležité uviesť podrobné údaje. Ak je to možné, obsah tuku treba stanovovať v rovnakom extrakte, ktorý sa pripravil na analyzovanie testovanej látky, pretože tuky bývajú často potrebné pred chromatografickým krokom zo vzorky odstrániť. Obsah tukov v rybách (ako mg/kg vlhkej hmotnosti) na konci pokusu by sa nemal líšiť od obsahu tukov na jeho začiatku o viac ako $\pm 25\%$. Treba zaznamenať aj percentuálny obsah sušiny v tkanivách, aby bolo možné vyjadriť obsah tuku aj na suchú hmotnosť.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Vychytávacia krivka testovanej látky sa získa grafickým vynášaním koncentrácie v/na rybách (alebo určenom tkanive) počas vychytávacej fázy proti času na aritmetických osiach. Ak krivka dosiahne plató, t. j. ak sa stane približne asymptotická k časovej osi, potom možno rovnovážnu hodnotu BCF_{ss} vypočítať zo vzťahu:

$$\frac{C_f \text{ rovnovážne (priemer)}}{C_w \text{ rovnovážne (priemer)}}$$

Ak sa rovnovážny stav nedosiahne, potom sa môže dať BCF_{ss} vypočítať s presnosťou dostatočnou na vyhodnotenie rizika na základe „rovnovážneho stavu“ pri 80 % ($1,6/k_2$) alebo 95 % ($3,0/k_2$) rovnováhe.

Stanovuje sa aj koncentračný faktor (BCF_k), ktorý je vyjadrený ako pomer dvoch kinetických konštánt prvého poriadku, t. j. k_1/k_2 . Rýchlostná konštanta depurácie (k_2) sa zvyčajne stanovuje z depuračnej krivky (t. j. z grafického znázornenia znižovania koncentrácie testovanej látky v rybách v závislosti od času). Z hodnoty k_2 a na základe C_f , ktorá je odvodená z vychytávacej krivky, sa potom vypočíta rýchlostná konštanta vychytávania (k_1) (pozri tiež dodatok 5). Prednostným spôsobom stanovovania BCF_k a oboch rýchlostných konštánt k_1 a k_2 sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača (11). Na výpočet k_1 a k_2 možno okrem toho použiť grafické metódy. V prípade zjavnej nelineárnosti depuračnej krivky (t. j. ak sa depurácia neriadi kinetikou prvého poriadku) treba použiť komplexnejšie modely (pozri literárne odkazy v dodatku 3) a poradiť sa s bioštatistikom.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

V prípadoch, v ktorých sa koncentrácie testovaných roztokov pohybujú na úrovni blízkej prahu detegovateľnosti analytickej metódy, treba interpretovať výsledky s veľkou opatrnosťou.

Jasne vymedzené krivky vychytávania a odbúravania sú príznakom dobrej kvality údajov o biokoncentracii. Rozdiely vychytávacích/depuračných konštánt medzi dvoma testovanými koncentráciami musia byť menšie ako 20 %. Významné rozdiely v rýchlosti vychytávania a depurácie medzi dvoma testovacími koncentráciami treba zaznamenať a treba sa pokúsiť sa o ich možné vysvetlenie. Medza spoľahlivosti hodnôt BCF sa pri dobre zostavených štúdiách zvyčajne približuje k hodnote $\pm 20 \%$.

3. PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

3.1. TESTOVANÁ LÁTKA

- fyzikálna povaha a v primeraných prípadoch fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné chemické údaje (vrátane obsahu organicky viazaného uhlíka, ak to prichádza do úvahy)
- v prípade rádioaktívneho označenia presná poloha označeného atómu/označených atómov a percento rádioaktivity viazanej na nečistoty/prímesi.

3.2. TESTOVACÍ BIOLOGICKÝ DRUH

- vedecký názov, kmeň, pôvod, všetky zásahy uskutočnené pred pokusom, aklimatizácia, vek, rozsah hmotností atď.

3.3. TESTOVACIE PODMIENKY

- typ pokusu (napríklad prietochný alebo poloprietochný systém),
- typ a charakteristiky osvetlenia a dĺžka svetlej fázy/svetlých fáz,
- zostava pokusu (napríklad počet a veľkosť testovacích komôr, rýchlosť výmeny celého objemu vody, počet replikátov, počet rýb v replikáte, počet testovaných koncentrácií, dĺžka vychytávacej a depuračnej fázy, frekvencia odoberania vzoriek rýb a vody),
- metóda prípravy zásobného roztoku a frekvencia jeho obnovovania (solubilizačné činidlo, v prípade použitia musí byť uvedená jeho koncentrácia a príspevok k obsahu organicky viazaného uhlíka),
- nominálne testované koncentrácie, priemery hodnôt nameraných v testovacích nádržkách a ich štandardné odchýlky a spôsob, akým sa vypočítali,
- zdroj zriedovacej vody, opis jej každého ošetrovania pred pokusom, výsledky každého preukazovania, že ryby sú schopné v pokusnej vode žiť, charakteristiky vody: pH, tvrdosť, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, zvyškové hladiny chlóru (ak boli merané), celkový organicky viazaný uhlík, rozsuspendedované tuhé častice, slanosť testovacieho média (ak prichádza do úvahy) a všetky ďalšie merania,
- kvalita vody v testovacej nádrži, pH, tvrdosť, TOC, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka,
- podrobné informácie o režime kŕmenia (napríklad typ krmiva, zdroj, zloženie – prinajmenšom obsah tukov a bielkovín, a ak to je možné, aj dávané množstvo a frekvencia kŕmenia),
- informácie o spracúvaní vzoriek rýb a vody vrátane údajov o ich príprave, skladovaní, extrakcii a analytických metódach použitých pri stanovovaní testovanej látky a obsahu tukov (ak sa meral).

3.4. VÝSLEDKY

- výsledky všetkých predbežných štúdií,
- úhyn rýb v kontrolnej skupine a v skupine nachádzajúcej sa v expozičnej komore a všetky pozorované abnormality v správaní,
- obsah tukov v rybách (ak sa pri testovaní stanovoval),
- krivky (vrátane všetkých nameraných údajov) opisujúce vychytávanie a depuráciu testovanej látky v rybách, čas potrebný na dosiahnutie rovnovážneho stavu,
- Cf a Cw (spolu so štandardnou odchýlkou a rozsahom, ak je to potrebné) v každom čase odberu vzoriek [Cf je vyjadrené v µg/g vlhkej hmotnosti (ppm) celého tela alebo jeho určeného tkaniva, napríklad tuku, a Cw vyjadrené v µg/ml (ppm)]. Hodnoty Cw pre kontrolné skupiny (treba uviesť aj hodnoty pozadia),
- rovnovážny biokoncentračný faktor (BCFSS), resp. kinetický biokoncentračný faktor (BCFk), a ak to prichádza do úvahy, tak aj 95 % medzu spoľahlivosti pre konštanty vychytávania a depurácie (všetky vyjadrené vzhľadom na celé telo zvierat alebo jeho určené tkanivo a celkový obsah tukov, ak bol meraný), medzu spoľahlivosti a štandardné odchýlky (ak sú k dispozícii) a metódy výpočtu pre každú použitú koncentráciu testovanej látky,
- v prípade použitia rádioaktívne označených látok, a ak sa to vyžaduje, možno uviesť aj hromadenie všetkých zachytených metabolitov,
- čokoľvek nezvyčajné, čo sa počas testu pozorovalo, všetky odchýlky od týchto postupov a všetky iné významné informácie.

Počas predbežných pokusov a pri vypracúvaní experimentálnej zostavy minimalizujte výskyt výsledkov typu „nezachytené pri danom prahu detegovateľnosti“, pretože takéto výsledky sa nedajú použiť na výpočet konštánt.

4. ODKAZY

- (1) Connell D. W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp. 117 – 156.
- (2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). 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 822-94-002 (1994). Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- (6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide Analytical Manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- (7) US EPA (1974). Section 5, A(l). Analysis of Human 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.
 - (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 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 Molluscs.

DODATOK 1

Chemické charakteristiky prijateľnej zriedovacej vody

	Látka	Hraničná koncentrácia
1	Tuhé častice	5 mg/l
2	Celkový organicky viazaný uhlík	2 mg/l
3	Neionizovaný amoniak	1 µg/l
4	Zvyškový chlór	10 µg/l
5	Celkové pesticídy na báze organofosfátov	50 ng/l
6	Celkové pesticídy na báze organicky viazaného chlóru plus polychlórované bifenyle	50 ng/l
7	Celkový organicky viazaný chlór	25 ng/l
8	Hliník	1 µg/l
9	Arzén	1 µg/l
10	Chróm	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Meď	1 µg/l
13	Železo	1 µg/l
14	Olovo	1 µg/l
15	Nikel	1 µg/l
16	Zinok	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Ortuť	100 ng/l
19	Striebro	100 ng/l

DODATOK 2

Druhy rýb odporúčané na testovanie

	Odporúčaný druh	Odporúčaný roz- sah testova- cích teplôt	Odporúčaná cel- ková dĺžka testo- vacích zvierat (cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) danio pásikavé	20 – 25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 – 25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) kapor obyčajný	20 – 25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck a Schlegel) kapro- zúbka	20 – 25	4,0 ± 1,0
5	Pocílía reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) gupka dúhová	20 – 25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) slnečnica modrohrdlá	20 – 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) pstruh dúhový	13 – 17	8,0 ± 4,0
S	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) pichľavka siná	18 – 20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London. Series B. Vol. 252, p. 231.

V jednotlivých krajinách sa používajú rozličné brakické a morské druhy rýb, napríklad:

	<i>Lelostormus xanthurus</i>
kaprozúbka	<i>Cyprinodon variegatus</i>
	<i>Menidia bery lina</i>
	<i>Cymatogaster aggregata</i>
	<i>Parophrys vertulus</i>
	<i>Leptocottus armatus</i>
pichľavka siná	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
pyskatec	<i>Dicentrarchus labrax</i>
belička európska	<i>Alburnus alburnus</i>

Odchyt

Sladkovodné ryby, ktoré sú uvedené v tabuľke, sa jednoducho chovajú, resp. sú dostupné počas celého roka, zatiaľ čo dostupnosť morských a brakických druhov je čiastočne obmedzená na jednotlivé krajiny. V kontrolovaných podmienkach bez výskytu ochorení a parazitov ich možno rozmnožovať a chovať buď na rybích farmách, alebo v laboratóriách, takže pokusné zvieratá sú zdravé a je známy ich pôvod. Tieto ryby sú dostupné v mnohých častiach sveta.

DODATOK 3

Predpoveď trvania vychytávacej a depuračnej fázy1. *Predpoveď trvania vychytávacej fázy*

Pred vykonaním testu možno na základe empirického vzťahu medzi k_2 a rozdeľovacím koeficientom pre zmes n-oktanol/voda (P_{ow}) alebo medzi k_2 a rozpuštnosťou vo vode (s) odhadnúť hodnotu konštanty k_2 , a tým aj istý zlomok času potrebný na dosiahnutie rovnovážneho stavu.

Odhad hodnoty k_2 (vyjadrený ako deň^{-1}) možno získať napríklad na základe tohto vzťahu (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 \quad (r^2 = 0,95) \quad (\text{rovnica 1})$$

Ďalšie vzťahy sú uvedené v odkaze (2).

Ak hodnota P_{ow} nie je známa, potom sa dá odhad (3) urobiť na základe znalosti rozpustnosti látky (s) pomocou vzťahu:

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,994) \quad (\text{rovnica 2})$$

kde

s = rozpustnosť (mol/l): ($n = 36$).

Tieto vzťahy platia iba pre chemické látky s hodnotou $\log P_{ow}$ v rozmedzí 2 a 6,5 (4).

Čas potrebný na dosiahnutie istej časti rovnovážneho stavu sa dá získať pomocou dosadenia hodnoty k_2 do všeobecnej kinetickej rovnice, ktorá opisuje vychytávanie a depuráciu (kinetika prvého poriadku):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

alebo ak je C_w konštantné

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{rovnica 3})$$

V oblastiach blízkyh rovnovážnemu stavu ($t \rightarrow \infty$) možno rovnicu 3 zjednodušiť (5) (6) na vzťah:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ alebo } C_f/C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Hodnota súčinu $k_1/k_2 \cdot C_w$ sa približuje ku koncentrácii v rybách pri „rovnovážnom stave“ ($C_{f,s}$).

Rovnica 3 sa dá prepísať takto]

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \text{ alebo } \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (\text{rovnica 4})$$

Po predbežnom odhade hodnoty k_2 na základe rovnice 1 alebo 2 možno pomocou rovnice 4 vypočítať určité percento rovnovážneho stavu.

Ako orientácia platí, že štatisticky významná dĺžka trvania vychytávacej fázy pre získanie štatisticky významných údajov (BCF_K) je čas, za ktorý dosiahne krivka závislosti logaritmu koncentrácie testovanej látky v rybách od lineárneho času svoju polovicu, čiže $1,6/k_2$ alebo 80 % rovnovážneho stavu, avšak nie viac ako $3,0/k_2$ alebo 95 % rovnovážneho stavu (7).

Čas potrebný na dosiahnutie 80 % rovnovážneho stavu je (rovnica 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{je} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (\text{rovnica 5})$$

Podobne pre 95 % rovnovážneho stavu platí:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (\text{rovnica 6})$$

Napríklad trvanie vychytávacej fázy (zvyšovanie koncentrácie) pre látky s hodnotou $\log P_{ow} = 4$ je (s použitím rovníc 1, 5 a 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ dní}^{-1}$$

$$\text{do (80 \%)} = 1,6/0,652, \text{ t. j. } 2,45 \text{ dní (59 hodín)}$$

$$\text{alebo do (95 \%)} = 3,0/0,652, \text{ t. j. } 4,60 \text{ dní (110 hodín)}$$

Podobne pre testovanú látku s hodnotou $s = 10^{-5} \text{ mol/l}$ ($\log(s) = 5,0$) je trvanie zvyšovania koncentrácie (rovnice 1, 2, 5 a 6):

$$\log_{10} (P_{ow}) = -0,862 \cdot (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ dní}^{-1}$$

$$\text{do (80 \%)} = 1,6/0,246, \text{ t. j. } 6,5 \text{ dní (156 hodín)}$$

$$\text{alebo do (95 \%)} = 3,0/0,246, \text{ t. j. } 12,2 \text{ dní (293 hodín)}$$

Alternatívne výraz:

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (hodiny)}.$$

možno použiť na vypočítanie času potrebného na dosiahnutie efektívneho rovnovážneho stavu (4).

2. *Predpovedanie trvania depuračnej fázy*

Na základe všeobecnej rovnice opisujúcej vychytrávanie a deputáciu (kinetika prvého poriadku) sa dá odhadnúť aj čas, ktorý je potrebný na zníženie telesnej koncentrácie látky na určité percento jej pôvodnej koncentrácie v tele (1) (8).

Predpokladá sa, že hodnota C_w je počas depuračnej fázy nulová. Rovnicu možno preto zjednodušiť na vzťah:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{alebo} \quad C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

kde $C_{f,0}$ je koncentrácia na začiatku depuračnej fázy. 50 % depurácia sa potom dosiahne za čas (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{alebo} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Podobne sa dá vypočítať, že 95 % depurácia sa dosiahne za:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ak sa v prvom období dosiahne 80 % vychytávania ($1,6/k_2$) a celkové odbúranie počas depuračnej fázy bude 95 % ($3,0/k_2$), potom trvá depuračná fáza približne dva razy tak dlho ako fáza vychytávacia.

Je však potrebné mať na pamäti, že tieto odhady sú založené na predpoklade, že vychytávame aj depurácia sa riadia kinetikou prvého poriadku. Ak pri nich kinetika prvého poriadku zjavne neplatí, potom je potrebné použiť komplexnejšie modely [uvedené napríklad v odkaze (1)].

Odkazy (citované v dodatku 5)

- (1) Spacie A. a Hamelink J. L. (1982), *Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish*. Environ, Toxicol, and Chem. 1. pp. 309 – 320.
 - (2) Kristensen P. (1991). *Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals*. Water Quality Institute, Denmark.
 - (3) J. Chiou C T, a 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 24 3-255. SCOPE. 1 98 5. John Wiley and 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 kinetic models*, Can. J. Chem. Eng. 55, pp. 514 – 622.
 - (8) Könemann H, and Van Leeuwen K. (1980), *Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of Six Chlorobenzenes by Guppies*. Chemosphere, 9, pp. 3 – 19.
-

DODATOK 4

Teoretický príklad odberu vzoriek pre stanovovanie biokonzentrácie látok s hodnotou $\log P_{ow} = 4$

Odbery rýb	Harmonogram odberov		Počet vzoriek vody	Počet rýb na vzorku
	Minimálna požadovaná častosť odberov (dni)	Prídavné odbery		
Vychytávací fáza	-1 0		20 (*) 2	Pridať 45 až 30 rýb
Prvý	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
Druhý	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
Tretí	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
Štvrtý	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
Piaty	4,7		2	6
Depuračná fáza				Preniesť ryby do vody bez testovanej látky
Šiesty	5,0	5,3		4 (4)
Siedmy	5,9	7,0		4 (4)
Ôsmv	9,3	11,2		4 (4)
Deviaty	14,0	17,5		6 (4)

(*) Vodu odoberajte až po pridaní najmenej „troch objemov testovacej komory“.

Čísla v zátvorkách udávajú počet vzoriek (vody, rýb), ktoré sa majú odobrať v prípade dodatočného odoberania vzoriek.

Pozn.: Vopred odhadnutá hodnota k_2 pre látky s $\log P_{ow} = 4$ je $0,652 \text{ dňa}^{-1}$. Celkové trvanie pokusu je $3 \times$ fázy vychytávania: $3 \times 4,6$ dňa, t. j. 14 dní. Spôsob odhadu „fázy vychytávania“ je uvedený v dodatku 3.

DODATOK 5

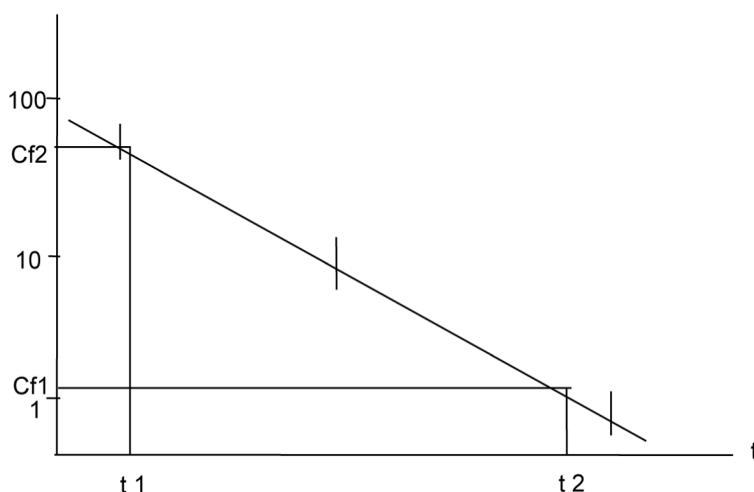
Rozlišovacia schopnosť modelu

Pri väčšine biokoncentračných údajov sa predpokladá, že sú „dostatočne uspokojivo“ opísané pomocou dvojdielného/dvojparametrového modelu, ktorý vyplýva z priamky udávajúcej koncentrácie testovanej látky v rybách počas depuračnej fázy, keď sa graficky znázorňujú na semilogaritmickom papieri. (Ak nemožno tieto body opísať priamkou, potom treba použiť komplexnejšie modely; pozri napríklad v Spacie a Hamelink odkaz 1 v dodatku 3.)

Grafická metóda na stanovenie rýchlostnej konštanty depurácie (eliminácie) k_2

Vyneste koncentráciu testovanej látky zistenú v každej rybej vzorke proti času na semilogaritmickom papieri. Sklon krivky je:

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1} / C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Treba si uvedomiť, že odchýlky od priamkového priebehu môžu poukazovať na komplexnejší priebeh depurácie ako ten, ktorý podlieha kinetike prvého poriadku. Na riešenie priebehu depurácie podliehajúcej kinetike nie prvého poriadku môže byť potrebné použitie grafickej metódy.

Grafická metóda na stanovenie konštanty vychytávania k_1

Hodnota k_1 sa na základe známej hodnoty k_2 vypočíta takto:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad (\text{rovnica 1})$$

Hodnota C_f sa odčíta v strede hladkej vychytávacej priamky získanej z údajov vynesím dekadického logaritmu koncentrácie proti času (v aritmetickej mierke).

Počítačová metóda na výpočet rýchlostných konštánt vychytávania a depurácie

Prednostnou metódou na stanovovanie biokoncentračného faktora a oboch rýchlostných konštánt k_1 a k_2 sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača. Tieto programy vypočítavajú hodnoty pre k_1 a k_2 na základe známych po sebe idúcich koncentrácií v čase a podľa tohto modelu:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{rovnica 2})$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2t}) \quad t < t_c \quad (\text{rovnica 3})$$

kde t_c = čas na konci vychytávacej fázy.

Takýmto prístupom možno získať odhady štandardných odchýlok k_1 a k_2 .

Hodnotu k_2 možno vo väčšine prípadov stanoviť na základe depuračnej krivky s veľkou presnosťou a medzi k_1 a k_2 existuje silná korelácia, ak sa stanovujú súčasne. Odporúčame preto, aby sa najprv vypočítala na základe iba depuračných údajov hodnota k_2 a potom možno pomocou nelineárnej regresnej analýzy vypočítať k_1 .

C.14. RASTOVÝ TEST MLÁDAT RÝB

1. METÓDA

Táto testovacia metóda vplyvu toxicity na rast rýb je totožná s metódou OECD TG 215 (2000).

1.1. ÚVOD

Tento test je určený na odhadnutie účinkov predĺženého pôsobenia chemických látok na rast mláďat rýb. Vychádza z metódy, ktorá bola vyvinutá a podrobená skupinovým testom (1) (2) v rámci Európskej únie, používa sa na odhadnutie účinkov chemických látok na rast mláďat pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) za prietočných podmienok. Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy. K dispozícii sú napríklad kúsenosti z rastových testov pre zebričky (*Danio rerio*)⁽¹⁾ (3), (4) a ryžové rybky ((medaka, *Oryzias latipes*) (6) (7) (8).

Pozri všeobecný úvod časť C.

1.2. DEFINÍCIE

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia látky, pri ktorej je pozorované, že má významný účinok ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Všetky skúšobné koncentrácie vyššie ako LOEC musia mať škodlivé účinky rovnaké alebo vyššie než účinky pozorované pri LOEC.

Nezistená účinná koncentrácia (NOEC): je testovaná koncentrácia hneď pod LOEC.

EC_x: v tejto skúšobnej metóde je to koncentrácia testovanej látky, ktorá spôsobila x % zmenu v raste rýb, ak sa porovnajú s kontrolnou skupinou.

Nasadené množstvo: je mokrá hmotnosť rýb na objem vody.

Chovná hustota: je počet rýb na objem vody.

Špecifická rastová miera individuálnej ryby: vyjadruje mieru rastu jedného individua, založenú na jeho počiatočnej hmotnosti.

Priemerná špecifická rastová miera v nádrži: vyjadruje význam miery rastu pre populáciu v nádrži pri jednej koncentrácii.

Pseudošpecifická miera rastu: vyjadruje individuálnu mieru rastu porovnaním s počiatočnou hmotnosťou populácie v nádrži.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Mláďatá rýb v exponenciálnej fáze rastu sa po ich zvážení umiestnia do testovacích komôr a sú vystavené účinkom testovanej látky, rozpustenej vo vode v rôznych subletálnych koncentráciách, najlepšie pri prietočných podmienkach, alebo ak to nie je možné, pri vhodných semistatických podmienkach. Doba testu je 28 dní. Ryby sa krmia denne. Dávka potravy závisí od počiatočnej hmotnosti ryby a prepočítava sa po 14-tich dňoch. Na konci testu sa ryby odvážia znovu. Vplyvy na mieru rastu sa analyzujú použitím regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá môže spôsobiť x-percentnú odchýlku v miere rastu, t. j. EC_x (napr. EC₁₀, EC₂₀ alebo EC₃₀). Údaje sa môžu porovnať s kontrolnými hodnotami, a tým sa stanoví najnižšia zistená efektívna koncentrácia (LOEC) a odtiaľ nezistená efektívna (účinná) koncentrácia (NOEC).

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LATKE

Výsledky testov akútnej toxicity (pozri testovaciu metódu C.1.) prevedených najlepšie s druhmi vybratými na tento test by mali byť dostupné. Z toho vyplýva, že rozpustnosť vo vode a tlak pár testovanej látky je známy a že je dostupná spoľahlivá analytická metóda na kvantitatívne stanovenie testovanej látky v testovanom roztoku a tiež sa dá stanoviť rozpätie údajov o presnosti.

⁽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.

Užitočné sú informácie ako štruktúrny vzorec, čistota látky, stabilita vo vode a na svetle pK_a (disociačná konštanta), P_{ow} (rozdeľovací koeficient v systéme oktanol-voda), výsledky z testov biodegradability (pozri testovacia metóda C.4.).

1.5. PLATNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

Pre platnosť testu je potrebné uplatňovať nasledujúce podmienky:

- mortalita v kontrolných skupinách nesmie presiahnuť 10 % na konci testu,
- hmotnosť rýb v kontrolnej skupine musí dostatočne narásť, aby umožnila detekcie minimálnej odchýlky v miere rastu, ktorá je považovaná za významnú. Kruhový test (2) ukázal, že pre dúhového pstruha musí hmotnosť v kontrolnej vzorke vzrásť najmenej o polovicu (t. j. 50 %) z ich počiatočnej hmotnosti za 28 dní napr. počiatočná hmotnosť 1g/ryba (= 100 %), konečná hmotnosť po 28 dňoch: > 1,5 g/ryba (> 150 %),
- koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť najmenej 60 % saturačnej hodnoty vzduchom (ASV) počas testu,
- teplota vody sa môže líšiť nie viac ako ± 1 °C medzi testovacími komorami v danom čase testu a mala by byť udržiavaná v rozsahu 2 °C v teplotných rozsahoch špecifikovaných pre testovaný druh (dodatok 1).

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Zariadenie

Obvyklé laboratórne vybavenie a nasledujúce špeciálne zariadenie:

- zariadenie na meranie kyslíka a pH meter,
- zariadenie na stanovenie tvrdosti vody a alkality,
- vhodné prístroje na kontrolu teploty a kontinuálne monitorovanie,
- nádrže z chemicky inertných materiálov a vhodnej kapacity v súvislosti na odporúčenú násadu a sieťovú hustotu (pozri odsek 1.8.5. a dodatok 1),
- vhodné presné váhy (t. j. presnosť do $\pm 0,5$ %).

1.6.2. Voda

Použiteľná voda na test je každá voda, v ktorej testovaný druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Musí mať konštantnú kvalitu počas celého testu. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas daného testu môže byť v rozsahu $\pm 0,5$ pH jednotky. Odporúčená tvrdosť vody je 140 mg/l (ako CaCO_3). Aby sa zaistilo, že voda používaná ako rozpúšťadlo nebude mať prílišný vplyv na výsledky testu (napr. tvorbu komplexu testovanej látky), vzorky sa odoberajú v intervaloch počas analýzy. Ak je známe, že voda má relatívne konštantnú kvalitu, zistenie ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a kationov (napr. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO_4), pesticídov (napr. celkové organofosforečné a organochlórové pesticídy) celkového organického uhlíka, suspendovaných látok sa vykonáva napr. každé tri mesiace. Ak sa potvrdilo, že kvalita vody je stabilná najmenej počas jedného roka, zistenia sa nemusia vykonávať tak často a intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každý šiesty mesiac). Niektoré chemické vlastnosti pre vodu určenú na rozpúšťanie sú v zozname v dodatku 2.

1.6.3. Testované roztoky

Testovacie roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobného roztoku.

Zásobný roztok má byť pripravený jednoduchým miešaním alebo trepaním testovanej látky v riediacej vode mechanickým prostriedkom (napr. miešaním alebo ultrazvukom). Nasycovanie kolón sa môže využiť na docelenie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov.

Použitie rozpúšťadiel alebo látok zlepšujúcich rozpustnosť sa môže vyžadovať v niektorých prípadoch, aby sa zabezpečila príprava vhodne koncentrovaných zásobných roztokov. Vhodnými rozpúšťadlami sú napr. acetón, etanol, metanol, dimetyl sulfoxid, dimetylformamid a tritylénglykol. Príklady vhodných dispergentov sú Cremophor RH 40, Tween 80, Methycellulose 0,01 % a HCO-40. Ak sa používajú ľahko biodegradovateľné reagenty (napr. acetón) a/alebo vysoko prchavé zlúčeniny, tieto môžu spôsobiť problémy v stavbe baktérií v prietochných testoch. Ak sa použijú látky zvyšujúce rozpustnosť, nesmú mať žiadny signifikantný účinok na rast rýb alebo viditeľné škodlivé účinky na mláďatá, ako by sa preukázali iba pri kontrole rozpúšťadla (napr. meracia pumpa, proporcionálny zmiešavač, saturačný systém).

Na prietochné testy sa vyžaduje systém, ktorý kontinuálne rozdeľuje zásobný roztok testovanej látky a dodáva ho do testovacích komôr. Prietoky zásobných roztokov a vody na riedenie sa kontrolujú v časových intervaloch, najlepšie denne počas trvania testu a nesmú sa meniť viac ako 10 %. Kruhový test (2) preukázal, že pre pstruha dúhového je postačujúca frekvencia výmeny vody počas testu 6 litrov/g hmotnosti ryby/deň (pozri odsek 1.8.2.2.).

Pre semi-statické testy bude frekvencia výmeny prostredia závisieť od stability testovanej látky, ale odporúča sa denne vymieňať vodu. Ak predbežný test stability preukázal, že koncentrácia testovanej látky nie je stabilná počas periódy obnovy (t. j. je mimo rozsahu 80 – 120 % nominálnej koncentrácie alebo pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie), je treba vziať do úvahy použitie prietochného testu.

1.6.4. Výber druhov

Pstruh dúhový (*Oncorhynchus mykiss*) je odporúčaným druhom na tento test odvtedy, čo sa v skupinových testoch získalo dostatočné množstvo skúseností s týmto druhom (1), (2). Môžu sa však použiť aj iné zdokumentované druhy, ale postupy pri testovaní sa musia prispôbiť tak, aby sa dosiahli vyhovujúce podmienky testu napr. aj pre zebričku (*Danio rerio*) (3), (4) a ryžovú rybkú (*Oryzias latipes*) (5), (6), (7) sú tieto skúsenosti dostatočné. Je potrebné uviesť odôvodnenie na výber druhov rýb a na výber experimentálnej metódy.

1.6.5. Chov rýb

Testované ryby sa budú vyberať z populácie jednej zásoby, najlepšie z rovnakého potera (íkier), ktorý bol držaný najmenej dva týždne pred testom v podobných podmienkach vody a osvetlenia. Musia byť kŕmené dávkou potravy, ktorá sa rovná minimálne 2 % z telesnej hmotnosti ryby na deň a optimálna dávka vo výške 4 % z telesnej hmotnosti ryby na deň v období skladovania a počas testu.

V nasledujúcom 48-hodinovom nastavovacom období je zaznamenávaná mortalita a uplatňujú sa nasledujúce kritériá:

- mortalita vyššia ako 10 % populácie po siedmich dňoch, zamietne sa celá vsádka,
- mortalita medzi 5 % a 10 % z populácie, aklimatizácia ďalších sedem dní, ak je mortalita viac ako 5 % počas druhých siedmich dní, zamietne sa celá vsádka,
- mortalita je menej ako 5 % z populácie po siedmich dňoch, vsádka sa akceptuje.

Ryby nemajú byť vystavené chorobám počas dvoch týždňov predchádzajúcich testu alebo počas testu.

1.7. KONCEPCIA TESTU

Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádrží v každej koncentračnej hladine a počet rýb v každej nádrži. Ideálne je vyberať koncepciu s ohľadom na:

- objekt štúdie,
- metódu štatistickej analýzy, ktorá bude použitá,
- dostupnosť a cenu experimentálnych zdrojov.

Ak je to možné, stav objektu by mal špecifikovať štatistickú váhu, kde daná veľkosť diferencie (napr. miera rastu) a detekcia sa vyžaduje alebo alternatívne sa vyžaduje odhad EC_x (napr. s $x = 10, 20$ alebo 30 , najlepšie na menej ako 10). Bez toho nemôže byť daný nemenný predpis o veľkosti štúdie.

Je dôležité vziať na vedomie, že usporiadanie, ktoré je optimálne (najlepšie využíva prostriedky) pri použití jednej metódy štatistickej analýzy, nie je nutne optimálne pre inú metódu. Doporučené usporiadanie pre odhad LOEC/NOEC teda nebýva rovnaké ako usporiadanie pre analýzu regresii.

V mnohých prípadoch sa regresnej analýze dáva prednosť pred analýzou rozptylu, a to z dôvodov diskutovaných Stephanom a Rogersom (8). Ak sa však nenájde vhodný regresný model ($r^2 < 0,9$), malo by sa použiť stanovenie NOEC/LOEC.

1.7.1. Koncepcia regresnej analýzy

Dôležité predpoklady na koncepciu regresnej analýzy sú:

- Účinná koncentrácia (napr. $EC_{10, 20, 30}$) a koncentračný rozsah testovanej látky, v ktorom nás zaujímajú jej účinky, a ktoré sa merajú koncentraciami zahrnutými do testu. Ak je efektívna koncentrácia v strede rozsahu testovaných koncentrácií, potom bude presnosť, s ktorou budú vykonané odhady účinných koncentrácií, najvyššia. Pri výbere vhodných testovacích koncentrácií môže byť nápomocný predbežný test na zistenie rozsahu.
- Aby sa umožnilo uspokojivé štatistické vytvorenie modelu, test by mal zahŕňať najmenej jednu kontrolnú nádrž a päť ďalších nádrží pri rôznych koncentráciách. Ak sa použila látka, ktorá zvyšuje rozpustnosť, okrem testovaných sérií je potrebné otestovať jednu kontrolnú nádrž, obsahujúcu látku zvyšujúcu rozpustnosť v najvyššej testovanej koncentrácii, ak je to možné (pozri odsek 1.8.3 a 1.8.4).
- Je potrebné použiť vhodné geometrické alebo logaritmické rady (9) (pozri dodatok 3). Preferuje sa logaritmický odstup medzi testovanými koncentraciami.
- Ak je k dispozícii viac ako 6 nádrží, každá z nich by mala byť použitá, aby sa získali opakovania alebo distribúcia cez koncentračný rozsah, aby sa umožnilo uzatvorenie hladín. Požaduje sa jedno aj druhé z týchto meraní.

1.7.2. Koncepcia odhadu NOEC/LOEC za použitia analýzy odchýlok

Na každú koncentráciu je najvhodnejšie mať niekoľkonásobné nádrže a štatistická analýza sa vykonáva na úrovni nádrže (10). Bez paralelných nádrží nemôže byť uvoľnený žiaden rozptyl na odchýlku medzi nádržami pre jednotlivé ryby. Avšak skúsenosti ukázali (11), že odchýlka medzi nádržami bola veľmi malá v porovnaní s vnútronádržovou (t. j. medzi rybami) v prípade skúšania. Z toho dôvodu je akceptovateľná alternatívna štatistická analýza vykonaná na úrovni jednotlivých rýb.

Obvykle sa používa najmenej päť testovaných koncentrácií v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim hodnotu 3,2.

Vo všeobecnosti, ak sa vykonáva test s niekoľkonásobnými nádržami, počet kontrolných paralelných nádrží a teda aj počet rýb by mal byť dvojnásobok počtu v každej testovanej koncentrácii, ktorý by mal byť rovnaký (12), (13), (14). Na druhej strane, ak sa nepoužili paralelné nádrže, počet rýb v kontrolnej skupine má byť rovnaký ako počet v každej testovanej koncentrácii.

Ak ANOVA vychádza z nádrží uprednostnených pred jednotlivými rybami, [ktoré môžu mať za následok buď individuálnu klasifikáciu, alebo použitie „pseudo“ špecifickej miery rastu (pozri odsek 21.2.)], je potrebné mať dostatočný počet niekoľkonásobných nádrží, aby bolo možné stanoviť štandardnú odchýlku nádrží v rámci koncentrácie. To znamená, že stupne voľe na chyby v analýze odchýlok by mali byť rovné najmenej 5 (10). Ak sú opakované iba kontrolné skupiny, hrozí nebezpečenstvo, že chyba premenlivosti (variability) bude

ovplyvnená, pretože sa môže zvýšiť s veľkosťou hodnoty miery rastu. Keďže miera rastu pravdepodobne poklesne so vzrastajúcou koncentráciou, bude to mať za následok tendenciu nadhodnocovať spomínanú variabilitu.

1.8. POSTUP

1.8.1. Výber a váženie testovaných rýb

Je dôležité minimalizovať odchýlku v hmotnosti rýb hneď na začiatku testu. Vhodné rozmedzie veľkostí na rôzne odporúčené druhy rýb na tento test sú dané v dodatku 1. Pre celú skupinu rýb použitých v teste by sa mal rozsah individuálnych hmotností na začiatku štartu udržiavať v optimálnom stave $\pm 10\%$ aritmetického priemeru hmotnosti a v žiadnom prípade nemôže prekročiť 25 %. Odporúča sa odvážiť aj vedľajšiu vzorku rýb pred testom, aby sa mohla odhadnúť priemerná hmotnosť.

Zásobná populácia nedostane potravu 24 hodín pred začiatkom testu. Ryby sa potom vyberajú náhodne. Po použití obvyklého anestetika [napr. vodný roztok 100 mg/l tricaine metán sulfonátu (MS 222) neutralizovaného pridaním dvoch dielov bikarbonátu sodného na jeden diel MS 222], ryby budú vážené jednotlivo ako mokrá hmotnosť (vytreté do sucha) s presnosťou danou v dodatku 1. Ryby s hmotnosťou v naplánovanom rozsahu sa ponechajú a potom náhodne rozdelia do testovacích nádob. Je potrebné zaznamenať celkovú mokrá hmotnosť rýb v testovacej nádobe. Použité anestetiká, ako aj manipulácia s rybami (vrátane otierania a váženia) môžu spôsobiť stres a poškodenie mláďat rýb, predovšetkým tých druhov, ktoré sú malých rozmerov. Z tohto dôvodu sa musí manipulácia s mláďatami rýb vykonávať s najväčšou možnou opatrnosťou, aby sa neprivodil stres a poškodenie testovaných zvierat.

Ryby sa opätovne odvážia po 28 dňoch testu (pozri odsek 1.8.6). Ak sa však nazdávame, že je potrebné znova vypočítať dávky krmiva, ryby sa odvážia znovu na 14. deň testu (pozri odsek 1.8.2.3). Na stanovenie zmien vo veľkosti rýb sa môže použiť aj iná metóda, napríklad fotografická, na základe ktorej sa môže regulovať dávka potravy.

1.8.2. Podmienky expozície

1.8.2.1. Trvanie

Test trvá ≥ 28 dní.

1.8.2.2. Nasadené množstvo a chovná hustota

Je dôležité, aby nasadené množstvo a chovná hustota boli vhodné na použitý testovaný druh (pozri dodatok 1). Ak je chovná hustota príliš vysoká, stres z nahustenia môže privodiť zníženie miery rastu a chorobnosť násady. Ak je príliš nízka, teritoriálne správanie dokáže ovplyvňovať rast. V každom prípade by nasadené množstvo malo byť dostatočne nízke, aby sa dosiahla koncentrácia rozpustného kyslíka najmenej 60 % AS V bez použitia prevzdušňovača. Skupinové testy (2) ukázali, že u pstruha dúhového je prípustné nasadenie množstva 16 pstruhov o hmotnosti 3 – 5 g v objeme 40 l. Odporúčaná frekvencia výmeny vody počas testu je 6 l/g na telesnú hmotnosť ryby/deň.

1.8.2.3. Kŕmenie

Ryby sa budú kŕmiť vhodnou potravou (dodatok 1), a to v dostatočnom množstve, aby sa vyvolala akceptovateľná miera rastu. Treba dbať na to, aby sa neprivodil rast mikroorganizmov alebo zákal vody. U pstruha dúhového je množstvo 4 % z ich telesnej hmotnosti na deň vhodná dávka spĺňajúca tieto podmienky (2), (15), (16), (17). Denná dávka môže byť rozdelená do dvoch porcií a dáva sa rybám v dvoch kŕmeniach za deň, oddelene, najmenej po piatich hodinách. Dávka závisí od počiatočnej celkovej hmotnosti rýb v každej testovacej nádobe. Ak sú ryby znovu vážené v 14-ty deň, dávka sa potom prepočíta. 24 hodín pred vážením sa ryby nekŕmia.

Nezjedená potrava a fekálny materiál sa odstraňujú z testovacích nádob každý deň, dôkladne sa vyčistí dno každej nádoby pomocou odsávania.

1.8.2.4. Svetlo a teplota

Fotoperiód a teplota vody by mali byť vhodné pre testovacie druhy (dodatok 1).

1.8.3. Testované koncentrácie

Bežne sa vyžaduje 5 rôznych koncentrácií testovanej látky, podľa variácie koncepcie testu (pozri odsek 1.7.2). Prvotné znalosti o toxicite testovanej látky (napr. z testu akútnej toxicity a/alebo zo štúdií ohľadom rozsahu nálezov) môžu napomôcť pri výbere vhodných testovacích koncentrácií. Ak sa použije menej ako päť koncentrácií, je to potrebné odôvodniť. Najvyššia testovaná koncentrácia by nemala presiahnuť hranicu rozpustnosti testovanej látky vo vode.

Ak sa pri príprave zásaditého roztoku použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť testovanej látky, jeho konečná koncentrácia nebude vyššia ako 0,1 ml/l a najvhodnejšie je, ak je rovnaká vo všetkých testovacích nádobách (pozri odsek 1.6.3). Je potrebné však urobiť všetko pre to, aby sme sa vyhli použitiu týchto materiálov.

1.8.4. Kontroly

Počet kontrol vodných roztokov závisí od koncepcie testu (pozri odsek 1.7. – 1.7.2.). Ak použijeme rozpustnú chemickú látku, potom je potrebné vykonať aj rovnaký počet jej kontrol, tak ako aj počet kontrol vodných roztokov.

1.8.5. Frekvencia analytických stanovení a meraní

Koncentrácia testovanej látky sa počas testu stanovuje v pravidelných intervaloch (pozri dole).

V prietočných testoch by sa mali kontrolovať prietoky zriedovadla a zásadného roztoku toxikkej látky v intervaloch, najlepšie denne a nemali by sa počas testu meniť viac ako o 10 %. Kde sú predpokladané koncentrácie testovanej látky v rozsahu do ± 20 % nominálnych hodnôt (t. j. v rozmedzí od 80 – 120 %, pozri odsek 1.6.2 a 1.6.3), odporúča sa minimálne analyzovať najvyššie a najnižšie testované koncentrácie na začiatku testu a potom následne v týždenných intervaloch. Pri teste, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane do ± 20 % nominálu (na základe údajov o stabilite testovanej látky), je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie, ale podľa rovnakého režimu.

V semistatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % nominálnej hodnoty, čo je odporúčané ako minimálna koncentrácia, najvyššie a najnižšie testované koncentrácie sa analyzujú ak sú čerstvo pripravené a ihneď pred výmenou na začiatku štúdie a potom v týždenných intervaloch. V testoch, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % nominálnej koncentrácie, všetky testované koncentrácie musia byť analyzované podľa rovnakého režimu ako stabilizujúce látky.

Odporúča sa, aby výsledky boli založené na meraných koncentráciách. Ak je však z evidencie preukázateľné, že koncentrácia testovanej látky v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v ± 20 % nominálu alebo nameranej počiatočnej koncentrácie počas testu, potom môžu výsledky vychádzať z nominálnej koncentrácie alebo nameranej hodnoty.

Vzorky je potrebné filtrovať (napr. použitý filter s veľkosťou pórov 0,45 μ m) alebo odstredovať. Odstredovanie je odporúčený postup. Ak sa však testovaný materiál neabsorbuje na filtri, filtrácia je tiež akceptovateľná.

Vo všetkých testovacích nádobách sa musí počas testu merať rozpustený kyslík, pH a teplota. Celkovú tvrdosť vody, alkalitu a salinitu (ak je podstatná) je potrebné merať v kontrolných nádobách a v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou testovanej látky. Minimálne sa však musí merať 3-krát: rozpustný kyslík a sollicita (ak je dôležitá), a to na začiatku, v strede a na konci testu. V semistatických testoch sa odporúča, aby sa rozpustný kyslík meral častejšie, najlepšie pred a po každej výmene vody alebo najmenej raz za týždeň. Hodnota pH sa meria na začiatku a po každej výmene vody v statickom obnovovacom teste, a to týždenne v prietočnom teste. Tvrdosť vody a alkalita sa meria raz počas testu. Teplota sa monitoruje kontinuálne aspoň v jednej testovacej nádobe.

1.8.6. Pozorovania

Hmotnosť: na konci testu všetky prežívajúce ryby musia byť odvážené ako mokrá hmotnosť (trené do sucha) jednak v skupinách v testovacej nádobe alebo individuálne. Váženie zvierat v testovacej nádobe sa preferuje pred individuálnym vážením rýb, ktoré si vyžaduje, aby ryby boli jednotlivo označené. V prípade váženia jednotlivcov, stanovenie špecifickej miery rastu pre jednotlivé ryby, vybratá technika označovania, môžu spôsobiť stres zvierat (alternatívne označovanie mrazením je vhodné, napr. použitie farebnej jemnej rybárskej linky).

Ryby sa kontrolujú denne počas testovacieho obdobia a všetky vonkajšie abnormality (ako napr. krvácanie, odfarbenie) a abnormálne správanie, sa zaznamenávajú. Každý úhyn musí byť zapísaný a uhynutá ryba musí byť odstránená tak rýchlo, ako je to možné. Mŕtve ryby sa nenahrádzajú, nasadené množstvo (sádka), hustota chovu sú dostatočné, aby spôsobili vplyv na rast cez zmeny v počte rýb na nádrž. Musí sa však upraviť dávka potravy.

2. ÚDAJE A SPRÁVA

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Odporúča sa, aby sa štatistika zahrnula aj do návrhu aj do analýzy testu, keďže táto testovacia metóda pripúšťa opodstatnené variácie v návrhu experimentu (ako napr. v počte testovacích komôr, v počte testovaných koncentrácií, v počte rýb atď.). Z pohľadu možností prípustných v návrhu testu nie je daný presný postup na štatistickú procedúru.

Miera rastu sa nedá vypočítať pre nádobu, v ktorej úmrtnosť dosiahla 10 %. Mieru úmrtnosti je však možné indikovať na všetky stupne koncentrácie.

Bez ohľadu na to, ktorá metóda na analýzu údajov sa použije, najdôležitejším pojmom je špecifická miera rastu medzi časom t_1 a časom t_2 . Môže sa definovať viacerými spôsobmi v závislosti na tom, či venujeme pozornosť jednotlivým rybám alebo nie, alebo či sa požaduje priemer z nádrže.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kde:

r_1 = individuálna špecifická miera rastu ryby

r_2 = priemerná špecifická miera rastu pre nádrž

r_3 = „pseudo“ špecifická miera rastu

w_1, w_2 = hmotnosti jednej ryby v čase t_1 a t_2 , jednotlivo

$\log_e w_1$ = dekadický logaritmus individuálnej hmotnosti ryby na začiatku štúdie

$\log_e W_2$ = dekadický logaritmus individuálnej hmotnosti ryby na konci štúdie

$\log_e w_1$ = priemerná hodnota dekadického logaritmu z hodnoty w_1 pre rybu v nádrži na začiatku štúdie

$\log_e W_2$ = priemerná hodnota dekadického logaritmu z hodnoty w_2 pre rybu v nádrži na konci štúdie

t_1, t_2 = čas (dni) štart a koniec štúdie

r_1, r_2, r_3 môžu byť vypočítané pre 0 – 28-dňové obdobie a kde je to vhodné (t. j. ak bolo meranie vykonané v 14. dni) na 0 – 14 a 14 – 28 dní periód.

2.1.1. Regresná analýza výsledkov (modelovanie závislosti koncentrácie)

Táto analytická metóda zavádza vhodné matematické vzťahy medzi špecifickou mierou rastu a koncentráciou, a teda umožňuje odhad „EC_x“ t. j. akejkolvek požadovanej EC hodnoty. Použitie tejto metódy na výpočet r pre jednotlivú rybu (r_1) nie je potrebné a namiesto toho analýza môže vychádzať z priemernej hodnoty pre nádrž r (r_2). Uprednostňuje sa použitie poslednej metódy. Je taktiež vhodnejšia v prípade menších druhov rýb.

Špecifická priemerná miera rastu pre nádrž (r_2) môže byť graficky znázornená oproti koncentrácií, aby sa zistil vzťah koncentračnej odozvy.

Pre vyjadrenie vzťahu medzi r_2 a koncentráciou je potrebné vybrať model a výber musí byť podložený patričným zdôvodnením.

Ak počet rýb, ktoré prežili do konca testu, nie je rovnaký v každej nádrži, potom proces zavádzania modelu, či jednoduchého alebo nelineárneho, musí byť vážený, aby pripúšťal nerovnakú veľkosť skupín.

Metóda zavádzania modelu musí umožňovať odhad, napríklad EC_{20} alebo jej rozptyl/štandardná odchýlka alebo interval spoľahlivosti/, aby sa dali tieto odvodiť. Graf vybraného modelu by mal ukazovať, či je model primeraný (8), (18), (19), (20).

2.1.2. Analýza výsledkov pre odhad LOEC

Ak test zahŕňa kópie/repliky/nádrže, odhad LOEC môže vychádzať z analýzy odchýlok (ANOVA) špecifickej miery rastu pre nádrž (pozri odsek 2.1), podľa vhodnej metódy [napr. Dunnettov alebo Williamsov test (12), (13), (14), (21)] porovnávajúci priemernú hodnotu na každú koncentráciu s priemernou hodnotou na kontrolu nádrže, aby sa zistila najnižšia koncentrácia, pre ktorú je odchýlka významná pri hodnote 0,05 stupňa pravdepodobnosti. Ak sa požadované predpoklady parametrických metód nezhodujú, použije sa netypická distribúcia (napr. Shapiro-Wilkov test) alebo heterogénna odchýlka (Barlettov test) na transformovanie údajov na homogénnu odchýlku, a to prednostne pred vykonaním ANOVA alebo váženým ANOVA testom.

Ak test neobsahuje paralelné nádrže pre každú koncentráciu, ANOVA vychádzajúca z nádrží bude necitlivá alebo nemožná. V tejto situácii je akceptovateľným kompromisom ANOVA, vychádzajúca z „pseudo“ špecifickej miery rastu r_3 pre jednotlivé ryby.

Priemerná hodnota r_3 na každú testovanú koncentráciu sa môže potom porovnávať s priemernou hodnotou r_3 na kontrolné nádrže a LOEC sa môže identifikovať rovnako ako v predchádzajúcom prípade. Musí byť jasné, že táto metóda neposkytuje žiadnu dovolenú odchýlku alebo ochranu voči premenlivosti medzi nádržami, okrem tej, ktorá bola vypočítaná na premenlivosť medzi jednotlivými rybami. Skúsenosti (8) však ukázali, že premenlivosť medzi nádržami je veľmi malá v porovnaní s variabilitou v rámci nádrže (t. j. medzi jednotlivými rybami). Ak nie sú do analýzy zahrnuté jednotlivé ryby, je potrebné zdôvodniť použitie metódy vonkajšej identifikácie.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Výsledky sa musia interpretovať opatrne, ak namerané koncentrácie jedovatých látok v testovaných rozsahoch dosahujú úrovne blízke detekčným limitom analytickej metódy alebo v semistatických testoch, kde koncentrácia testovanej látky klesá medzi koncentráciou v čerstvo pripravenom roztoku a koncentráciou pred výmenou roztoku.

2.3. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.3.1. Testovaná látka

- fyzikálne vlastnosti a závažné fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné údaje chemickej látky zahrňujúce čistotu a analytickú metódu na kvantitatívne stanovenie testovanej látky, ak je to vhodné.

2.3.2. Testované druhy

- podľa možnosti vedecký názov,
- rod, veľkosť, dodávateľ, možná predpríprava atď.,

2.3.3. Podmienky testu

- používaná testovacia metóda (napr. semistatická/obnovovacia, prietočná, nakladanie, chovná hustota atď.),
- koncepcia testu (napr. počet testovacích nádob, testované koncentrácie a paralelné stanovenie, počet rýb v nádrži),

- metóda prípravy zásobného roztoku a frekvencia obnovy (ak bolo použité činidlo rozpustnosti, jeho koncentrácia musí byť daná),
- nominálna testovaná koncentrácia, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli tieto hodnoty získané a dôkaz o tom, že merania zodpovedajú koncentráciám testovanej látky v skutočnom roztoku,
- charakteristiky vody použitej na riedenie: pH, tvrdosť, alkalita, teplota, rozpustný kyslík, reziduálny chlór, ak bol stanovený celkový organicky viazaný uhlík, suspendované látky, salinita (obsah solí) z testu prostredia (ak bola stanovená) a iné vykonané merania,
- kvalita vody v testovacích nádržiach: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpustného kyslíka,
- podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy/zdroj, dávované množstvo a frekvencia)

2.3.4. Výsledky

- dôkaz, že kontrolné nádrže splnili kritériá validity prežívania a údaje o úmrtnosti vyskytujúcej sa pri niektorej z testovaných koncentrácií;
- používané štatistické analytické techniky, štatistiky vychádzajúce z počtu paralelných stanovení alebo na jednotlivých rybách, spracovanie dát a odôvodnenie použitia danej techniky;
- údaje v tabuľkovej forme na jednotlivú a priemernú hmotnosť rýb v dňoch 0, 14 (ak merané) a 28 hodnôt v priemere na nádrž alebo hodnoty „pseudo“ špecifickej miery rastu (ak je to vhodné) počas obdobia 0. – 28. dňa alebo ak je to možné na 0. – 14. a 14.– 28. deň;
- výsledky štatistickej analýzy (t. j. regresnej analýzy alebo ANOVA), najlepšie v tabuľkovej alebo grafickej forme a LOEC ($p = 0,05$) a NOEC alebo EC_x so štandardnými chybami;
- rozsah neobvyklých reakcií rýb a akékoľvek viditeľné účinky vyvolané testovanou látkou.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

- (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, s. 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, s. 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, s. 157 – 164.
- (5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 28, s. 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, s. 328 – 338.
- (9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 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, s. 1096 – 1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 482 – 491.
- (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, s. 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, s. 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, s. 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 Assessment Center. Sept. 1988. 12 s.
- (21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, s. 510 – 531.

DRUHY RÝB ODPORUČENÝCH NA TESTOVANIE A VHODNÉ PODMIENKY NA VYKONANIE TESTOV

Druh	Odporučený rozsah teplôt pri testoch (°C)	Fotoperiódá (hod.)	Odporúčaný rozsah pre počiatočnú hmotnosť (g)	Požadovaná presnosť merania	Nasadené množstvo (g/l)	Chovná hustota (l)	Potrava	Trvanie testu (dni)
Odporučené druhy: <i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstruh dúhový	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	na 100 mg	1,2 – 2,0	4	sušená lososovitá potrava	≥ 28
Ostatné dobre zdokumentované druhy: <i>Danio rerio</i> Zebrička	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	na 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	živá potrava (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Ryžová rybka (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	na 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	živá potrava (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28

DODATOK 2

NIEKTORÉ CHARAKTERISTIKY VHODNEJ VODY NA RIEDENIE

Látka	Koncentrácie
Látka v časticiach	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Zlúčený uhlík	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

DODATOK 3

Logaritmické série koncentrácií vhodných na test na toxicitu (9)

Stĺpec (číslo koncentrácie medzi 100 a 10 alebo medzi 10 a 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Zo stĺpcov sa dá vybrať päť alebo viac sérií za sebou idúcich koncentrácií. Stredné body medzi koncentraciami v stĺpci x) sa nachádzajú v stĺpci (2x + 1). Uvedené hodnoty predstavujú koncentrácie vyjadrené ako percento na objem alebo hmotnosť (mg/l alebo µg/l). Hodnoty je možné násobiť alebo deliť akoukoľvek mocninou 10 podľa potreby. Hodnoty v stĺpci 1 sa môžu použiť, ak nastala značná neistota ohľadom úrovne toxicity.

C.15. RYBY, KRÁTKODOBÝ TEST TOXICITY NA EMBRYÁCH A VÝVOJOVOM ŠTÁDIU PLODOVÉHO VAKU**1. METÓDA**

Táto testovacia metóda krátkodobého testu toxicity je totožná s metódou OECD TG 212 (1998).

1.1. ÚVOD

Tento test toxicity na rybích embryách a rybách vo vývojovom štádiu plodového vaku – poteru je krátkodobým testom, v ktorom sú vývojové štádiá od čerstvo oplodnených vajíčok po koniec štádia plodového vaku – poteru vystavené účinkom testovanej látky. Rybie embryá a štádiá plodového vaku – poteru sa nekrmia a test má byť ukončený dovtedy, kým sú rybám v štádiu plodového vaku dodávané živiny zo žltkového vaku.

Test je určený na definovanie letálnych účinkov a hraníc subletálnych účinkov chemikálií na vybraté testované vývojové štádiá a druhy rýb. Mal by preto poskytnúť užitočné informácie o tom, či je možné a) nájsť spojitosť medzi letálnymi a subletálnymi testami, b) použiť ho ako screeningový test jednak ako test pre najrannejšie vývojové štádiá alebo ako test chronickej toxicity a c) či je použiteľný pri testovaní druhov tam, kde techniky chovu hospodárenia nie sú dostatočne vyspelé, aby pokryli obdobie zmien od endogénneho k exogénnemu kŕmeniu.

Je potrebné uviesť si, že iba testy spájajúce všetky štádiá životného cyklu rýb sú vo všeobecnosti schopné podať presný odhad chronickej toxicity chemikálií u rýb a že pôsobenie obmedzené akýmkoľvek spôsobom s ohľadom na štádium života môže znižovať citlivosť a zároveň podhodnotiť chronickú toxicitu. Preto možno očakávať, že embryonálny test a test v štádiu plodového vaku – poteru môže byť menej citlivý ako najrannejší test úplne vývojového štádia, predovšetkým s ohľadom na vysoko lipofilné chemikálie ($\log P_{ow} > 4$) a chemikálie so špeciálnymi spôsobmi toxického účinku. Pri chemikáliách s nešpecifickými, narkotickými účinkami sa však môžu očakávať menšie rozdiely v senzitivite medzi dvoma testami (1).

Pred uverejnením testu sa najviac skúseností získalo v testoch na embryonálne štádium a na štádium plodového vaku – poteru u sladkovodných rýb *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – bežný názov zebrafish). Podrobnejší návod na vykonanie testu pre tento druh je uvedený v dodatku 1. Toto však nevyklučuje použitie iných druhov rýb, s ktorými sú tiež skúsenosti (tabuľka 1).

1.2. DEFINÍCIE

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia skúmaná koncentrácia testovanej látky, pri ktorej sa pozoruje signifikantný účinok ($p < 0,05$) pri porovnaní s kontrolnou vzorkou. Všetky testované koncentrácie nad LOEC musia mať však škodlivý vplyv rovnajúci sa alebo väčší ako ten, ktorý bol zistený pri LOEC.

Nezistená účinná koncentrácia (NOEC): je testovaná koncentrácia hneď pod LOEC.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Embryá a vývojové štádium plodového vaku – poteru rýb sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej látky rozpustenej vo vode. V protokole o teste je možný výber medzi semistatickým a prietochným typom postupu. Výber závisí od charakteru testovanej látky. Test začína umiestnením oplodnených vajíčok do testovacej komory a končí práve predtým, ako ktorákoľvek z lariev v ktorejkoľvek testovanej komore komplexne absorbuje žltkový vak alebo pred uhynutím v dôsledku začínajúceho hladovania v kontrolnej komore. Letálne a subletálne účinky sa vyhodnotia a porovnávajú s kontrolnými hodnotami, ak bola stanovená najnižšia zistená účinná koncentrácia alebo sa podrobia analýze použitím regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá môže zapríčiniť daný percentuálny účinok (t. j. LC/EC_x, kde x je definované ako % účinnosti).

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Výsledky aktuálneho testu toxicity, (pozri metóda C.1) najlepšie toho, ktorý bol vykonaný na druhu rýb vybratom na tento test, musia byť k dispozícii. Môžu byť užitočné pri výbere vhodného rozsahu testovaných koncentrácií na test v ranných vývojových štádiách života rýb. Rozpustnosť vo vode (vrátane rozpustnosti v testovanej vode) a tlak pár testovanej látky musia byť známe. Je potrebné mať spoľahlivú analytickú metódu na kvantitatívne stanovenie látky v testovaných roztokoch so známou a uvedenou presnosťou a detekčným limitom.

Informácie o testovanej látke, ktoré sú použité pri stanovení podmienok testu, zahŕňajú štruktúrny vzorec, čistotu látky, svetelnú stabilitu, stabilitu za podmienok testu, pK_a , P_{ow} a výsledky testov na stupeň biodegradability stupeň biologickej odbúrateľnosti (pozri metóda C.4).

1.5. PLATNOSŤ TESTU

Na platnosť testu je potrebné uplatňovať nasledujúce podmienky:

- počet všetkých oplodnených vajíčok, ktoré prežili v kontrolnej nádrži a ak je to dôležité, iba v nádobách s rozpúšťadlom, musí byť väčší alebo rovný limitom definovaným v doplnkoch (2) a (3),
- koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť počas testu v rozmedzí 60 až 100 % z hodnoty saturácie vzduchu (ASV),
- teplota vody sa nesmie meniť viac ako $\pm 1,5$ °C medzi testovanými komorami alebo medzi nasledujúcimi dňami v určitom časovom intervale testu a bude v rozsahu teplôt určených na testované druhy (dodatky 2 a 3).

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.6.1. Testovacie komory**

Môžu sa používať nádoby sklenené alebo z iných chemicky inertných látok. Rozmery nádob musia byť dostatočne veľké, aby boli v súlade s nasadeným množstvom rýb (pozri odsek 1.7.1.2). Odporúča sa umiestniť testovacie nádoby náhodne na testovacej ploche. Náhodný blokový dizajn, v ktorom je každý postup prítomný v každom bloku, je najlepší, aby sa zabezpečil úplne náhodný dizajn, v ktorom sú zahrnuté vplyvy laboratória, takže na kontrole sa môže využiť testovanie po blokoch. Ak použijeme testovanie po blokoch, budú sa brať do úvahy aj následné údaje analýzy. Testované komory sa takto ochránia pred nechcenými vplyvmi.

1.6.2. Výber druhov rýb

Odporúčané druhy rýb sú dané v tabuľke 1A. To ale neobmedzuje použitie aj iných druhov (príklady uvedené v tabuľke 1B), ale testovací postup musí byť prispôbovaný tak, aby poskytoval uspokojivé podmienky testu. V tomto prípade je potrebné zaznamenať dôvody, ktoré viedli k výberu iných druhov a experimentálnych metód.

1.6.3. Chov húfu rýb

Podrobnosti o chovaní rýb počas množenia za vhodných podmienok nájdete v OECD TG 210 ⁽¹⁾ metóde a v použitej literatúre (2), (3), (4), (5), (6).

1.6.4. Manipulácia s embryami a larvami

Embryá a larvy môžu byť vystavené expozícii v malých vyhovujúcich nádobách so sieťovanými stenami, aby sa umožnilo pretekánie testovaného roztoku cez nádobu. Neturbulentný tok cez tieto malé nádoby je zabezpečený ich zavesením na ramene usporiadanom na pohyb nadol a nahor, ktoré však udržuje organizmy ponorené. Je možné použiť systém prietochný – sífónový. Oplodnené vajíčka lososovitých rýb môžu byť udržiavané na krmidlách alebo na sieťovine s dostatočne veľkými okami, aby mohli cez ne po vyľiahnutí prepadnúť. Na premiestňovanie embryí a lariev pri semistatických testoch s kompletnou dennou výmenou (pozri odsek 1.6.6.) vody je vhodné použiť pasteurové pipety.

Ak sa v hlavnej testovacej nádobe na zadržiavanie vajíčok použili kontajnery, mriežky alebo sieťky, potom po vyľiahnutí lariev môžu byť tieto zábrany odstránené [2] s výnimkou, ak mriežky preventívne zabráňujú úniku rýb. Ak je potrebné premiestniť larvy, tieto by nemali byť vystavené vzduchu a nemali by sa používať sieťky na vylovenie rýb z kontajnerov na vajíčka (upozornenie sa netýka menej krehkých druhov rýb, napr. kapra). Načasovanie takéhoto prenosu sa mení v závislosti od druhu rýb a prenos nie je vždy potrebný. Pri semistatickej technike môžeme používať hadičky alebo plytké zásobníky a ak je to nutné, môžu byť vybavené prepážkou zo sieťoviny, nepatrne naddvihnutou nad dnom hadičky. Ak je objem týchto kontajnerov dostatočný, aby vyhovoval požiadavkám pre nasadené množstvo vsádzky (poyri 1.7.1.2), žiaden prenos embryí alebo lariev nebude nutný.

1.6.5. Voda

Každá voda, spĺňajúca chemické charakteristiky na vodu na riedenie tak, ako sú uvedené v zozname v dodatku 4 a v ktorej testované druhy vykazujú kontrolu prežívania najmenej takú dobrú, ako bolo popísané v dodatkoch 2 a 3, je vhodná ako testovacia voda. Voda má mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. Jej pH hodnota by sa mala pohybovať v rozmedzí $\pm 0,5$ jednotiek pH, aby sa zabezpečilo, že riedenie nebude mať neželaný vplyv na výsledky testu/napr. vytváranie komplexov s testovanou látkou/alebo nepriaznivý

⁽¹⁾ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test“.

účinnosť na vyľahnuté zásobné ryby. Vzorky vody na analýzu je potrebné odoberať v určitých intervaloch. Meranie hodnôt ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a kationov (napr. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO₄, pesticídov (napr. celkový obsah organofosforečnanových alebo celkový obsah organochlórovaných pesticídov), celkového organicky viazaného uhlíka v suspendovaných látkach by sa malo vykonávať napr. každé tri mesiace, ak je známe, že zriedňovacia voda má relatívne konštantnú kvalitu. Ak sa preukázalo, že kvalita vody sa upravila najmenej počas jedného roka, merania sa môžu vykonávať menej často a časové intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každých šesť mesiacov).

1.6.6. Testovacie roztoky

Testovacie roztoky vybraných koncentrácií sa pripravujú riedením zásobných roztokov.

Zásobný roztok môže byť pripravený najčastejšie jednoduchým zmiešaním alebo pretrepávaním testovanej látky v zriedňovacej vode mechanickým spôsobom (napr. trepaním alebo ultrazvukom). Saturácia kolón môže byť využitá na dosiahnutie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov. Pokiaľ je to možné, vyhneme sa používaniu rozpúšťadiel a dispergentov (činnidlá zvyšujúce rozpustnosť látok), hoci u niektorých zlúčenín v určitých prípadoch sa to vyžaduje, aby sa pripravil vhodne koncentrovaný zásobný roztok. Príklady vhodných rozpúšťadiel sú acetón, metanol, etanol, dimetylformamid a trichlórmetanol. Príkladmi používaných dispergentov sú Cremophor RH40, Tween 80, mešnilcelulóza 0,01 % a HCO-40. Treba dbať na to, ak sa používajú ľahké činnidlá (napr. acetón) a/alebo veľmi prchavé biologicky odbúrateľné látky, môžu tieto spôsobiť problémy s množením baktérií v prietochných testoch. Ak používané činnidlo zvyšuje rozpustnosť, nesmie mať žiaden signifikantný účinok na prežítie alebo žiaden viditeľný nepriaznivý účinok na rané vývojové štádiá, ako sa to prejavilo v kontrolných nádržiach s rozpúšťadlom. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sme sa vyhli použitiu týchto látok.

Pri semistatických technikách môžu nasledovať dva rôzne postupy obnovy: i) do čistých nádob sa pripravujú nové testovacie roztoky a prežívajúce vajíčka a larvy sa do nich opatrne prenesú v malých objemoch starého roztoku tak, aby sme sa vyhli ich vystaveniu na vzduchu alebo ii) testované organizmy zostanú umiestnené v nádobách, pokiaľ sa časť (najmenej tri štvrtiny) testovanej vody vymení. Frekvencia obnovy prostredia bude závisieť na stabilite testovanej látky, ale odporúča sa denná výmena. Ak z predbežných testov stability (pozri odsek 14) testovanej látky vyplýva, že koncentrácia testovanej látky nie je stála (t. j. mimo rozsahu 80 – 120 % nominálnej koncentrácie alebo poklesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie) počas obnovovacej periódy, je dôležité použiť prietochný test. V tomto prípade je treba dbať na to, aby sme sa vyhli stresovaniu lariev počas výmeny vody.

Pri prietochných testoch, v ktorých je systém kontinuálne vypúšťaný a riedený (napr. dávkovacie meracie pumpy, proporcionálny zriedňovač, saturačný systém), zásobný roztok testovanej látky sa vyžaduje dodávať do testovacích nádrží v sériách koncentrácií. Prietoky zásobných roztokov a zriedňovacej vody treba kontrolovať v určitých časových intervaloch, najlepšie denne a nemá by sa meniť viac ako o 10 % počas testu. Prekročené množstvo ekvivalentného objemu najmenej piatich testovacích komôr za 24 hodín sa pokladá za vyhovujúce (2).

1.7. POSTUP

Užitočné informácie o vykonaní testov toxicity na rybích embryách a v štádiu plodového vaku – poteru sú dostupné v literatúre, niektoré príklady sú zahrnuté do zoznamu použitej literatúry v texte (7), (8), (9).

1.7.1. Podmienky expozície

1.7.1.1. Dĺžka testu

Test je najlepšie začať 30 minút po oplodnení vajíčok. Embryá sa ponoria do testovaného roztoku pred alebo čo najskôr po začatí štádia štiepenia blastodiskov a v žiadnom prípade nie pred započatím štádia gastrulí. Pri vajíčkach od komerčných dodávateľov nie je vhodné začať test ihneď po oplodnení. Ak pozdržanie začiatku testu závažne ovplyvňuje senzibilitu testu, je ho potrebné začať do ôsmich hodín po oplodnení. Ak nie sú larvy kŕmené počas expozície, test treba ukončiť práve predtým, ako žltkové vaky lariev v testovaných komorách boli kompletne absorbované alebo predtým ako začnú hynúť od hladu v kontrolných komorách. Dĺžka testu bude závisieť od použitých druhov. Niektoré odporúčané dĺžky trvania testov sú uvedené v dodatkoch 2 a 3.

1.7.1.2. Nasádzanie

Počet oplodnených vajíčok na začiatku testu musí byť dostatočný na to, aby sa splnili štatistické požiadavky. Rozdeľ sa náhodne, najmenej však po 30 oplodnených vajíčkach, rozdelených rovnako, alebo tak rovnako ako je to možné. Môže byť dosť zložitá získať rovnaké vsádzky, ak použijeme niektoré druhy medzi najmenej tri paralelné testovacie komory na jednu koncentráciu. Nasadené množstvo (biomasa) na objem testovaného roztoku má byť dostatočne nízke, aby sa koncentrácia rozpusteného kyslíka udržiavala na hodnote najmenej

60 % ASV bez prevzdušňovania. Pri prietočných testoch sa odporúča, aby nasadené množstvo neprekročilo 0,5 g/l počas 24 hodín a nesmie nikdy prekročiť množstvo 5 g/l roztoku (2).

1.7.1.3. *Svetlo a teplota*

Fotoperiód a teplota majú byť vhodné na testované druhy (dodatky 2 a 3). Ak chceme monitorovať teplotu, je vhodné použiť ďalšiu testovaciu nádobu.

1.7.2. **Testované koncentrácie**

Obvykle sa vyžaduje päť koncentrácií testovanej látky s odstupom s konštantným faktorom nepresahujúcim 3,2. Pri výbere rozsahu testovaných koncentrácií, je potrebné brať do úvahy krivku vzťahujúcu LC_{50} na dobu expozície v štúdiu akútnej toxicity. Za určitých okolností je vhodné použiť menej ako päť koncentrácií, napr. v limitných testoch a v užších koncentračných intervaloch. Koncentrácia látky vyššia ako 96 hodín LC_{50} alebo 100 mg/l a tá, ktorá z nich je nižšia, nemusí byť testovaná. Látky sa nemali testovať pod ich hranicou rozpustnosti v testovacej vode.

Ak sa použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť, aby napomohlo pri príprave testovaných roztokov (pozri odsek 16.6.), jeho konečná koncentrácia v testovaných nádobách nemá byť vyššia ako 0,1 ml/l a nemala by byť rovnaká vo všetkých testovaných nádobách.

1.7.3. **Kontrola**

Jedna kontrolná nádrž zriedovacej vody (replikát, paralela ak je to možné) a tiež, ak je to dôležité, jedna kontrolná nádrž obsahujúca činidlo zvyšujúce rozpustnosť (replikát, paralela, ak je to možné) sa musí analyzovať v dodatočnej testovacej sérii.

1.7.4. **Frekvencia analytických stanovení a meraní**

Koncentrácie testovanej látky sú stanovené v pravidelných časových intervaloch počas doby testu.

V semistatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia zostane na ± 20 % nominálu (t. j. v rozsahu 80 – 120 %, pozri odseky 1.4 a 1.6.6), čo je odporúčané ako minimálna koncentrácia, najvyššie a najnižšie testované koncentrácie sa analyzujú, ak sú čerstvo pripravené a ihneď po výmene, najmenej trikrát v pravidelných časových odstupoch v priebehu testu (t. j. analýzy by sa mali vykonať na vzorkách z rovnakého roztoku, ak je tento čerstvo pripravený, a to pri výmene).

Pri testoch, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % z nominálu (na základe údajov o stabilite látky), je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie pre čerstvo pripravené a vymenené roztoky, ale podľa rovnakého režimu (t. j. najmenej trikrát v pravidelných časových odstupoch v priebehu testu). Stanovenie koncentrácií testovanej látky pred výmenou je potrebné vykonať iba v jednej paralelnej (replikačnej) nádobe pre každú testovanú koncentráciu. Stanovenia je potrebné vykonať do siedmich dní po odbere vzoriek. Odporúča sa to pre prípad, že výsledky budú vychádzať z nameraných koncentrácií. Ak však záznamy dokazujú, že koncentrácia testovanej látky v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v ± 20 % z nominálu alebo nameranej počiatočnej koncentrácie počas testu, potom výsledky môžu vychádzať z nominálu alebo nameranej počiatočnej hodnoty koncentrácie.

Na prietočné testy je vhodný podobný režim so vzorkami ako je uvedený na semistatické testy (ale meranie „starého“ roztoku nie je v tomto prípade možné). Ak však test trvá viac ako sedem dní, je možné vhodné zvýšiť počet vzorkovaní počas prvého týždňa, napr. tri série meraní, aby sa zistilo, že testované koncentrácie zostávajú nezmenené.

Vzorky si môžu vyžadovať odstredovanie alebo filtrovanie za použitia filtra s pórmí veľkosti 0,45 μ m. Pretože ani odstredovanie ani filtrácia však vždy nedokážu odseparovať biologicky nedostupnú frakciu testovanej látky od tej, ktorá je biologicky dostupná, vzorky by mali byť podrobené spomínaným postupom.

Počas testu je potrebné merať rozpustený kyslík, pH a teplotu vo všetkých testovaných nádobách. Počas kontrol je vhodné merať celkovú tvrdosť vody a obsah solí v nádobe, a to v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou. Rozpustený kyslík a obsah solí sa musí merať minimálne trikrát (na začiatku, v strede a na konci testu). Pri semistatických testoch sa odporúča meranie rozpusteného kyslíka s väčšou frekvenciou, najlepšie pred a po

každej výmene vody alebo najmenej raz za týždeň. pH je potrebné merať na začiatku a konci každej výmeny vody pri semistatických testoch a najmenej raz týždenne pri prietochných testoch. Tvrdosť vody je vhodné merať raz počas trvania testu. Teplota sa meria denne a najlepšie je kontinuálne monitorovanie najmenej v jednej testovanej nádobe.

1.7.5. Pozorovania

1.7.5.1. Štádium embryonálneho vývoja

Embryonálne štádium (t. j. štádium gastrulí) na začiatku vystavenia testovanej látke musí byť čo najpresnejšie. Toto overenie sa môže urobiť použitím reprezentatívnej vzorky vajíčok vhodne chránených a vyčíslených. Pri opisovaní a ilustrácii embryonálnych štádií sa odporúča čerpať z odbornej literatúry (2), (5), (10), (11).

1.7.5.2. Liahnutie a prežívanie

Pozorovania liahnutia a prežívania by sa mali vykonávať najmenej raz za deň a je potrebné si zaznamenať počet vyliahnutých jednotlivcov. Na začiatku testu sa odporúča vykonávať pozorovania častejšie (napr. každých 30 minút počas prvých troch hodín), keďže v niektorých prípadoch časy prežitia môžu byť dôležitejšie ako iba počet uhynutých kusov (napr. ak sa vyskytujú akútne účinky toxicity). Mŕtve embryá a larvy treba odstrániť ihneď po objavení, pretože sa veľmi rýchlo rozkladajú. Mimoriadnu pozornosť treba venovať tomu, aby sme pri odstraňovaní mŕtvych jedincov neudreli alebo fyzicky nepoškodili susedné vajíčka/larvy, ktoré sú extrémne krehké a citlivé. Kritériá úhynu sa menia podľa vývojového štádia:

- **u vajíčok:** predovšetkým v ranných štádiách, výrazná strata priehľadnosti a zmeny v zafarbení, spôsobené koaguláciou a/alebo znížením proteínov, vedúcim k bielemu nepriehľadnému vzhľadu,
- **u embrií:** absencia telesného pohybu a/alebo absencia tepu srdca a/alebo nepriehľadné odfarbenie pri druhoch, ktorých embryá sú normálne priehľadné,
- **u lariev:** nepohyblivosť a/alebo neprítomnosť respiračných pohybov a/alebo neprítomnosť tepu srdca a/alebo biele nepriehľadné zafarbenie centrálného nervového systému a/alebo strata reakcií na mechanické stimuly.

1.7.5.3. Abnormálny vzhľad

Počet lariev vykazujúcich abnormality vo forme tela a/alebo pigmentácie v štádiu absorpcie žltkového vaku sa zaznamenávajú v príslušných časových úsekoch v závislosti od dĺžky trvania testu a charaktere popísaných abnormalít. Treba poznamenať, že abnormálne embryá a larvy sa vyskytujú prirodzene a môžu byť v rozmedzí niekoľkých percent v kontrolných vsádkach pre niektoré druhy. Je nevyhnutné odstrániť abnormálne uhynuté druhy z testovaných nádob.

1.7.5.4. Abnormálne správanie

Abnormality ako napr. hyperventilácia, nekoordinované plávanie a netypická nehybnosť sa musia zaznamenávať v príslušných časových intervaloch, ktoré závisia od doby trvania testu. Tieto vplyvy, hoci ich je ťažké kvantifikovať, môžu (ak sú spozorované) pomôcť pri interpretácii údajov o mortalite t. j. poskytnúť údaje o spôsobe toxických účinkov látky.

1.7.5.5. Dĺžka

Na konci testu sa odporúča zmerať dĺžku jednotlivcov: štandardná, dĺžka rozdvojenia alebo celková dĺžka. Možno použiť všetky typy. Ak sa však vyskytne hnieť chvostovej plutvy alebo erózia plutvy, je možné použiť štandardné dĺžky. Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient pre dĺžku medzi replikami kontrolných meraní by mal byť $\leq 20\%$.

1.7.5.6. Hmotnosť

Na konci testu je vhodné jednotlivé ryby odvážiť. Uprednostňovaná je suchá hmotnosť (24 hodín pri 60 °C) pred mokrou hmotnosťou (vysušené do sucha). Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient pre hmotnosť medzi replikami kontrolných meraní by mal byť $\leq 20\%$.

Tieto pozorovania budú mať za následok niektoré alebo všetky z nasledujúcich údajov, využiteľné na štatistické analýzy:

- kumulovaná mortalita,
- počet zdravých lariiev na konci testu,
- čas začiatku liahnutia a koniec liahnutia (t. j. 90 % vyliahnutých v každej replike),
- počet lariiev vyliahnutých za deň,
- dĺžka (a hmotnosť) prežívajúcich zvierat na konci testu,
- počet lariiev, ktoré sú zdeformované alebo abnormálneho vzhľadu,
- počet lariiev vykazujúce abnormálne správanie.

2. ÚDAJE A SPRÁVA

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Odporúča sa, aby sa štatistika začlenila aj do koncepcie a aj analýzy testu, keďže metóda pripúšťa mnohé variácie v koncepcii experimentu, ako napríklad v počte testovaných komôr, počte testovaných koncentrácií, v počiatčnom počte oplodnených vajíčok a v meraných parametroch. Špecifický návod na štatistické postupy nie je daný, vzhľadom na možnosti v koncepcii testov.

Ak sa odhadnú LOEC/NOEC, bude potrebné analyzovať variácie v každej sérii (skupine) použitím analýzy odchýlok (ANOVA) alebo použiť tabuľky neistôt. Aby bolo možné urobiť niekoľkonásobné pozorovanie medzi výsledkami pre jednotlivé koncentrácie a pre kontrolné nádrže, je vhodné použiť Dunnettovu metódu (12), (13). Vhodné príklady sú uvedené v (14), (15). Veľkosť účinku, detegovateľná použitím ANOVA alebo iných postupov (t. j. význam testu), sa vypočíta a zaznamená. Je potrebné poznamenať, že nie všetky pozorovania uvedené v odseku 1.7.5.6. sú vhodné na štatistickú analýzu metódou ANOVA. Napríklad kumulovaná mortalita a počet zdravých lariiev na konci testu sa môžu analyzovať metódou pravdepodobnosti.

Ak sú odhadované LC/EC_x a) údajmi, ktoré nás zaujímajú, je vhodné ich znázorniť krivkou napr. logaritmicou, ktorej tvar zistíme použitím štatistických metód napr. metódy najmenších štvorcov alebo nelineárnej metódy najmenších štvorcov. Krivka by mala mať také parametre, aby LC/EC_x pri údajoch, ktoré sledujeme a ich štandardných odchýlkach mohli byť odhadnuté priamo. Toto významne potom uľahčí výpočet intervalov spoľahlivosti pre LC/EC_x. Ak neexistuje dobrý dôvod na výber iných konfidenčných intervalov, stanoví sa obojstranný 95 % konfidenčný interval. Krivka má byť položená tak, aby odchýlka od hodnôt bola priemerne odhadnutá. Môžu sa použiť aj grafické metódy prekladania kriviek. Regresná analýza je vhodná na všetky pozorovania uvedené v odseku 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Výsledky by sa mali interpretovať pozorne, najmä ak namerané koncentrácie toxických látok v testovaných roztokoch dosahujú úroveň blízke detekčným limitom analytickej metódy. Interpretácia výsledkov pri koncentráciách nad hodnoty rozpustnosti daných látok vo vode si taktiež vyžaduje obozretnosť.

2.3. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.3.1. Testovaná látka

- fyzikálny charakter a dôležité fyzikálno-chemické vlastnosti,
- identifikačné chemické údaje, zahŕňajúce čistotu a analytickú metódu na kvantifikáciu testovanej látky, ak je to vhodné.

2.3.2. Testované druhy

- vedecký názov, rod, počet rodičovských rýb (t. j. koľko samíc bolo použitých, aby sa získal pre test vyžadovaný počet), zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a nasledujúca manipulácia.

2.3.3. Podmienky testu:

- použitá testovacia procedúra (t. j. semistatická alebo prietochná metóda, časový úsek od oplodnenia po štart testu, vsadené množstvo atď.),
- fotoperiód,ý,
- koncepcia testu (t. j. počet testovaných komôr a replík, počet embryí v replike),
- metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (činiteľ zvyšujúci rozpustnosť a jeho koncentrácia, ak bolo použité, musí byť udané),
- nominálne testovacie koncentrácie, namerané hodnoty, ich priemery a ich štandardné odchýlky v testovaných nádobách a metóda, ktorou boli získané a ak je testovaná látka rozpustná vo vode v koncentráciách pod tými, ktoré boli testované, mali by byť uvedené poznámky o tom, že merania referujú o koncentráciách testovanej látky v roztoku,
- charakteristiky zriedovacej vody: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zostatkového chlóru (ak bola zmeraná), celkový organický uhlík, suspendované látky, salinita v testovanom prostredí (ak bol meraný) a iné vykonané merania,
- kvalita vody v testovaných nádobách: pH, tvrdosť vody, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka.

2.3.4. Výsledky:

- výsledky z predbežných štúdií stability testovanej látky,
- záznamy, že v kontrolných nádobách boli splnené požiadavky na akceptovanie úhrnného prežívania testovaných druhov počas testu (dodatok 2 a 3),
- dátum úmrtia alebo prežitia v embryonálnom a larválnom štádiu a úhrnná úmrtnosť alebo prežitie,
- deň vyliahnutia a počet vyliahnutých jedincov,
- údaje o dĺžke (a hmotnosti),
- rozsah a opis morfológických abnormalít, ak sa nejaké vyskytli,
- rozsah a opis účinkov na správanie, ak sa nejaké vyskytli,
- štatistická analýza a spracovanie údajov
- pri testoch analyzovaných za použitia ANOVA metódy – najnižšie zistená účinná koncentrácia (LOEC) pri $p = 0,05$ /a nezistená účinná koncentrácia (NOEC) pri predpokladanom účinku, zahŕňajúca popis štatistických postupov a predpoklad, aký veľký účinok je možné detegovať,
- pri testoch analyzovaných regresnými technikami LC/ECx a intervaly spoľahlivosti, grafy preložených modelov, ktoré boli použité na ich výpočty,
- vysvetlenie pri všetkých odchýlkach od tejto testovacej metódy.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

- (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 s.
- (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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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, s. 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 s.
- (12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, s. 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.
- (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 1/RM/28, December 1992, 81 s.
- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, s. 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 S an invitation to the comparative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: s. 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, s. 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, s. 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 s.
- (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.

Tabuľka 1A

Odporúčené druhy rýb na testovanie

Sladkovodné ryby
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstruh dúhový (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Zebrička(7)(17)(18)
<i>Cyprinus caprio</i> Kapor obyčajný (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> Ryžová rybka/Medaka (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow (8)(22) – malá kaprovitá ryba

Tabuľka 1B

Príklady iných dobre zdokumentovaných druhov rýb, ktoré sa tiež používajú na testovanie

SLADKOVODNÉ RYBY	MORSKÉ RYBY
<i>Carassius auratus</i> Karas zlatý (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside – malá morská ryba druhu <i>Menidia peninsulae</i> (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Pleskáč silný (8)	<i>Clupea harengus</i> Sleď druhu <i>Clupea harengus</i> (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Treska druhu <i>Gadus morhua</i> (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow – malá morská ryba druhu <i>Cyprinodon variegatus</i> (23)(24)(25)

DODATOK 1

**NÁVOD NA VYKONANIE TESTU TOXICITY NA EMBRYÁCH A PLODOVOM VAKU – POTERI U ZEBRIČIEK
(*Brachydanio rerio*)**

ÚVOD

Zebrička pochádza z Koromandelského pobrežia v Indii, kde osídľuje rýchlo prúdiace toky. Je to bežná akvarijná ryбка z rodu kaprovitých a informácie o jej ošetrovaní a chovaní možno nájsť v študijných príručkách o tropických rybách. Ich biológiu a použitie vo výskume rýb vo svojej práci popísal Laaleom (1).

Ryba výnimočne dosahuje dĺžku 45 mm. Telo má valcovité so 7 – 9 tmavomodrými striebřistými pásikmi. Tieto pásiky sa tiahnu od chrbtovej po análnu plutvu. Chrbát je olivovo-zelený. Samčekovia sú štíhlejší ako samičky. Samičky sú striebřistejšie a ich bruško je vyduté, predovšetkým pred trením.

Dospelé ryby sú schopné znášať veľké rozdiely v teplote, pH a tvrdosti vody. Aby sme však získali zdravé ryby, ktoré produkujú vajíčka dobrej kvality, je potrebné dodržiavať optimálne podmienky.

Počas trenia samček zachytí samičku a spojí sa s ňou, táto potom vypudí oplodnené vajíčka. Vajíčka, ktoré sú priehľadné a nepríľnavé, padajú na dno, kde ich môžu ich rodičia zožrať. Na ich trenie má vplyv svetlo. Ak je ranné svetlo dostatočné, ryby sa trú v skorých ranných hodinách, hneď po úsvite.

Samičky môžu v týždenných intervaloch vyprodukovať sériu niekoľkých stoviek vajíčok.

PODMIENKY PRE RODIČOVSKÉ RYBY, REPRODUKČNÉ RYBY A VÝVOJOVÉ ŠTÁDIÁ ŽIVOTA RÝB

Vyberte vhodný počet zdravých rýb a držte ich v príslušnej kvalite (napr. dodatok 4) najmenej dva týždne pred očakávaným trením. Skupine rýb by sa malo umožniť vytrieť najmenej raz pred vyprodukovaním série vajíčok prežitých v teste. Hustota rýb počas tohto obdobia by nemala presiahnuť 1 gram ryby na liter vody. Ak sa pravidelne vymieňa voda alebo sa používajú systémy na čistenie vody, potom môže byť hustota rýb vyššia. Je potrebné udržiavať stálu teplotu v chovných nádržiach a to hodnoty $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ryby sa krmia rôznou potravou, ktorá môže pozostávať napríklad z komerčnej suchej potravy, živých, čerstvo vyliahnutých Arthemií, chironomných dafnií, bielych červov (Enchytraeid).

Dva postupy, ktoré sú uvedené nižšie, v praxi vedú k získaniu dostatočného množstva zdravých oplodnených vajíčok použiteľných na test:

- i) Osem samičiek a 16 samčekov sa umiestni do nádrže obsahujúcej 50 l zriedovacej vody, zabezpečia sa pred priamym svetlom a nechajú sa neručené najmenej 48 hodín. Trecia podložka je umiestnená na dno akvária poobede, deň pred štartom testu. Trecí tanier pozostáva z rámu (z plexiskla alebo iného vhodného materiálu), výšky 5 – 7 cm s hrubou sieťovinou 2 – 5 mm veľkosť oka, zachytenou na vrchu s jemnou sieťovinou s 10 – 30 μm veľkosť oka na dne. Počet „trecích stromov“, pozostávajúcich z netočiachich sa nylonových laniiek, je uchytených na hrubej sieťovine v ráme. Potom, čo ryby boli držané 12 hodín v tme, zažneme slabé svetlo, ktoré iniciuje trenie. Trecí tanier je po dvoch až štyroch hodinách po trení odstránený spolu so zozbieranými vajíčkami. Trecí tanier zabraňuje rybám požírať vajíčka a súčasne dovoľuje ľahký zber vajíčok. Skupine rýb by sa mala vytrieť najmenej raz pred trením, z ktorého vajíčka budú použité v teste.
- ii) Od 5 do 10 samcov a samičiek rýb je individuálne držaných najmenej dva týždne pred zamýšľaným trením. Po 5 – 10 dňoch budú brušká samičiek vypuklé a ich genitálne papíly budú viditeľné. Samčeky sú bez papíl. Trenie sa uskutoční v trecích nádržiach vybavených falošným sieťovaným dnom (ako bolo popísané vyššie). Nádrž je naplnená zriedovacou vodou tak, že hĺbka vody nad sieťou je 5 – 10 cm. Jedna samička a dvaja samčekovia sú umiestnení do nádrže jeden deň pred zamýšľaným trením. Teplotu vody postupne zvyšujeme na teplotu o 1 stupeň vyššiu ako bola aklimatizačná teplota. Svetlo je vypnuté a nádrž zostáva ničím nerušená. Ráno je zapnuté slabé svetlo, ktoré vyvolá trenie. Po 2 – 4 hodinách sú ryby odstránené a vajíčka sa zozbierajú. Ak je potrebné získať od jednej samičky veľký počet sérií vajíčok, potom sa pripraví dostatočný počet paralelných trecích nádrží. Podľa záznamov o reprodukčných výsledkoch jednotlivých samičiek pred testom (veľkosť série a kvalita), môžu byť tieto samičky s najvyššou reprodukciou vybrané ako chovné.

Vajíčka by mali byť prenesené do testovacích nádob sklenenými trubicami/vnútný priemer nie menší ako 4 mm/vybavené sacou bankou – balónikom. Množstvo vody obklopujúce prenášané vajíčka má byť čo najmenšie. Vajíčka sú ťažšie ako voda a vypadávajú z trubky. Vajíčka (larvy) je potrebné chrániť pred stykom so vzduchom. Mikroskopické skúmanie vzoriek zo sérií má dbať na to, aby sa nevyskytli žiadne neregulárnosti v prvom vývojovom štádiu. Dezinfekcia vajíčok nieje povolená.

Miera úmrtnosti vajíčok je najvyššia v prvých 24 hodinách po oplodnení. Počas tohto obdobia je vždy vykazovaná mortalita 5 – 40 %. Degenerujúce vajíčka sú výsledkom neúspešného oplodnenia alebo vývojových porúch. Zdá sa, že série vajíčok závisia od samic ryby, tak ako niektoré samičky sústavne produkujú vajíčka dolnej kvality, iné nikdy. Tiež vývojový pomer a miera liahnutia sa mení od jednej série ku druhej. Úspešne oplodnené vajíčko a žltkový vačok lariev prežívajú dobre, normálne okolo 90 %. Pri 25 °C vajíčka sa vyliahnú 3 – 5 dní po oplodnení a žltkový vačok sa absorbuje priebežne do 13 dní po oplodnení.

Embryonálny vývoj bol veľmi dobre definovaný Hisakom a Battlom (2). Cestou priehľadnosti vajíčok a počtom vyliahnutých lariev môžeme sledovať vývoj rýb a zistiť prítomnosť malformácií. Približne po štyroch hodinách od oplodnenia je možné odlišiť neoplozené vajíčka od oplozených (3). Pri tomto testovaní sú vajíčka a larvy umiestnené do testovacích nádob s malým objemom a sú skúmané pod mikroskopom.

Testované podmienky, ktoré uplatňujeme na ranné štádiá života, sú v zozname v dodatku 2. Optimálne hodnoty pH a tvrdosť zriedovacej vody sú pH 7,8 a 250 mg CaCO₃/l.

VÝPOČTY A ŠTATISTIKA

Navrhuje sa dvojfázový prístup. Po prvé, údaje o úmrtnosti, abnormálnom vývoji a čase liahnutia sa štatisticky analyzujú. Ak pri koncentráciách nebol detegovaný žiadny účinok, štatisticky sa vyhodnotí dĺžka tela. Tento prístup je vhodný, ak toxická látka môže selektívne zabíjať malé ryby, zadržať čas liahnutia a vyvolávať všeobecné malformácie, takže vedú k meraniam dĺžky s odchýlkami. Okrem toho, zmeria sa približne rovnaký počet rýb pre každý spôsob spracovania, aby sa zabezpečila validita štatistiky daného testu.

STANOVENIE LC₅₀ A EC₅₀

Percento prežívajúcich vajíčok a lariev sa vypočíta a koriguje vzhľadom na mortalitu v kontrolnom stanovení podľa Abbottovho vzorca (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100 \right)$$

kde:

P = korigované % prežívajúcich

P' = % prežívajúcich zistené pri testovanej koncentrácii

C = prežívajúce pri kontrolnom stanovení

Ak je to možné, LC₅₀ sa stanoví vhodnou metódou na konci testu.

Ak sa vyžaduje zahrnutie morfologických abnormalít do štatistiky pre EC₅₀, potom návod môžeme nájsť v Stephanovi (5).

ODHAD LOEC A NOEC

Objektívny test vajíčok a plodový vak – poter porovnávaný s nenulovou koncentráciou pri kontrolnom stanovení – stanoví sa LOEC. Z toho dôvodu môžu byť užitočné násobné porovnávacie postupy (6), (7), (8), (9), (10).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- (1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, s. 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 s.
 - (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, s. 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, s. 69 – 81.
 - (6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 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, s. 103 – 117.
 - (9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, s. 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.
-

DODATOK 2

PODMIENKY A TRVANIE TESTU A KRITÉRIÁ NA PREŽITIE U ODPORUČENÝCH DRUHOV RÝB

Druh rýb	Teplota (°C)	Obsah solí (0/00)	Fotoperiódá (hod.)	Trvanie štádia (DNI)		Typická dĺžka testu	Zostatok po kontrole (minimum prežitých %)	
				Embryo	Plodový vačok – poter		Úspešne vyliahnúť	Po vyliahnutí
SLADKOVODNÉ								
<i>Bracydanio rerio</i> Zebrička	25 ± 1	—	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (8 – 10 dní)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Pstruh dúhový	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	—	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 20 dní po vyliahnutí (50 – 55 dní)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Kapor obyčajný	21 – 25	—	12 – 16	5	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (8 – 9 dní)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Ružová rybka/Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (13 – 16 dní)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Fathead minnow – malá kaprovitá ryba	25 ± 2	—	16	4 – 5	5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (8 – 9 dní)	60	70

⁽¹⁾ U embrií.⁽²⁾ U lariev.^(a) Embryá a larvy sa musia až do obdobia jedného týždňa po vyliahnutí držať v tme (mimo kontrolných časov). Počas trvania testu sa držia pri tlmenom osvetlení.

Podmienky a trvanie testu a kritériá na prežitie u ostatných dobre zdokumentovaných druhov rýb

Druh rýb	Tepl ota (°C)	Obsah soli (0/00)	Foto perióda (hod.)	Trvanie štádia (dni)		Typická dĺžka testu	Zostatok po kontrole (minimum prežitých %)	
				Embryo	Plodový vačok – poter		Úspešne vyliahnuté	Po vyliahnutí
SLADKOVODNÉ RYBY								
<i>Carassius auratus</i> Karas zlatý	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (7 dní)	—	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Pleskáč silný	21 ± 1	—	16	3	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (7 dní)	—	75
MORSKÉ RYBY								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside – malá morská ryba	22 – 25	15 – 22	12	1,5	10	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (6 – 7 dní)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Sleď druhu	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 3 dní po vyliahnutí (23 – 27 dní)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Treska druhu	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 3 dní po vyliahnutí (18 dní)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow – malá morská ryba druhu	25 ± 1	15 – 30	12	—	—	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4/7 dní po vyliahnutí (28 dní)	> 75	80

DODATOK 4

NIEKTORÉ CHARAKTERISTIKY VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

LÁTKA	KONCENTRÁCIE
Látka v časticiach	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Zlúčený amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyle	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

C.16. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST ORÁLNEJ TOXICITY

1. METÓDA

Táto metóda akútneho toxikologického testu je totožná s metódou OECD TG 213 (1998)

1.1. ÚVOD

Tento toxikologický test je laboratórna metóda navrhnutá na stanovenie orálnej akútnej toxicity aplikovaných chemických látok pri ochrane dospelých včiel robotníč.

Pri stanovení a vyhodnocovaní toxických charakteristík látok sa určenie akútnej a orálnej toxicity u včiel môže požadovať všade tam, kde je napr. možná expozícia včiel danou chemikáliou. Akútny orálny test toxicity sa vykonáva s cieľom zistenia vrodenej toxicity pesticídov a iných chemikálií voči včelám. Výsledky testu je možné použiť na definovanie potreby na následné vyhodnotenie. Túto metódu je možné použiť najmä v postupných krokových – odborných programoch, zameraných na zistenie nebezpečenstva vplyvu pesticídov na včely, založených na postupnom prograse od laboratórnych testov toxicity cez semipolné až ku poľným – terénnym pokusom (1). Pesticídy môžu byť testované ako aktívne látky (a. s.) alebo ako viazané produkty.

Toxický štandard sa dá použiť na overenie citlivosti včiel a presnosť testovacieho postupu.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: sú nepriaznivé účinky, ktoré sa dostavia maximálne do 96 hodín po orálnom podaní jednej dávky testovanej látky.

Dávka: je množstvo skonsumovanej testovanej látky a je vyjadrená ako hmotnosť (ug) testovanej látky na testovaného živočícha (ug/včelu). Skutočná dávka sa nedá vypočítať pre každú včelu individuálne vzhľadom na spoločné kŕmenie, ale je možné vyjadriť priemernú dávku (celkovo skonsumovaná testovaná látka/počet testovaných včiel v jednom úli).

LD₅₀ (stredná letálna dávka) orálna: je štatisticky odvodená hodnota jednej dávky látky, po ktorej dochádza k úhynu 50 % testovaných živočíchov po podaní orálnou cestou. Hodnota LD₅₀ je vyjadrená v (ug) testovanej látky na včelu. Pre pesticídy môže byť testovaná látka aj v aktívnej forme (a. s.), ale aj vo forme viazanej, a to ako produkt obsahujúci viac ako jednu účinnú látku.

Mortalita: úhyn živočícha sa konštatuje v prípade jeho kompletnej imobility.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Dospelé robotnice včiel obecných (*Apis mellifera*) sú vystavené celému radu dávok testovanej látky, ktorá je rozptýlená v roztoku sacharózy. Potom sa včely kŕmia rovnakou stravou, ktorá neobsahuje testovanú látku. Úmrtnosť sa zaznamenáva denne najmenej 48 hodín a porovnáva sa s kontrolnými hodnotami. Ak sa úmrtnosť zvýši medzi 24 až 48 hodinami, kým kontrolná úroveň úmrtnosti zostáva na akceptovateľnej hladine, t. j. menej alebo rovných 10 %, je vhodné predĺžiť trvanie testu maximálne na 96 hodín. Výsledky sa analyzujú, aby sa mohla vypočítať hodnota LD₅₀ za 24 hodín a 48 hodín a v prípade predĺženia štúdie aj za 72 hodín a 96 hodín.

1.4. VALIDITA TESTU

Ak má byť test platný, musia platiť nasledovné podmienky:

- priemerná úmrtnosť na celkový počet kontrol nesmie prekročiť 10 % na konci testu,
- hodnota LD₅₀ toxického štandardu musí spĺňať špecifikovaný rozsah.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.5.1. Výber včiel**

Mali by sa použiť mladé robotnice rovnakého druhu (t. j. včely rovnakého veku, včely rovnako stravované, atď.). Včely by sa mali odobrať z primeraného kŕmeného, zdravého chovu a ak je to možné, z chovu nezasiahnutého chorobami a z kolónie s kráľovnou s overeným pôvodom a fyziologickým stavom. Včely by sa mali vyberať ráno pred použitím alebo večer pred testovacím dňom a potom by sa mali udržiavať v týchto podmienkach až do nasledujúceho dňa. Vhodné sú včely odobrané z rámov, bez mláďat. Malo by sa vyvarovať odoberaniu včiel skoro na jar alebo neskoro na jeseň, keďže v tomto období sa včelám mení ich fyziológia. V prípade, že sa predsa test musí vykonať počas skorej jari alebo neskorej jesene, včely môžu byť v prípade núdze premiestnené do inkubátora a počas jedného týždňa sa budú kŕmiť včelím chlebom (peľ zozbieraný z plástov) a roztokom sacharózy. Včely liečené chemickými látkami ako sú antibiotiká, antivarroa produktmi, atď. by sa nemali použiť na toxikologický test po dobu štyroch týždňov od poslednej liečby.

1.5.2. Podmienky kŕmenia a chovu včiel

Vhodné sú úle s ľahkým čistením a dobrým vetraním. Je možné použiť ľubovoľný vhodný materiál ako je napr.: nehrdzavejúca oceľ, pletivo, plastické alebo drevené úle. Je vhodné umiestniť skupinu 10 včiel do jedného úľa. Veľkosť testovacích úľov by mala byť úmerná počtu včiel, t. j. aby bol zabezpečený dostatočný priestor.

Včely sa majú držať v tme, v miestnosti určenej na pokusy pri teplote 25 ± 2 °C. Relatívna vlhkosť, normálne okolo 50 – 70 %, by mala byť zaznamenávaná počas doby trvania testu. Manipulovanie vrátane liečby a pozorovania sa môžu uskutočňovať za denného svetla. Ako potrava sa použije roztok sacharózy vo vode s konečnou koncentráciou 500 g/l (50 % objemových). Po podaní testovacích dávok by sa mala strava podávať *ad libitum*. Spôsob kŕmenia by mal umožňovať zaznamenanie podávanej stravy pre každý testovací úľ (pozri časť 1.6.3.1). Je možné použiť sklenenú trubicu (približne 50 mm dlhú a 10 mm širokú s otvoreným zúženým koncom okolo 2 mm v priemere)

1.5.3. Príprava včiel

Zozbierané včely sú náhodne rozmiestnené do testovacích úľov, ktoré sú náhodne rozmiestnené v experimentálnej miestnosti.

Pred začatím testu by sa mali včely nechať vyhľadávať aspoň dve hodiny pred začiatkom testu. Odporúča sa, aby včely neprijímali potravu, t. j. aby ich obsah čriev pred začatím testu bol rovnaký. Umierajúce včely je pred začiatkom testu potrebné nahradiť zdravými.

1.5.4. Príprava dávok

Ak je testovaná látka miešateľná s vodou, môže sa rozptýliť priamo v 50 % roztoku sacharózy. V prípade technických produktov a látok s nízkou rozpustnosťou vo vode, akými sú napríklad organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo disperzné činidlá s nízkou toxicitou na včely môže byť použitý napr. acetón, dimetylformamid, dimetylsulfoxid. Koncentrácia rozpúšťadla závisí od rozpustnosti testovanej látky a mala by byť rovnaká pre všetky testované koncentrácie. Aj keď koncentrácia rozpúšťadla o hodnote 1 % je v zásade prijateľná, nemala by sa prekročiť.

Mali by sa pripraviť vhodné kontrolné roztoky, t. j. roztoky, v ktorých rozpúšťadlo alebo disperzné činidlo rozpustí testovanú látku. Použijú sa dve oddelené kontrolné skupiny: vodný roztok a sacharózový roztok rozpúšťadlom/nosičom v koncentrácii použitej v dávkovacích roztokoch.

1.6. POSTUP**1.6.1. Test a kontrolné skupiny**

Počet dávok a ich opakovanie by mal spĺňať štatistické požiadavky na stanovenie LD₅₀ s 95 % pravdepodobnosťou. Bežne sa pre tento test požaduje päť dávok v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim 2,2 pre daný rozsah LD₅₀. Zriedŕovací faktor a počet dávkovaní rôznych koncentrácií sa musí stanoviť vo vzťahu ku strmosti krivky toxicity (dávka versus úmrtnosť), je potrebné vziať do úvahy štatistickú metódu, ktorá bola zvolená na analýzu výsledkov. Výber rozsahu pre test umožní vybrať vhodné koncentrácie dávkovanej látky.

Minimálne tri testovacie skupiny, každá po desiatich včelách, by mali byť kŕmené testovanou látkou na každú skúmanú koncentráciu. Minimálne tri kontrolné skupiny, každá po desiatich včelách, by mali prebiehať súbežne s testovanými sériami. Kontrolné skupiny by mali byť tiež zaradené pre použité rozpúšťadlo/nosič (pozri časť 1.5.4).

1.6.2. Toxický štandard

Do testovacích sérií je potrebné zahrnúť toxický štandard. Následne sa vyselektujú aspoň tri dávky, aby sa dosiahla očakávaná hodnota LD₅₀. Pri každej testovanej dávke by sa mali použiť minimálne tri úle, každý po desiatich včelách. Preferovaný štandard toxicity je dimetoát, pre ktorý je zaznamenaná hodnota LD₅₀ za 24 hodín v rozmedzí 0,10 – 0,35 µg a. s. /včelu (2). Aj iné štandardy toxicity budú akceptovateľné tam, kde sa dá získať dostatočné množstvo údajov na overenie očakávanej odozvy dávky (napr. parathion).

1.6.3. Expozícia

1.6.3.1 Podávanie dávok

Každý testovanej skupine včiel sa bude podávať 100 – 200 µl vodného roztoku 50 % sacharózy, ktorý obsahuje testovanú látku primeranej koncentrácie. V prípade látok s nízkou rozpustnosťou, nízkou toxicitou alebo nízkou koncentráciou vo viazanej forme sa vyžaduje väčšie množstvo testovanej látky v sacharózovom roztoku. Skonzumované množstvo potravy je potrebné monitorovať u každej skupiny včiel. Ak je krmivo s testovanou látkou skrmené (obvyčajne v intervale 3 – 4 hodín), zvyšok krmiva sa z testovacieho úľa odoberie a nahradí sa krmivom obsahujúcim iba sacharózový roztok. Sacharózový roztok sa potom podáva *ad libitum*. Pri niektorých zlúčeninách podávaných vo vyšších koncentráciách sa môže prejavíť znížené alebo žiadne prijímanie potravy ako dôsledok zvýšenej koncentrácie. Po maximálne 6 hodinách sa neskonsumované krmivo odoberie a nahradí roztokom sacharózy. Množstvo skonsumovanej potravy sa zaznamená (meranie objemu/hmotnosť zostatkovej potravy).

1.6.3.2 Trvanie testu

Na trvanie testu sa uprednostňuje doba 48 hodín, po ktorej sa testovaný roztok nahradí samotným roztokom sacharózy. Ak vzostup úmrtnosti včiel pokračuje a prekročí hodnotu 10 % počas prvých 24 hodín, trvanie testu by malo byť predĺžené na maximálne 96 hodín, za predpokladu, že kontrola úmrtnosti včiel neprekročí 10 %.

1.6.4. Pozorovania

Úmrtnosť sa zaznamenáva po 4 hodinách od začiatku testu a potom po 24 hodinách a po 48 hodinách (po podaní testovacej dávky). Ak je potrebný predĺžený čas pozorovania, ďalšie hodnotenie by malo prebehnúť v 24 hodinových intervaloch, avšak maximálne do celkových 96 hodín na dôkaz toho, že úmrtnosť včiel neprekročí stanovených 10 %.

Je potrebné zaznamenať aj množstvo skonsumovanej testovacej látky na skupinu včiel. Porovnaním hodnôt skonsumovanej a neskonsumovanej potravy počas 6 hodín sa získajú informácie o stráviteľnosti poskytnutej potravy.

Všetky abnormálne prejavy správania sa včiel počas testovaného obdobia by mali byť zaznamenané.

1.6.5. Limitný test

V niektorých prípadoch (napr. za predpokladu, že testovaná látka má nízku toxicitu) je možné vykonať limitný test 100 µg a. s. /včelu s cieľom dokázať, že hodnota LD₅₀ je väčšia ako uvedená hodnota. Rovnaký postup by sa mal použiť vrátane troch opakovaní testu na danú testovanú látku, aj na relevantnú kontrolu, na zistenie množstva skonsumovanej potravy a pri použití toxických štandardov. V prípade mortality sa celá štúdia prepracuje. Ak sa spozorujú subletálne účinky (pozri časť 1.6.4.), aj tieto je potrebné zaznamenať.

2. ÚDAJE A SPRÁVA

2.1. ÚDAJE

Údaje sa zosumarizujú do tabuľkovej formy, pre každú pokusnú skupinu zvlášť, tak isto aj pre kontrolnú skupinu včiel a skupinu použitú na zistenie toxického štandardu, pre počet použitých včiel, úmrtnosť v každom období pozorovania a pre počet včiel so zmeneným správaním. Údaje mortality je potrebné analyzovať vhodnými štatistickými metódami (napr. probitová analýza, pohyblivý priemer, binominálna pravdepodobnosť) (3), (4). Grafické záznamy dávok a ich odoziev by mali byť zaznamenané formou kriviek, a to v každý odporúčaný čas pozorovania na výpočet sklonu strmosti kriviek a stredných smrteľných dávok (LD₅₀) s 95 % pravdepodobnostnými limitami. Opravy týkajúce sa kontroly úmrtnosti sa vykonávajú za pomoci Abbottových korekcií (4), (5). Tam, kde nebola úplne skonsumovaná použitá potrava, zaznamenajú sa skonsumované testovacie dávky na skupinu včiel. Hodnota LD₅₀ by mala byť vyjadrená v µg testovanej látky na včelu.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. Testované látky:

- fyzikálna podstata a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti (ako napr.: stabilita – odolnosť vo vode, tlak pár),
- identifikačné chemické údaje, vrátane štruktúrneho vzorca, čistota (napr. pesticídov, identitu a koncentráciu účinnej látky alebo látok).

2.2.2. Testované druhy:

- odborný názov, druh, približný vek (v týždňoch), metóda zberu, dátum zberu,
- informácie o kolónach použitých na zber testovaných včiel, vrátane zdravotného stavu, všetkých chorôb týkajúcich sa dospelého včelstva, všetky preliečenia, atď.

2.2.3. Podmienky testu

- teplota a relatívna vlhkosť experimentálnej miestnosti,
- podmienky chovu včiel, vrátane typu, veľkosti a materiálu testovacích úľov,
- metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia prípravy nových roztokov (rozpúšťaná látka a jej koncentrácia sa musí v prípade použitia uviesť),
- koncepcia testu, napr. použitý počet a testovacie koncentrácie, počet kontrol pre každú testovanú koncentráciu a kontrolu, počet kópií testovacích úľov a počet včiel na testovaný úľ,
- dátum testu.

2.2.4. Výsledky:

- výsledky predbežného výberu rozsahu štúdie, ak bol výber uskutočnený,
- nespracované údaje: úmrtnosť pri každej testovanej dávke, pri každom pozorovanom čase,
- graf udávajúci závislosť, dávka a odozva na konci každého testu,
- hodnoty LD₅₀ s 95 % pravdepodobnosťou limitu pre každý odporúčaný čas pozorovania, pre testovanú látku a toxický štandard,
- štatistické postupy použité na určenie LD₅₀,
- úmrtnosť pri kontrolách,
- iné biologické dopady pozorované alebo merané, ako napr.: abnormálne správanie sa včiel (vrátane odmietnutia testovacej dávky potravy), pomer skonzumovanej potravy v skupinách včiel testovaných a netestovaných,
- akékoľvek odchýlky od testovacích postupov tu uvedených a všetky dostupné, relevantné informácie.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA:

- (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, s. 151 – 165. March 1993.

-
- (2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B.(1994). The use of dimethoat as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981 – 1992. Journal of Apicultural Research, 22, s. 119 – 125
 - (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 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, s. 265 – 267.

C.17. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST TOXICITY KONTAKTOM

1. METÓDA

Táto metóda akútneho toxikologického testu je totožná s metódou OECD TG 214 (1998).

1.1. ÚVOD

Tento toxikologický test je laboratórna metóda navrhnutá na stanovenie orálnej akútnej toxicity aplikovaných chemických látok pri ochrane dospelých včiel robotníc.

Pri stanovení a vyhodnocovaní toxických charakteristík látok sa určenie akútnej a orálnej toxicity u včiel môže požadovať všade tam, kde je napr. možná expozícia včiel danou chemikáliou. Akútny orálny test toxicity sa vykonáva s cieľom zistenia vrodenej toxicity pesticídov a iných chemikálií voči včelám. Výsledky testu je možné použiť na definovanie potreby na následné vyhodnotenie. Túto metódu je možné použiť najmä v postupných krokových – odborných programoch, zameraných na zistenie nebezpečenstva vplyvu pesticídov na včely, založených na postupnom prograse od laboratórných testov toxicity cez semipolné až ku poľným – terénnym pokusom (1). Pesticídy môžu byť testované ako aktívne látky (a. s.) alebo ako viazané produkty.

Toxický štandard sa dá použiť na overenie citlivosti včiel a presnosť testovacieho postupu.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: sú nepriaznivé účinky, ktoré sa dostavia maximálne do 96 hodín po lokálnej aplikácii jednej dávky testovanej látky.

Dávka: je množstvo skonsumovanej testovanej látky a je vyjadrená ako hmotnosť (μg) testovanej látky na testovaného živočícha ($\mu\text{g}/\text{včelu}$).

LD₅₀ (stredná letálna dávka): je štatisticky odvodená hodnota jednej dávky látky, po ktorej dochádza k úhynu 50 % testovaných živočíchov pri kontakte s látkou. Hodnota LD₅₀ je vyjadrená v (μg) testovanej látky na včelu. U pesticídov môže byť testovaná látka aj v aktívnej forme (a. s.), ale aj vo forme viazanej, a to ako produkt obsahujúci viac ako jednu účinnú látku.

Mortalita: úhyn živočícha sa konštatuje v prípade jeho kompletnej imobility.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Dospelé robotnice včiel obecných (*Apis mellifera*) sú vystavené celému radu dávok testovanej látky, ktorá je rozpustená vo vhodnom nosiči, priamou aplikáciou do thoraxu (kvapôčky). Dĺžka trvania testu je 24 hodín. Potom sa včely krmia rovnakou stravou, ktorá neobsahuje testovanú látku. Ak sa úmrtnosť zvýši medzi 24 až 48 hodinami, kým kontrolná úroveň úmrtnosti zostáva na akceptovateľnej hladine, t. j. menej alebo rovných 10 %, je vhodné predĺžiť trvanie testu maximálne na 96 hodín. Výsledky sa analyzujú, aby sa mohla vypočítať hodnota LD₅₀ za 24 hodín a 48 hodín a v prípade predĺženia štúdie aj za 72 hodín a 96 hodín.

1.4. VALIDITA TESTU

Ak má byť test platný, musia platiť nasledovné podmienky:

- priemerná úmrtnosť na celkový počet kontrol nesmie prekročiť 10 % na konci testu,
- hodnota LD₅₀ toxického štandardu musí spĺňať špecifikovaný rozsah.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.5.1. Výber včiel**

Mali by sa použiť mladé robotnice rovnakého druhu (t. j. včely rovnakého veku, včely rovnako stravované, atď.). Včely by sa mali odobrať z primeraného kŕmeného, zdravého chovu a ak je to možné, z chovu nezasiahnutého chorobami a z kolónie s kráľovnou s overeným pôvodom a fyziologickým stavom. Včely by sa mali vyberať ráno pred použitím alebo večer pred testovacím dňom a potom by sa mali udržiavať v týchto podmienkach až do nasledujúceho dňa. Vhodné sú včely odobrané z rámov, bez mláďat. Malo by sa vyvarovať odoberaniu včiel skoro na jar alebo neskoro na jeseň, keďže v tomto období sa včelám mení ich fyziológia. V prípade, že sa predsa test musí vykonať počas skorej jari alebo neskorej jesene, včely môžu byť v prípade núdze premiestnené do inkubátora a počas jedného týždňa sa budú kŕmiť včelím chlebom (peľ zozbieraný z plástov) a roztokom sacharózy. Včely liečené chemickými látkami ako sú antibiotiká, antivarroa produktmi, atď. by sa nemali použiť na toxikologický test po dobu štyroch týždňov od poslednej liečby.

1.5.2. Podmienky kŕmenia a chovu včiel

Vhodné sú úle s ľahkým čistením a dobrým vetraním. Je možné použiť ľubovoľný vhodný materiál, ako je napr.: nehrdzavejúca oceľ, pletivo, plastické alebo drevené úle. Je vhodné umiestniť skupinu 10 včiel do jedného úľa. Veľkosť testovacích úľov by mala byť úmerná počtu včiel, t. j. aby bol zabezpečený dostatočný priestor.

Včely sa majú držať v tme, v miestnosti určenej na pokusy pri teplote 25 ± 2 °C. Relatívna vlhkosť, normálne okolo 50 – 70 %, by mala byť zaznamenávaná počas doby trvania testu. Manipulovanie vrátane liečby a pozorovania sa môžu uskutočňovať za denného svetla. Ako potrava sa použije roztok sacharózy vo vode s konečnou koncentráciou 500 g/l (50 % objemových). Po podaní testovacích dávok by sa mala strava podávať *ad libitum* s použitím včelieho kŕmidla. Je možné použiť sklenenú trubicu (približne 50 mm dlhú a 10 mm širokú s otvoreným zúženým koncom okolo 2 mm v priemere).

1.5.3. Príprava včiel

Zozbierané včely sa znecitlivejú použitím oxidu uhličitého alebo dusíka pri každej aplikácii testovanej látky. Je potrebné minimalizovať nielen množstvo použitého anestetika, ale aj časť expozície. Umierajúce včely je pred začiatkom testu potrebné nahradiť zdravými.

1.5.4. Príprava dávok

Testovanú látku je možné aplikovať ako roztok na nosiči, t. j. organické rozpúšťadlo alebo vodný roztok so zvlhčujúcim činidlom. Ako organické rozpúšťadlo sa používa acetón, ale je možné použiť aj iné organické rozpúšťadlá s nízkou toxicitou voči včelám (napr. dimeťnylformamid, dimetylsulfoxid). Pri vo vode rozpustných viazaných produktoch a vysoko polárnych organických zlúčeninách nerozpustných v organických nosičových rozpúšťadlách je lepšie použiť slabé roztoky komerčne dostupných zvlhčujúcich činidiel na ľahšiu aplikáciu (napr. Agral, Cittowet, Lubrol, Triton, Tween).

Mali by sa pripraviť vhodné kontrolné roztoky, t. j. roztoky, v ktorých rozpúšťadlo alebo disperzné činidlo rozpustí testovanú látku. Použijú sa dve oddelené kontrolné skupiny: jedna s použitím vody a jedna s použitím rozpúšťadla alebo disperzanta.

1.6. POSTUP**1.6.1. Test a kontrolné skupiny**

Počet dávok a ich opakovanie by mal spĺňať štatistické požiadavky na stanovenie LD₅₀ s 95 % pravdepodobnosťou. Bežne sa na tento test požaduje päť dávok v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim 2,2 na daný rozsah LD₅₀. Počet dávok sa musí stanoviť vo vzťahu ku strmosti krivky toxicity (dávka versus úmrtnosť). Je potrebné vziať do úvahy štatistickú metódu, ktorá bola zvolená na analýzu výsledkov. Výber rozsahu pre test umožní vybrať vhodné koncentrácie dávkovanej látky.

Každá testovaná koncentrácia sa podá minimálne trom skupinám, každá po desiatich včelách.

Súčasne by sa mali vykonať testovacie série na aspoň troch kontrolných skupinách, každá po desiatich včelách. V prípade použitia organického rozpúšťadla alebo zvlhčovacieho činidla sa použijú tri dodatočné kontrolné skupiny po desiatich včelách.

1.6.2. Toxický štandard

Do testovacích sérií je potrebné zahrnúť toxický štandard. Následne sa vyselektujú aspoň tri dávky, aby sa dosiahla očakávaná hodnota LD₅₀. Pri každej testovanej dávke by sa mali použiť minimálne tri úle, každý po desiatich včelách. Preferovaný štandard toxicity je dimetoát, pre ktorý je zaznamenaná hodnota LD₅₀ za 24 hodín v rozmedzí 0,10 – 0,30 µg a. s. /včelu (2). Aj iné štandardy toxicity budú akceptovateľné tam, kde sa dá získať dostatočné množstvo údajov na overenie očakávanej odozvy dávky (napr. parathion).

1.6.3. Expozícia**1.6.3.1. Podávanie dávok**

Je potrebné individuálne zaobchádzať s anestetizovanými včelami pri lokálnej aplikácii. Včelám sa náhodne pridelujú testovacie látky a náhodným výberom sa podrobia kontrole. Objem 1 µl roztoku obsahujúceho testovanú látku vo vhodnej koncentrácii sa bude aplikovať mikroaplikátorom na dorzálnu stranu thoraxu každej včely. V prípade opodstatnenosti je možné použiť aj iné objemy roztoku. Po aplikácii testovanej látky sa včely umiestnia do testovacích úľov a vyživujú sa roztokom sacharózy.

1.6.3.2. Trvanie testu

Na trvanie testu sa uprednostňuje doba 48 hodín. Ak úmrtnosť včiel prekročí hodnotu 10 % počas prvých 24 hodín až 48 hodín, trvanie testu by malo byť predĺžené na maximálne 96 hodín za predpokladu, že kontrola úmrtnosti neprekročí 10 %.

1.6.4. Pozorovania

Úmrtnosť sa zaznamenáva po 4 hodinách od začiatku testu a potom po 24 hodinách a po 48 hodinách. Ak je potrebný predĺžený čas pozorovania, ďalšie hodnotenie by malo prebehnúť v 24 hodinových intervaloch, avšak maximálne do celkových 96 hodín na dôkaz toho, že úmrtnosť včiel neprekročí stanovených 10 %.

Všetky abnormálne prejavy správania sa včiel počas testovaného obdobia by mali byť zaznamenané.

1.6.5. Limitný test

V niektorých prípadoch (napr. za predpokladu, že testovaná látka má nízku toxicitu) je možné vykonať limitný test 100 µg a. s. /včelu s cieľom dokázať, že hodnota LD₅₀ je väčšia ako uvedená hodnota. Rovnaký postup by sa mal použiť vrátane troch opakovaní testu na danú testovanú látku aj na relevantnú kontrolu a použitie toxického štandardu. V prípade mortality sa celá štúdia prepracuje. Ak sa spozorujú subletálne účinky (pozri časť 1.6.4.), aj tieto je potrebné zaznamenať.

2. ÚDAJE A SPRÁVA**2.1. ÚDAJE**

Údaje sa zosumarizujú do tabuľkovej formy, na každú pokusnú skupinu zvlášť, tak isto aj na kontrolnú skupinu včiel a skupinu použitú na zistenie toxického štandardu, na počet použitých včiel, úmrtnosť v každom období pozorovania a na počet včiel so zmeneným správaním. Údaje mortality je potrebné analyzovať vhodnými štatistickými metódami (napr. probitová analýza, pohyblivý priemer, binominálna pravdepodobnosť) (3), (4). Grafické záznamy dávok a ich odoziev by mali byť zaznamenané formou kriviek, a to v každý odporúčaný čas pozorovania (napr. 24 h, 48 h, a ak je to potrebné 72 h, 96 h) na výpočet sklonu – strmosti kriviek a stredných smrteľných dávok (LD₅₀) s 95 % pravdepodobnostnými limitami. Opravy týkajúce sa kontroly úmrtnosti sa vykonajú za pomoci Abbottových korekcií (4), (5). Tam, kde nebola úplne skonsumovaná použitá potrava, zaznamenajú sa skonsumované testovacie dávky na skupinu včiel. Hodnota LD₅₀ by mala byť vyjadrená v µg testovanej látky na včelu.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. Testované látky:

- fyzikálna podstata a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti (ako napr.: stabilita – odolnosť vo vode, tlak pár),
- identifikačné chemické údaje vrátane štruktúrneho vzorca, čistota (napr. pesticídov, identita a koncentrácia účinnej látky alebo látok).

2.2.2. Testované druhy:

- odborný – vedecký názov, druh, približný vek (v týždňoch), metóda zberu, dátum zberu,
- informácie o kolónach použitých na zber testovaných včiel vrátane zdravotného stavu, všetkých chorôb týkajúcich sa dospelého včelstva, všetky preliečenia atď.

2.2.3. Podmienky testu

- teplota a relatívna vlhkosť experimentálnej miestnosti,
- podmienky chovu včiel, vrátane typu, veľkosti a materiálu testovacích úľov,
- metódy podávania testovanej látky, napr. použité rozpúšťadlo – nosič, objem testovaného roztoku, použitý roztok anestetika,
- koncepcia testu, napr.: použitý počet a testovacie koncentrácie, počet kontrol na každú testovanú koncentráciu a kontrolu, počet kópií testovacích úľov a počet včiel na testovaný úľ,
- dátum testu.

2.2.4. Výsledky:

- výsledky predbežného výberu rozsahu štúdie, ak bol výber uskutočnený,
- nespracované údaje: úmrtnosť pri každej testovanej dávke pri každom pozorovanom čase,
- graf udávajúci závislosť dávky – odozvy na konci každého testu,
- hodnoty LD₅₀ s 95 % pravdepodobnosťou limitu na každý odporúčaný čas pozorovania, na testovanú látku a toxický štandard,
- štatistické postupy použité na určenie LD₅₀,
- úmrtnosť pri kontrolách,
- iné biologické dopady pozorované alebo merané, ako napr.: abnormálne správanie sa včiel (vrátane odmietnutia testovacej dávky potravy), pomer skonsumovanej potravy v skupinách včiel testovaných a netestovaných,
- akékoľvek odchýlky od testovacích postupov tu uvedených a všetky dostupné, relevantné informácie.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

- (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, s. 151 – 165. March 1993.
- (2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B.(1994). The use of dimethoat as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981 – 1992. Journal of Apicultural Research, 22, s. 119 – 125.
- (3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., s. 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, s. 265 – 267.

C. 18. ADSORPCIA ALEBO DESORPCIA S POUŽITÍM ROVNOVÁŽNEJ METÓDY DÁVKOVANIA**1. METÓDA**

Táto metóda je totožná s metódou OECD TG 106, na stanovenie adsorbpcie alebo desorbpcie v zemine, použitím dávkovacej rovnovážnej metódy (2000).

1.1. ÚVOD

Metóda sa zaoberá kruhovým testom a praktickým postupom určeným na selekciu pôdy na vývoj adsorbčného testu (1), (2), (3), (4) a tiež jeho zavedením na vnútroštátnej úrovni (5), (6) (7), (8), (9), (10), (11).

Adsorbčné alebo desorbčné štúdie sú užitočné na získavanie základných informácií o pohybe chemikálií a ich distribúcii v pôde, vode a v plynnom stave biosféry (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21). Tieto informácie môžu byť použité pri predvídaní alebo odhade, napríklad nožnej dosažiteľnej miery degradácie chemikálie (22), (23), transformácii a po prijíme organizmom (24), lúhovaním cez pôdny profil (16), (18), (19), (21), (25), (26), (27), (28), prchavosťou pôdy (21), (29), (30), prenosom z povrchu terénu do prírodných vodných zdrojov (18) (31), (32). Údaje o adsorbpcii môžu byť použité na porovnávacie a modelové účely (19), (33), (34), (35).

Distribúcia chemikálií medzi pôdou a vodnými fázami je komplexný proces, ktorý závisí od počtu rozdielnych faktorov: chemickej povahy látky (12), (36), (37), (38), (39), (40), charakteristík pôdy (4), (12), (13), (14), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48), (49) a klimatických faktorov ako sú napríklad zrážky, teplota, slnečný svit a vietor. Preto predkladaným zjednodušeným laboratórnym modelom ako je táto metóda, nemôžu byť kompletne postihnuté všetky rôznorodé fenomény a mechanizmy zahrnuté v procese adsorbpcie chemikálie pôdou. Akokoľvek, aj keď sa týmto modelom nedajú pokryť všetky environmentálne možné prípady, môže poskytnúť hodnotné informácie o význame adsorbpcie chemikálií na životné prostredie.

Pozri Všeobecný úvod.

1.2. ÚČEL

Cieľom tejto metódy je stanovenie adsorbčného alebo desorbčného správania sa látok v pôde. Cieľom je získať údaje o sorpčných hodnotách, ktoré môžu byť použité na predpoklad segmentácie spomedzi množstva environmentálnych podmienok: rovnovážnych adsorbčných koeficientov pre chemikálie na rôznych pôdach, ktoré sú vymedzené funkciou pôdnych charakteristík (ako napr.: obsah organického uhlíka, obsah ílov, pôdnou štruktúrou a pH). Použijú sa rôzne pôdne typy, aby sa čo najširšie pokryl rozsah interakcií danej látky s prírodnými typmi pôd.

V tejto metóde adsorbpcia reprezentuje proces väzby chemikálie na pôdny povrch: nerozlišuje medzi rozdielnymi adsorbčnými procesmi (fyzikálnou alebo chemickou adsorbpciou) a procesmi ako povrchovo katalyzovaná degradácia, rozsahom adsorbpcie alebo chemickou reakciou. Adsorbpcia, ktorá bude prebiehať na koloidných časticiach (o priemere 0,2 um) vytvorených pôdou, nie je bratá do úvahy.

Pôdne parametre, ktoré sú braté do úvahy z pohľadu adsorbpcie a najväčšej miery dôležitosti, sú: obsah organického uhlíka (3), (4), (12), (13), (14), (41), (43), (44), (45), (46), (47), (48); obsah ílu a pôdna štruktúra (3), (4), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48) a pH pre ionizovateľné zlúčeniny (3), (4), (42). Ďalšie pôdne parametre, ktoré môžu mať dopad na adsorbpciu alebo desorbpciu danej látky, sú efektívne katióny s výmennou kapacitou (ECEC), obsah amorfného železa a oxidov hliníka, hlavne na vulkanické a tropické pôdy (4), tak ako aj na špecifický povrch (49).

Test je navrhnutý na vyhodnocovanie adsorbpcie chemikálií na rozdielnych pôdnych typoch s rôznymi rozsahmi obsahu organického uhlíka, obsahu ílu, pôdnej matrice a hodnoty pH pôdy. Tento test zahŕňa tri rady:

Rad 1: — pomer pôda/roztok,

— čas potrebný na dosiahnutie adsorbčnej rovnováhy a množstvo testovanej látky adsorbovanej v rovnovážnom stave,

— adsorbpcia testovanej látky na povrchoch testovaných nádob a stabilita testovanej látky počas trvania testu.

Rad 2: Skríningový test: Adsorpcia je študovaná na piatich rozdielnych pôdnych typoch v zmysle adsorpčnej kinetiky pri jednotnej koncentrácii a stanovenie distribučných koeficientov K_d a K_{oc} .

Rad 3: Stanovenie Freundlichových adsorpčných izoterm na vymedzenie vplyvu koncentrácie na rozšírenie pôdnej adsorpcie.

Štúdia desorpcie vo význame desorpčnej kinetiky/Freundlichových desorpčných izoterm (dodatok 1).

1.3. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Symbol	Definície	Jednotky
A_{t_i}	adsorpčné percento v čase t_i	%
A_{eq}	adsorpčné percento v adsorpčnej rovnováhe	%
$m_s^{ads}(t_i)$	hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôdu v čase t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôdu počas časového intervalu Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôdu v adsorpčnej rovnováhe	μg
m_0	hmotnosť testovanej látky v testovacej trubici na začiatku adsorpčného testu	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	hmotnosť podielu testovanej látky meranej pomere (v_a^A) v časovom bode t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	hmotnosť látky v roztoku v adsorbčnej rovnováhe	μg
$m_{pôda}$	množstvo pôdnej fázy vyjadrenej ako vysušená hmota pôdy	g
C_{st}	hmotnostná koncentrácia zásobného roztoku látky	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku v kontakte s pôdou	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v čase t_i , v ktorom je analýza uskutočnená	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	obsah adsorbovanej látky na pôde v adsorpčnej rovnováhe	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v adsorpčnej rovnováhe	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	počiatočný objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas adsorpčného testu	cm^3
v_a^A	objem podielu, v ktorom je meraná testovaná látka	cm^3
K_d	distribučný adsorbčný koeficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	organický uhlík normalizujúci adsorpčný koeficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	organická hmota normalizujúca distribučný koeficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlichov adsorpčný koeficient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlichov exponent	
D_{t_i}	desorpčné percento v časovom bode t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorpčné percento korešpondujúce s časovým intervalom Δt_i	%
K_{des}	aparentný desorpčný koeficient	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	Freundlichov desorpčný koeficient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy v čase t_i	μg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy počas času Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	hmotnosť látky určenej analyticky vo vodnej fáze v desorpčnej rovnováhe	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	celková hmotnosť testovanej látky desorbovanej v desorpčnej rovnováhe	μg

Symbol	Definície	Jednotky
$m_s^{\text{des}}(\Delta t_i)$	hmotnosť zostávajúcej látky adsorbovanej na pôdu po časovom intervale Δt_i	μg
m_{aq}^{A}	hmotnosť látky po adsorpčnej rovnováhe pri nekompletnej objemovej zámene	μg
$C_s^{\text{des}}(\text{eq})$	obsah zostatkovej testovanej látky adsorbovanej na pôdu v desorpčnom eguilibriu	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$	hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnej fáze v desorpčnej rovnováhe	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas desorpčného kinetického experimentu počas sériovej metódy	cm^3
V_R	objem supernatantu odstráneného z trubice po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradenej rovnakým objemom roztoku 0,01 M CaCl_2	cm^3
v_a^{D}	objem alikvotného podielu dávkovanej látky na analytické účely v čase (i), počas experimentu desorpčnej kinetiky uskutočneného sériovou metódou	cm^3
V_{ra}^{D}	objem roztoku odobratého z trubice (i) na meranie testovanej látky v experimente desorpčnej kinetiky (paralelná metóda)	cm^3
V_r^{F}	objem roztoku odobratého z trubice na meranie testovanej látky v desorpčnej rovnováhe	cm^3
MB	hmotnostná rovnováha	%
m_E	celkové množstvo testovanej látky extrahovanej z pôdy a stien testovacích nádob v dvoch krokoch	μg
V_{rec}	objem supernatantu získaného po adsorpčnej rovnováhe	cm^3
P_{ow}	oktanol/parciálny vodný koeficient	
pKa	disociačná konštanta	
S_w	rozpustnosť vo vode	g l^{-1}

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Známe objemy roztokov testovanej látky, neoznačenej alebo radioaktívne označenej so známymi koncentráciami v 0,01 M roztoku CaCl_2 sú pridané do vzoriek pôdy o známej hmotnosti v suchom stave, ktoré sú preekvilibrované s 0,01 M roztokom CaCl_2 . Zmes sa premiešava dostatočne dlhý čas. Pôdne suspenzie sú potom oddelené odstredením a ak je potrebné filtráciou a analyzuje sa vodná fáza. Množstvo testovanej látky adsorbovanej na pôdnej vzorke je vypočítané ako rozdiel medzi množstvom testovanej látky obsiahnutej v roztoku na začiatku a zostatkového množstva látky na konci experimentu (nepriama metóda).

Variabilne je možné stanovovať množstvo adsorbovanej testovanej látky priamo analýzou pôdy (priama metóda). Tento postup, ktorý zahŕňa postupný program pôdnej extrakcie s vhodným rozpúšťadlom, sa odporúča v prípadoch, kde rozdiel koncentrácií roztoku látky nemôže byť presne určený. Príklady takýchto prípadov sú: adsorpcia testovanej látky na povrchu testovaných nádob, nestabilita testovanej látky v dobe trvania experimentu, nízka adsorpcia spôsobujúca iba malú zmenu koncentrácie v roztoku a silná adsorpcia poskytujúca nízku koncentráciu, ktorá nemôže byť presne stanovená. Ak sa používa radioaktívne označená látka, pôdna extrakcia môže byť nahradená analýzou pôdnej fázy po zhorení a tekutým scintilačným načítaním. Nakoľko tekuté scintilačné načítavanie je nešpecifická technika, ktorá nemôže rozlišovať medzi pôvodnými a transformovanými produktmi, mala by byť použitá iba v prípade, ak je testovaná chemikália stabilná počas trvania štúdií.

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Chemické reagenty by mali mať stupeň čistoty – analyticky čistá. Odporúča sa použitie neoznačovaných testovacích látok so známym zložením aspoň 95 % čistoty alebo u rádiooznačených látok o známom zložení a rádio-čistoty v prípade krátkej polovičnej doby rozpadu by sa mali aplikovať korekcie na rozpad.

Pred začatím adsorpčne desorpčného testu by mali byť dostupné nasledovné informácie o testovanej látke:

- a) rozpustnosť vo vode (A.6);
- b) tlak pár (A.4) a/alebo Henryho konštanta;
- c) abiotická degradácia: hydrolýza ako funkcia pH (C.7);
- d) rozdeľovací koeficient (A.8);
- e) stav biodegradability (C.4) alebo aeróbna a anaeróbna transformácia v pôde;
- f) pKa ionizovateľných látok;
- g) priama fotolýza vo vode (napr.: UV-Vis absorpčné spektrum vo vode, množstvo výťažku) a fotodegradácia na pôde.

1.6. APLIKOVATELNOSŤ TESTU

Tento test sa dá aplikovať na chemické látky, pre ktoré je možné aplikovať analytickú metódu s dostatočnou presnosťou. Dôležitým parametrom, ktorý môže ovplyvniť dôveryhodnosť výsledkov, špeciálne v prípadoch, kedy sa používa nepriama metóda, je stabilita testovanej látky v závislosti na čase počas trvania testu. T. j. predpokladá sa skontrolovať stabilitu a úvodnú štúdiu; ak sa pozoruje transformácia v závislosti na čase, odporúča sa, aby hlavná časť testu bola uskutočnená v oboch fázach, kvapalnej aj pevnej.

Pri realizovaní tohto testu sa môžu objaviť ťažkosti u testovaných látok s nízkou rozpustnosťou vo vode ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), ako aj u veľmi nabitých látok, vzhľadom na skutočnosť, že koncentrácia v kvapalnej fáze sa nemôže merať analyticky s dostatočnou presnosťou. V takýchto prípadoch musia byť urobené dodatočné opatrenia. Návod, ako postupovať v týchto prípadoch (ako zvládnuť tieto problémy), je uvedený v zodpovedajúcej časti tejto analytickej metódy.

Pri použití prchavých látok by sa malo vyvarovať stratám počas štúdie.

1.7. OPIS METÓDY

1.7.1. Prístroje a chemikálie

Štandardné laboratórne vybavenie:

- a) Trubice a nádoby na vykonanie experimentu. Je dôležité, aby tieto trubice a nádoby:
 - zapadali do aparatúry odstredivky, aby minimalizovali manipuláciu a prenos chýb,
 - boli vyrobené z nerezového materiálu, ktorý minimalizuje adsorpciu testovanej látky na ich povrchu
- b) Miešacie zariadenie: trepačka alebo ekvivalentné zariadenie na trepanie, ktoré je schopné zachovať pôdu počas doby pretrepávania v stave suspenzie.
- c) Odstredivka: uprednostňuje sa vysokorýchlostná, napr.: so silou odstredenia väčšou ako 3 000 g, tepelne regulovateľnou, so schopnosťou odstrániť častice s priemerom väčším ako 0,2 μm z vodného roztoku. Kontajnery by mali byť počas pretrepávania a odstredovania uzavreté kvôli strate vody a prchavosti látok, kvôli minimalizácii adsorpcií na látky by sa mali používať deaktivované uzávery ako napr. teflónom pokryté skrutkové vrchnáčky.
- d) Voliteľné: je možné použiť aj filtračné zariadenie, filtre s porozitou 0,2 μm , sterilné, na jednorázové použitie. Špeciálna starostlivosť sa musí venovať výberu materiálu filtra kvôli zamedzeniu strát testovanej látky na jeho povrchu; pri málo rozpustných testovaných látkach sa neodporúča filter z organického materiálu.
- e) Analytické prístroje, vhodné na meranie koncentrácie testovaných chemikálií.

- f) Laboratórna pec, schopná udržať teplotu v rozsahu 103 °C až 110 °C.

1.7.2. Charakteristika a výber pôdy

Pôda by mala byť charakterizovaná tromi parametrami, ktoré sú zodpovedné za ich adsorpčnú kapacitu: organický uhlík, obsah hlíny a štruktúra pôdy a pH. Ako už bolo spomenuté (pozri Prehľad), ostatné fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy môžu ovplyvňovať adsorpciu alebo desorpciu špeciálnych látok a mohli by zaväzovať v takýchto prípadoch.

Metódy, ktoré charakterizujú pôdu, sú veľmi dôležité a môžu mať významný vplyv na výsledky. Preto sa odporúča, aby pH pôdy bolo merané v roztoku 0,01 M CaCl₂ (to je roztok, ktorý sa používa pri testoch (desorpcia alebo adsorpcia) podľa odpovedajúcej ISO-10390-1. Tiež sa odporúča, aby sa ostatné relevantné vlastnosti pôdy stanovovali v súlade so štandardným postupom (napr. ISO „Príručka pre analýzu pôdy“). Toto zabezpečí analýzy sorpčných údajov na báze všeobecne štandardizovaných parametrov na pôdu. Niektoré návody, opisy existujúcich štandardných metód na analýzu a charakterizáciu pôdy je možné získať v odkazoch (50 – 52). Na kalibráciu testovacích metód na pôdu sa odporúča použiť referenčné pôdy.

Návod (sprievodca) na výber pôd na adsorpčno alebo desorpčné experimenty je uvedený v tabuľke 1. Sedem vybraných typov pôd nachádzajúcich sa v miernom geografickom pásme. Pre ionizujúce sa testovacie látky by vybrané pôdy mohli zahŕňať široké rozpätie pH, v prípade, že by mohli zhodnotiť adsorpciu látky v jej ionizujúcej a neionizujúcej forme. Návod, prehľad, na koľkých mnohých rozdielnych typoch pôd sa používa v rozličných stupňoch testuje uvedený v odseku 1.9. – Vykonanie testu.

Ak sa uprednostňujú iné typy pôdy, tieto môžu byť charakterizované tými istými parametrami a môžu mať podobné odchýlky alebo variácie vo vlastnostiach tak, ako je to uvedené v tabuľke 1, hoci nedosahujú presne uvedené kritériá.

Tabuľka 1

Návod na výber vzoriek pôdy pre adsorpciu/desorpciu

Druh pôdy	Rozsah pH (v 0,01 M CaCl ₂)	Obsah organického uhlíka (%)	Obsah ílu (%)	Matrica pôdy ⁽¹⁾
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 – 80	íl
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 – 40	ílovitá hlina
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 – 25	prachovitá hlina
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 – 30	hlina
5	< 4,0 - 6,0 ⁽²⁾	<0,5 - 1,5 ⁽²⁾ ⁽³⁾	< 10 – 15 ⁽²⁾	hlinitý piesok
6	> 7,0	<0,5- 1,0 ⁽²⁾ ⁽³⁾	40 – 65	ílovitá hlina/íl
7	< 4,5	> 10	< 10	piesok/hlinitý piesok

⁽¹⁾ Podľa FAO a US systému (85).

⁽²⁾ Príslušné premenné by mali mať hodnoty v uvedenom rozsahu. Ak sa pri hľadaní vhodnej matrice pôdy vyskytnú ťažkosti, v takomto prípade sa môžu akceptovať aj hodnoty nižšie ako uvedené minimum.

⁽³⁾ Pôdy s obsahom organického uhlíka nižším ako 0,3 % môžu pôsobiť rušivo na korelačný vzťah medzi obsahom organického uhlíka a adsorpciou. Takže sa odporúča používať pôdy s minimálnym obsahom organického uhlíka 0,3 %.

1.7.3. Výber a skladovanie pôdnych vzoriek

1.7.3.1 Výber

Neodporúčajú sa žiadne špecifické vzorkovacie techniky: vzorkovacie techniky závisia od účelu štúdie (53), (54), (55), (56), (57), (58).

Je možné uvažovať o nasledujúcich možnostiach:

- a) podrobné informácie o histórii miesta poľa sú nevyhnutné; táto zahrňuje umiestnenie, vegetačný povrch, aplikáciu prípravkov na ochranu rastlín, priemyselných hnojív, biologických prípravkov alebo náhodnú kontamináciu. Odporúčania štandardu ISO o vzorkovaní pôd (ISO 10381-6) by sa mali dodržiavať s ohľadom na opis vzorkovacieho miesta.
- b) vzorkovacie miesto musí byť definované podľa UTM (Universal Transversal Mercator – Projection/ European Horizontal Datum) alebo geografickými súradnicami, čo môže povoliť v budúcnosti opätovné zhromažďovanie špeciálnych pôd alebo by mohlo pomôcť definovať pôdu z rôzne/rozdielne klasifikovaných systémov používaných v rozličných krajinách. Tiež iba A horizont by mohol byť zhromaždený do hĺbky 20 cm. Špeciálne pre druh pôdy č. 7, ak je prítomný O_h horizont ako časť pôdy, môže byť zaradený do vzorkovania.

Vzorky pôdy by mohli byť transportované pri použití kontajnerov za teplotných podmienok, ktoré garantujú, že počiatkové vlastnosti pôdy nie sú podstatne zmenené.

1.7.3.2. Skladovanie

Uprednostňuje sa používať čerstvo odobratú pôdu. Iba v prípade, keď to nie je možné, pôda sa môže uskladniť pri teplote miestnosti a mala by byť sušená na vzduchu. Nie je určený limit na uskladňovanie, ale pôda, ktorá bola uskladnená dlhšie než tri roky, by mala byť reanalyzovaná pred použitím na obsah organického uhlíka, pH a CEC.

1.7.3.3. Manipulácia a príprava pôdnych vzoriek na test.

Pôda sa suší vzduchom pri izbovej teplote (preferuje sa teplota medzi 20 °C – 25 °C). Desagregácia by sa mala dať vykonať s minimálnou silou tak, aby sa originálna štruktúra pôdy zmenila na najmenšiu možnú. Pôda sa preosieva na čiastočky s veľkosťou rovnou alebo menšou ako 2 mm. Mali by sa dodržiavať odporúčania štandardu ISO na vzorkovanie pôdy (ISO 10381-6) s ohľadom na sitovací proces. Odporúča sa vykonať opatrne homogenizáciu vzorky, toto prispeje k vylepšeniu reprodukovateľnosti výsledkov. Obsah vlhkosti každej pôdy sa stanoví na trikrát pri zahriatí na 105 °C až do dosiahnutia konštantnej hmotnosti (približne 12 hodín). Vo všetkých výpočtoch hmotnosť pôdy sa vzťahuje na vysušenú hmotnosť v peci, hmotnosť pôdy upravená o obsah vlhkosti.

1.7.4. Príprava testovacej látky na aplikáciu na pôdu

Testovaná látka sa rozpustí v roztoku 0,01 M CaCl_2 v destilovanej alebo deionizovanej vode; roztok CaCl_2 sa používa ako vodná rozpustná fáza na zlepšenie odstreďovania a minimalizácie výmeny kationov. Koncentrácia zásobného roztoku by mala byť tri rady vyššia než detekčný limit používanej analytickej metódy. Táto prahová hodnota ochraňuje presnosť stanovenia s ohľadom na metodológiu uvedenú v tejto metóde. Navyše koncentrácia zásobného roztoku by mala byť pod rozpustnosťou testovanej látky vo vode.

Zásobný roztok by mal byť pripravený tesne pred aplikáciou na pôdne vzorky a mal by sa udržiavať v tme pri 4 °C. Čas uskladovania je závislý od stability testovanej látky a jej koncentrácie v roztoku.

Iba pre zle rozpustné látky ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), bude potrebné vhodné rozpustné činidlo, ak je ťažko rozpustná v testovanej látke. Takéto rozpúšťajúce činidlo a) by malo byť miešateľné s vodou tak ako je metanol alebo acetonitril; b) jeho koncentrácia by nemala presiahnuť 1 % z celkového objemu zásobného roztoku a mal by predstavovať menej objemu ako je v roztoku testovanej látky, ktorá prichádza do kontaktu s pôdou (pokiaľ možno menej než 0,1 %); a c) nemalo by to byť povrchovo aktívne činidlo alebo by sa nemalo podrobiť solvolytickej reakcii s testovanou chemikáliou. Použitie rozpúšťajúceho činidla sa stanoví a potvrdí výpisom údajov.

Iná alternatíva pri zle rozpustných látkach je pridať označovanú testovanú látku do testovacieho systému. Testovacia látka je rozpustná v organických rozpúšťadlách; jej alikvotná časť sa pridá do pôdneho systému a 0,01 M CaCl_2 v destilovanej alebo deionizovanej vode. Obsah organického rozpúšťadla vo vodnej fáze by sa mal udržiavať tak nízko, ako je to len možné, normálne by nemal presiahnuť 0,1 %. Značkovanie organickým roztokom môže predchádzať nereprodukovateľnosti objemu. Takto môžeme zaviesť ďalšiu následnú chybu v prípade, ak koncentrácie testovanej látky ako rozpúšťadla by neboli rovnaké počas trvania celého testu.

1.8. ZÁKLADNÉ POŽIADAVKY NA VYKONANIE ADSORPCNEHO ALEBO DESORPČNÉHO TESTU

1.8.1. Analytická metóda

Kľúčové parametre, ktoré môžu ovplyvniť presnosť sorbčných meraní, zahŕňajú presnosť analytickej metódy použitej pri rozbere roztoku a adsorbovanej fázy, stabilitu a čistotu testovanej látky, dosiahnutie sorbčnej rovnováhy, veľkosť koncentračnej zmeny roztoku, pomer pôda a roztok a zmeny v pôdnej štruktúre počas ekvilibračného procesu (35), (59 – 62). Niektoré spôsoby chovania sa pri presných východoch sú uvedené v dodatku 2.

Spôľahlivosť použitých analytických metód sa musí skontrolovať v koncentračnom rozsahu, ktorý sa môže vyskytnúť počas testu. Experimentátor by mal mať voľnú ruku pri vyvíjaní vhodnej metódy s náležitou presnosťou, precíznosťou, reprodukovateľnosťou, detekciou limitov a výťažnosťou. Návod, ako vykonať takýto test, je uvedený v nižšie opísanom experimente.

Pôda s vysokou adsorbilitou o hmotnosti cca 20 g s vysokým obsahom organického uhlíka a obsahom ílu sa pretrepáva vo vhodnom objeme 0,01 M CaCl₂, napr. 100 cm³ počas 4 hodín. Tieto udané objemy a váhy môžu kolísať v závislosti na analytických potrebách, ale pomer pôda k roztoku 1:5 je vhodné použiť ako východiskový bod. Zmes sa odstredí a vodná fáza prefiltruje. Určitý objem testovanej látky zásobného roztoku je pridaný do novšieho na dosiahnutie nominálnej koncentrácie vrátane koncentračného rozsahu, ktoré sa môžu vyskytnúť počas testu. Tento objem by nemal prekročiť 10 % konečného objemu vodnej fázy, v záujme zmeniť charakter pred dosiahnutím rovnováhy roztoku tak málo ako sa len dá. Roztok sa následne analyzuje.

Jeden slepý pokus pozostávajúci zo systému pôda + roztok CaCl₂, (bez testovanej látky) musí byť zahrnutý do testu z dôvodu na odhalenie artefaktov v analytickej metóde a na efekty matrice zapríčinené pôdou.

Medzi analytické metódy, ktoré môžeme použiť na sorpčné merania, patria chromatografia plyn – kvapalina (GLC), vysoko účinná kvapalinová chromaografia (HPLC), spektrometria (GC/hmotnostná spektrometria – plynová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou), HPLC/hmotnostná spektrometria – kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou) a kvapalná scintilačné počítadlo (na látky označené rádioaktívnou látkou). Nezávislosť použitých analytických metód je viazaná na výťažnosť, ktorá by mala byť medzi 90 % – 110 % nominálnej hodnoty.

Charakteristiky a detekcia limitov analytickej metódy vhodnej na vykonanie adsorbčnej štúdie zohrávajú dôležitú úlohu v zadaní testovacích podmienok a celého experimentálneho uskutočnenia testu. Táto metóda kopíruje všeobecnú experimentálnu cestu a poskytuje odporúčania a návod na alternatívne riešenia, kde môžu analytické metódy a laboratórne vybavenie obmedzovať vykonávanie testov.

1.8.2. Výber optimálnych pomerov pôda k roztoku

Selekcia vhodného pomeru pôdy k roztoku na sorpčné štúdie závisí na distribučnom koeficiente K_d a relatívnom stupni požadovanej adsorpcie. Zmena koncentrácie látky v roztoku určuje štatistickú presnosť meraní založených na tvare adsorpčnej rovnice a limity analytickej metodológie, pri detekcii koncentrácie chemikálie v roztoku. Vo všeobecnosti je užitočné zadať niekoľko pevných pomerov, pre ktoré je adsorpčné percento nad 20 % a vhodnejšie je viac ako 50 % (62), počas ktorej by sa mala zameriavať pozornosť na koncentráciu testovanej látky vo vodnej fáze dostatočne vysokej na to, aby bolo možné vykonať presné meranie. Toto je obzvlášť dôležité v prípade vysokých adsorpčných percent.

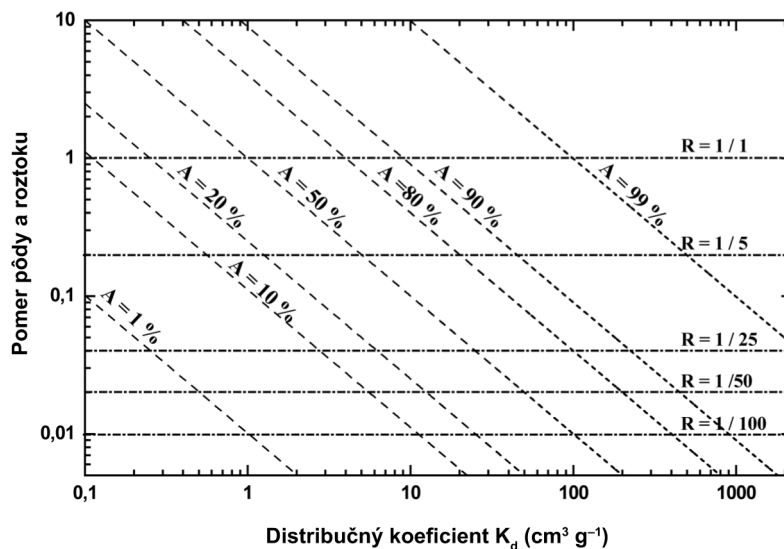
Vhodný prístup pri výbere primeraného pomeru pôda/voda je založený na odhade hodnoty K_d, buď z predbežných štúdií alebo sú stanovené bežnými technikami (dodatok 3). Výber vhodného pomeru sa uskutoční na základe záznamu vhodného pomeru pôdy a roztoku verus hodnota K_d pre fixne stanovené adsorpčné percentá (obr. 1). V tomto zámere je predpoklad, že adsorpčná rovnováha je v lineárnom vzťahu ⁽¹⁾. Aplikačný vzťah sa dosiahne zmenou usporiadania rovnice (4) pre hodnoty K_d vo forme vzťahu (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

⁽¹⁾ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

alebo v logaritmickej forme, ktorá predpokladá, že: $R = m_{\text{pôda}}/V_0$ a $A_{\text{eq}} \%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1 - A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$



Obr. 1. Vzťah medzi pomerom pôdy a roztoku a hodnoty K_d v rôznych adsorpčných percentách testovanej látky

Obr. 1 ukazuje pomery pôdy a roztoku požadované ako funkcia K_d na rôzne hladiny adsorpcie. Napríklad v pomere pôda k roztoku v hodnote 1:5 a hodnoty K_d rovných 20, by mala nastať približne 80 % adsorpcia. Na získanie 50 % adsorpcie na tú istú hodnotu K_d musí byť použitý pomer 1:25. Tento je možné dosiahnuť vhodným pomerom pôdy a roztoku, ktorý umožňuje výskumníkovi pružnosť vo výbere experimentálnych potrieb.

Oblasti, ktoré sú problematickejšie, súvisia s tým, že niektoré chemikálie sú výrazne alebo len veľmi mierne adsorbované. Pri nízkej adsorpcii sa odporúča pomer 1:1, hoci na niektoré silne organické pôdne typy sú potrebné nižšie pomery na dosiahnutie ťovitej kaše. Dôraz sa kladie na analytickú metodológiu merania malých zmien koncentrácií roztoku, v opačnom prípade budú adsorpčné merania nepresné. Na druhej strane pri veľmi vysokých distribučných koeficientoch, K_d koeficient môže ísť až do pomeru pôdy a roztoku 1:100, kedy zanecháva signifikantné množstva chemikálie v roztoku. Pozornosť treba venovať dokonalému zmiešaniu a systému treba ponechať dostatočný čas na ekvilibáciu. V týchto extrémnych prípadoch, kde chýba primeraná analytická metodológia, je predpoklad hodnoty K_d založený na technike odhadu, napríklad na hodnotách P_{ow} (dodatok 3). Táto metóda môže byť užitočná najmä v prípadoch nízkej adsorbovateľnosti polárnych zlúčenín s hodnotou P_{ow} nižšou ako 20 a pre lipofilné – vysoko sorpčné chemikálie s hodnotou P_{ow} väčšou ako 10^4 .

1.9. USKUTOČNENIE TESTU

1.9.1. Podmienky testu

Všetky experimenty sa realizujú pri izbovej teplote, ak je to možné, pri konštantnej teplote medzi 20 °C až 25 °C.

Podmienky odstreďovania musia umožňovať odstránenie častíc väčších ako 0,2 µm z roztoku. Táto hodnota uvoľňuje najmenšie častice, ktoré sa považujú za pevné a je hranicou medzi pevnými a koloidnými časticami. Opis priebehu podmienok odstreďovania je uvedený v dodatku 4.

Ak odstreďovacie zariadenia nemôžu garantovať odstránenie častíc väčších ako 0,2 µm, musí sa použiť kombinácia odstredenia a filtrácie s pórovitosťou filtrov 0,2 µm. Tieto filtre by mali byť vyrobené z vhodného inertného materiálu, ktorý zabráni stratám testovanej látky na ich povrchu. V každom prípade je nutné dokázať, že počas filtrovania nedochádza k žiadnym stratám testovanej látky.

1.9.2. Rad 1 – Úvodná štúdia

Účel vypracovania úvodnej štúdie bol už uvedený v časti Scope (Prehľad). Návod na vymedzenie takéhoto testu je opísaný s odporučeniami na experiment, uvedenými nižšie.

1.9.2.1. Výber optimálnych pomerov pôdy k roztoku

Použijú sa dva pôdne typy a tri pomery pôdy k roztoku (6 experimentov). Jeden z pôdných typov má vysoký obsah uhlíka a nízky obsah ílu, druhý má nízky obsah organického uhlíka a vysoký obsah ílu. Navrhujú sa nasledovné pomery pôdy k roztoku:

- 50 g pôdy a 50 cm³ testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:1),
- 10 g pôdy a 50 cm³ testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:5),
- 2 g pôdy a 50 cm³ testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:25).

Minimálne množstvo pôdy, na ktorom sa môže uskutočniť experiment, závisí na laboratórnom vybavení a od účinnosti použitých analytických metód. Odporúča sa použiť aspoň 1 g, prípadne 2 g, ak sa chcú dosiahnuť presné výsledky testu.

Jedna kontrolná vzorka iba s testovanou látkou v roztoku 0,01 M CaCl₂ (bez pôdy) sa podrobí presne tomu istému postupu, aký bol použitý na test, s cieľom preskúmania stability testovanej látky v roztoku CaCl₂ a jej možnej adsorpcie na povrchoch testovacích nádob.

Čistá vzorka alebo slepý pokus s rovnakým množstvom pôdy o celkovom objeme 50 cm³ 0,01 M roztoku CaCl₂ (bez testovanej látky) sa podrobí tomu istému postupu, ako je predpísaný na test. Slúži ako spätná kontrola na pozadie počas analýzy na detekciu interferujúcich látok alebo kontaminovaných pôd.

Všetky experimenty, vrátane kontrol a slepých pokusov, by sa mali uskutočniť minimálne duplicitne. Celkový počet vzoriek, ktoré by mali byť pripravené na štúdiu, je možné vypočítať s ohľadom na metodológiu, ktorá sa bude dodržiavať.

Metódy na úvodnú štúdiu a hlavnú štúdiu sú v podstate rovnaké, výnimky sa uvádzajú iba ak je to potrebné.

Vzduchom vysušené pôdne vzorky sa ustália do rovnovážneho stavu počas noci (12 h) pred dňom experimentu, trasením, s minimálnym objemom 45 cm³ 0,01 M CaCl₂. Následne sa pridá určitý objem zásobného roztoku testovanej látky, aby sa dosiahol konečný objem 50 cm³. Tento pridaný objem pôvodného roztoku: a) by nemal prekročiť 10 % konečného 50 cm³ objemu vodnej fázy v snahe čo najmenej zmeniť podstatu preekvilibrovaného roztoku a b) mal by pokiaľ možno vyústiť do počiatočnej koncentrácie testovanej látky, ktorá je v kontakte s pôdou (C_o) aspoň o dva rády vyššie ako je hodnota veličiny na limit detekcie analytickej metódy; táto prahová hodnota zabezpečí schopnosť vykonať presné merania, aj keď sú hodnoty adsorpcie väčšie ako 90 % a následne stanoviť adsorpčné izotermy. Odporúča sa, ak je to možné, aby počiatočná koncentrácia látky (C_o) neprekročila polovicu limitu jej rozpustnosti.

Príklad, ako sa počíta koncentrácia zásobného roztoku (C_{st}), je uvedený v nasledujúcom texte nižšie. Predpokladaný detekčný limit je 0,01 µg cm⁻³ a 90 % adsorpcia: tak by počiatočná koncentrácia testovanej látky v pôde mala byť 1 µg cm⁻³ (dva rády hodnoty vyššia ako detekčný limit). Predpokladajme, že sa pridá maximálny odporúčaný objem zásobného roztoku, t. j. od 5 do 45 cm³ 0,01 M CaCl₂ rovnovážneho roztoku (= 10 % zásobného roztoku ku 50 cm³ celkového objemu vodnej fázy), koncentrácia zásobného roztoku by mala byť 10 µg cm⁻³, toto sú o tri rády vyššie hodnoty ako je detekčný limit analytickej metódy.

Meranie pH vodnej fázy je potrebné vykonať pred a po kontakte s pôdou, pretože práve toto zohráva dôležitú úlohu v celom adsorpčnom procese, špeciálne na ionizovateľné látky.

Zlúčenina je až do bodu dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy premiešavaná. Čas rovnováhy v pôdach je veľmi nestály a závisí od typu chemikálie a pôdy. Za dostatočne dlhé obdobie sa považuje 24 hodín (77). V predbežnej štúdii môžu byť vzorky zozbierané postupne počas 48 hodín miešania (napríklad pri 4, 8, 24, 48 hodinách). Aj napriek tomu by sa mal čas analýzy flexibilne zvážiť vzhľadom na pracovný program laboratória.

Sú dve možnosti, ako analyzovať testovanú látku vo vodnom roztoku: a) paralelná metóda, b) sériová metóda. Je potrebné zdôrazniť, že paralelná metóda je experimentálne viac zdĺhavá, matematické spracovanie výsledkov je jednoduchšie (dodatok 5). Výber metodológie je ponechaný na rozhodnutí experimentátora, ktorý musí zvážiť dostupné možnosti laboratórneho vybavenia a zdrojov/prostriedkov.

- a) Paralelná metóda: pripraví sa vzorky s rovnakým pomerom pôdy a roztoku, v daných časových intervaloch, tak ako to požaduje štúdia adsorpčnej kinetiky. Po ukončení odstredovania a ak je to potrebné, aj filtrácie, vodná fáza z prvej trubice sa znova čo naj dôkladnejšie použije a následne sa zmeria, napríklad po 4 hodinách, z druhej trubice po 8 hodinách a z tretej po 24 hodinách atď.
- b) Sériová metóda: pripraví sa iba duplikovaná vzorka na každý pomer pôdy a roztoku. V definovaných časových intervaloch, s cieľom oddelenia fáz, je zmes odstredovaná. Malý alikvótny podiel vodnej fázy sa ihneď analyzuje na testovanú látku, následne potom pokračuje experiment s pôvodnou látkou. Ak sa aplikuje filtrácia po odstredovaní, laboratórium by malo mať zariadenia potrebné na zaobchádzanie s malými vodnými podielmi. Odporúča sa, aby celkový objem odobratých podielov nepresiahol 1 % celkového objemu roztoku, aby sa významne nezmenil pomer pôdy a roztoku a aby sa znížilo množstvo rozpustenej látky využiteľnej na adsorpciu počas testu.

Percentuálna adsorpcia A_{t_i} sa vypočítava v každom časovom bode (t_i) na základe nominálnej počiatočnej koncentrácie a odmeranej koncentrácie v čase dávkovania (t_i) a opravenej o hodnotu slepého pokusu. Záznamy percentuálnej adsorpcie A_{t_i} oproti času (obr. 1 dodatok 5) sú vytvorené v záujme odhadu očakávaného výsledku rovnovážneho platô (¹). Hodnota K_d je vypočítaná v ekvilibriu. Na základe hodnoty K_d , sú vybrané vhodné pomery pôdy a roztoku z obr. 1 tak, že adsorpčné percento presiahne 20 % a prednostne viac ako 50 % (61). Všetky aplikovateľné rovnice a princípy zobrazenia sú udané v časti o Údajoch a záznamoch v dodatku 5.

1.9.2.2. Stanovenie rovnovážneho adsorpčného času a množstva adsorbovanej látky v stave rovnováhy

Ako už bolo spomenuté, zobrazenia A_{t_i} alebo C_{aq}^{ads} oproti času umožňuje odhad adsorpčného ekvilibria a množstvo testovanej látky adsorbovanej v ekvilibriu. Obrázky 1 a 2 nachádzajúce sa v dodatku 5 ukazujú príklady takých záznamov. Čas rovnováhy je potrebný, aby systém dosiahol platô.

Ak s určitou pôdou nie je nájdené platô, ale iba stály vzostup, môže to byť spôsobené komplikujúcimi činiteľmi, ako sú biodegradácia alebo nízka difúzia. Biodegradácia sa dá zistiť opakovaným experimentom so sterilizovanou vzorkou pôdy. Ak ani v tomto prípade nie je dosiahnuté platô, experimentátor by mal hľadať iné fenomény, ktoré by mohli byť zahrnuté v jeho špecifickej štúdii; toto by sa mohlo zabezpečiť vhodnou zmenou experimentálnych podmienok (teplota, čas premiešavania, pomery pôdy a roztoku). Je na rozhodnutí výskumného pracovníka, či je vhodné pokračovať v postupe testu aj napriek možnému zlyhaniu dosiahnutia rovnováhy.

1.9.2.3. Adsorpcia na povrchu testovacích nádobiek a stabilita testovanej látky

Niektoré informácie, týkajúce sa adsorpcie testovanej látky na povrchu testovacích nádobiek, rovnako ako aj ich stability, sa dajú odvodiť z analýzy kontrolných vzoriek. Ak sú vyčerpané všetky bežné chyby analytickej metódy, mohla by byť na príčine abiotická degradácia a/alebo adsorpcia na povrchu testovacej nádoby. Rozdiel medzi týmito dvomi faktami sa dá dosiahnuť prostredníctvom očistenia stien testovacej nádoby so známym objemom vhodného rozpúšťadla a následného vyhodnotenia roztoku použitého na vymytie nádob na obsah testovanej látky. Ak sa na povrchu testovacích látok zistí adsorpcia, rozdiel demonštruje abiotickú nestabilitu testovanej látky. Ak bola zistená takáto adsorpcia, je nevyhnutné vymeniť materiál testovacích nádob. Údaje o adsorpcii na povrchu testovacích nádob získaných z tohto pokusu nemôžu byť priamo extrapolované na pokus pôdy a roztoku.

(¹) Záznamy koncentrácie testovanej látky vo vodnej fáze C_{aq}^{ads} oproti času by sa mohli takisto použiť na odhad očakávaného výsledku rovnovážneho platô (pozri obr. 2 v dodatku 5).

Ďalšie údaje o stabilite testovanej látky je možné odvodiť pomocou určenia parentálnej hmotnej bilancie. To znamená, že vodná fáza, extrahovaná z pôdy a stien testovacej nádoby, sa analyzuje na obsah testovanej látky. Rozdiel medzi pridanou hmotou testovanej chemikálie a sumou hmoty testovaných chemikálií vo vodnej fáze, extraktami pôdy a stenami testovacích nádob je rovný hmote odbúranej a/alebo nestálej a/alebo neextrahovanej. V záujme uskutočnenia hmotnostnej rovnováhy, adsorpčné ekvilibrium by malo byť dosiahnuté počas obdobia trvania experimentu.

Je potrebné dosiahnuť hmotnostnú rovnováhu na oboch pôdach a na pomer pôdy a roztoku na každú z pôd, čím sa dosiahne zníženie presahujúce 20 % a väčšie ako 50 % ekvilibria. Akonáhle je postup na zistenie pomeru ukončený spolu s analýzou poslednej vzorky vodnej fázy po 48 hodinách, fázy sa rozdelia odstredovaním a ak je potrebné aj filtráciou. Vodná fáza sa znovu použije v takom množstve, aké je len možné a pridá sa primeraná extrakcia rozpúšťadla (extrakčný koeficient minimálne o hodnote 95 %) do pôdy na extrakciu testovanej látky. Sú odporúčané minimálne dve postupné extrakcie. Z množstva zistenej testovanej látky v pôde a v extrakte testovacích nádob sa vypočíta hmotnostná rovnováha (rovnica 10, Údaje a záznamy). Ak je táto hodnota menšia ako 90 %, testovaná látka sa považuje za nestabilnú v časovom rozpätí testu. Aj napriek tomu je možné v štúdiu pokračovať, ak sa počíta s nestabilitou testovanej látky. V prípadoch, ako bol tento, sa však odporúča analyzovať obidve fázy v hlavnej štúdiu.

1.9.2.4. Rad 2 – Adsorpčná kinetika pri jednej koncentrácii testovanej látky

Použije sa päť pôdných typov, vybratých z tabuľky 1. Je vhodné do týchto piatich pôdných typov zahrnúť niektoré alebo všetky pôdne typy použité v predbežnej štúdiu. V takomto prípade sa rad 2 nemusí opakovať pri pôdach, ktoré boli zahrnuté v predbežnej štúdiu.

Čas rovnováhy, pomer pôdy a roztoku, váha pôdnej vzorky, objem vodnej fázy v kontakte s pôdou a koncentrácia testovanej látky v roztoku sa zvolia na základe výsledkov predbežnej štúdie. Analýza by mala byť vykonaná po 2, 4, 6, 8, (možno aj po 10) a 24 hodinách kontaktného času, čas potrebný na trepanie môže byť predĺžený maximálne na 48 hodín, a to v prípade, ak chemikália vyžaduje dlhší ekvilibračný čas, rešpektujúc tak výsledok nájdeného pomeru. Aj napriek tomu by sa mal čas určený na analýzu flexibilne zvážiť.

Každý experiment (raz pôda a raz roztok) sa realizuje aspoň dvakrát, čo umožní stanoviť odchýlky výsledkov. Do každého pokusu sa zahrnie aj jeden blank – slepý pokus. Tento pozostáva z pôdy a roztoku 0,01 M CaCl₂, bez testovanej látky a váhy a objemu, respektívne je identický s tými, ktoré boli použité v experimente. Na kontrolnú vzorku s obsahom iba testovanej látky v roztoku 0,01 M CaCl₂ (bez pôdy) sa odporúča použiť ten istý testovací postup ako poistku pred niečím neočakávaným.

Adsorpčné percento sa vypočíta v každom časovom bode A_t a/alebo časovom intervale A_{t_i} (podľa potreby) a je zaznamenávané oproti času. Distribučný koeficient K_d v ekvilibriu, tak ako aj organický uhlík normalizovaný adsorpčný K_{oc} (pre nepolárne organické chemikálie) sa taktiež vypočítajú.

Výsledky testu adsorbčnej kinetiky

Lineárna hodnota K_d je obvyčajne vhodná na opísanie sorpčného správania v pôdach (35), (78) a reprezentuje vyjadrenie vlastnej pohyblivosti chemikálie v pôde. Napríklad vo všeobecnosti chemikálie s $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ sú hodnotené ako kvalitatívne mobilné. Podobne aj mobilná klasifikačná schéma založená na hodnotách K_d bola získaná MacCall *et al.* (16). Dodatočne existujúce lúhovacie klasifikačné schémy sú založené na vzťahu medzi hodnotou K_{oc} a DT-50 ⁽¹⁾ (32), (79).

Podľa štúdie chybných analýz (61) sa nedajú K_d hodnoty pod $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ správne odhadnúť z poklesu koncentrácie vo vodnej fáze, aj keď je použitý najvhodnejší pomer pôdy a roztoku (z pohľadu presnosti), t. j. 1:1. V takomto prípade sa odporúča analýza oboch fáz, pôdy aj roztoku.

S ohľadom na uvedené sa odporúča, aby sa štúdia adsorpčného správania chemikálie v pôde a jej možná pohyblivosť doplnila o presné stanovenie Freundlichovej adsorbčnej izotermu u tých systémov, u ktorých je možné presné stanovenie hodnoty K_d za použitia postupu experimentálneho protokolu popísaného v tejto metóde. Presné stanovenie je možné v prípade, ak je hodnota výsledkov získaných násobením hodnôt K_d a pomeru pôdy a roztoku väčšia ako 0,3 v prípade, ak sú merania založené na koncentračnom poklese vo vodnej fáze (nepriama metóda), alebo ak je táto hodnota väčšia ako 0,1, v prípade analýzy oboch fáz (priama metóda) (61).

⁽¹⁾ DT-50: čas rozkladu (degradation time) 50 % testovanej látky.

1.9.2.5. Rad 3 – Adsorpcné izotermy a desorpčná kinetika/desorpcné izotermy

1.9.2.5.1. Adsorpcné izotermy

Používa sa päť testovaných koncentrácií látok, obsahujúcich dva rády veličín, pri voľbe týchto koncentrácií by sa mala vziať do úvahy rozpustnosť vo vode a výsledná koncentračná rovnováha. Je potrebné zachovať rovnaký pomer pôdy a roztoku pre danú pôdu počas celej štúdie. Adsorpcný test sa vykoná tak, ako bolo spomenuté, s jediným rozdielom, a to, že vodná fáza sa analyzuje iba raz v čase nevyhnutnom na dosiahnutie rovnováhy, ako bolo uvedené v Rade 2. Rovnovážne koncentrácie v roztoku sú určené a množstvo adsorbovanej látky sa vypočíta zo straty testovanej látky v roztoku alebo priamou metódou. Adsorbovaná hmotnosť na jednotku hmotnosti pôdy je znázornená ako funkcia rovnovážnej koncentrácie testovanej látky (pozri Údaje a správa).

Výsledky experimentu adsorpcnej izotermy

Medzi matematickými adsorpcnými modelmi doteraz navrhnutými, Freundlichova izoterma je jedna z najčastejšie používaných na opísanie adsorpcných procesov. Detailnejšie informácie na interpretáciu a dôležitosť adsorpcných modelov sú uvedené v použitej literatúre (41), (45), (80), (81), (82).

Poznámka: Je potrebné uviesť, že porovnanie hodnôt K_F (Freundlichovho adsorpcného koeficientu) pre rôzne látky je možné iba v prípade, ak sú tieto hodnoty K_F vyjadrené v rovnakých jednotkách (83).

1.9.2.5.2. Desorpčná kinetika

Účelom tohto postupu je pozorovanie, či sú chemikálie reverzibilne alebo ireverzibilne adsorbované v pôde (na pôdnych vzorkách). Táto informácia je dôležitá, keďže desorpčný proces zohráva dôležitú úlohu pri správaní sa chemikálií na pôdu v teréne. A navyše, desorpčné údaje sú užitočné vstupy do počítačových modelov na simuláciu procesu lúhovania a rozpúšťacieho procesu. Ak sa požaduje desorpčná štúdia, odporúča sa, aby bola štúdia opísaná vopred pred vykonaním testu na každý systém, na ktorý sa stanovuje presná hodnota K_d pri vykonaní testu adsorpcnej kinetiky.

Podobne pri adsorpcnej kinetickej štúdii sú dve varianty na vykonanie kinetického experimentu: a) paralelná metóda a b) sériová metóda. Výber metodológie bude ponechaný na experimentátora, ktorý posúdi možné laboratórne vybavenie a zdroje.

- a) Paralelná metóda: pre každú vzorku, ktorá bola vybraná na vykonanie desorpčnej štúdie, sa pripraví vzorky s tým istým pomerom pôda a roztok, a to toľkokrát, v koľkých časových intervaloch sa požaduje študovať desorpčnú kinetiku. Preferujú sa tie isté časové intervaly, ako by boli použité pri experimente adsorpcnej kinetiky; hoci celkový čas môže byť predĺžený pri meraní v závislosti od dosiahnutia rovnováhy systému. Pri každom pokuse (jedna pôda, jeden roztok) prebehne jeden slepý pokus. Každý pokus sa skladá z pôdy a 0,01 M roztoku CaCl_2 bez testovanej látky, hmotnosti a objemu, respektívne je identický s experimentom. Kontrolná vzorka ako testovacia látka v 0,01 M CaCl_2 v roztoku (bez soli) sa podrobí tomu istému testovaciemu postupu. Všetky zmesi pôdy s roztokom sa budú vytrepávať až do dosiahnutia adsorpcnej rovnováhy (ako je to uvedené v časti rad 2). Potom sa fázy oddelia odstredovaním a vodná fáza sa oddelí tak, ako je to najlepšie možné. Oddelený roztok sa nahradí rovnakým objemom 0,01 M CaCl_2 v destilovanej vode bez testovacej látky a nová zmes sa znovu vytrepe. Vodná fáza z prvej trubice sa získa tak dôkladne, ako je to možné a odmeria sa po napr. 2 hodinách, z druhej trubice po 4 hodinách a z tretej po 6 hodinách atď., až kým sa nedosiahne desorpčná rovnováha.
- b) Sériová metóda: po experimente adsorpcnej kinetiky sa zmes odstredí a vodná fáza sa oddelí tak, ako je to najlepšie možné. Oddelený objem roztoku sa nahradí rovnakým objemom 0,01 M CaCl_2 bez testovacej látky. Nová zmes sa znovu vytrepe, až kým sa nedosiahne desorpčná rovnováha. Počas tohto časového intervalu sa bude zmes odstredovať, aby sa oddelili fázy. Malé alikvotné množstvo sa ihneď analyzuje na testovaciu látku; potom experiment pokračuje s pôvodnou zmesou. Objem každej alikvotnej časti by mal byť menší než 1 % z celkového objemu. Také isté množstvo čerstvého roztoku 0,01 M CaCl_2 sa pridá do zmesi, aby sa dodržal pomer na pôdu a roztok a vytrepávanie pokračuje až do ďalšieho časového intervalu.

Percento desorpcie sa vypočíta na každý meraný čas (bodovite) D_{t_i} a/alebo aj časový interval $D_{\Delta t_i}$ (podľa potrieb štúdie) a zaznamenáva sa proti času. Rovnovážny desorpčný koeficient K_{des} sa taktiež vypočíta. Všetky aplikovateľné rovnice sú uvedené v časti „Údaje a správa“ a v dodatku 5.

Výsledky z experimentu desorpčnej kinetiky

Bežné záznamy percenta desorpcie D_{t_i} a adsorpcie A_{t_i} voči času umožňujú stanoviť reverzibilitu adsorpčného procesu. Ak desorpčná rovnováha dosiahne dvakrát čas adsorpčnej rovnováhy a celková desorpcia je väčšia než 75 % adsorbovaného množstva, adsorpcia sa považuje za reverzibilnú.

1.9.2.5.3. Desorpčná izoterma

Na pôdach, ktoré sa používajú na adsorpčno izotermický experiment, sa stanovujú Freundlichove desorpčné izotermy. Desorpčný test sa uskutoční podľa postupu uvedeného v časti „Desorpčná kinetika“ s jedným rozdielom, že vodná fáza sa analyzuje iba raz pri desorpčnej rovnováhe. Desorbované množstvo testovanej látky sa určí výpočtom. Množstvo adsorbovanej látky, ktorá sa zadrží na pôde pri desorpčnej rovnováhe, sa zaznamená ako funkcia rovnovážnej koncentrácie testovanej látky v roztoku (pozri časť „Výsledky a správa“ a v dodatku 5).

2. ÚDAJE A SPRÁVA

Analytické výsledky sa udávajú v tabuľkovej forme (pozri dodatok 6). Zadávajú sa jednotlivé merania a vypočítané priemery. Adsorpčné izotermy sa znázorňujú graficky. Výpočty sa robia podľa postupu, ktorý je uvedený nižšie.

Na účel tohto testu je určené, že hmotnosť 1 cm³ vodného roztoku je 1 g. Pomer pôdy a roztoku by sa mohol vyjadriť v hmotnostných alebo objemových jednotkách s tými istými číslami.

2.1. ADSORPCIA

Adsorpcia A_{t_i} je definovaná ako percento adsorbovanej látky na pôdu, ktoré sa vzťahuje na množstvo prítomné na počiatku testu podľa podmienok testu. Ak je testovacia látka stála a neadsorbuje sa viditeľne na stenách nádob, A_{t_i} sa vypočíta na každý časový bod t_i podľa rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

kde:

A_{t_i} = adsorpčné percento na časový bod t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = hmotnosť adsorbovanej testovanej látky na pôdu v čase t_i (μg);

m_0 = hmotnosť testovanej látky v testovacej trubke na začiatku testu (μg).

Podrobné informácie, ako sa dá vypočítať percento adsorpcie A_{t_i} pre paralelné a sériové metódy, je uvedený v dodatku 5.

Distribučný koeficient K_d je pomer medzi obsahom látky v pôdnej fáze a hmotnostnou koncentráciou látky vo vodnom roztoku za podmienok testu v stave dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

kde:

$C_s^{ads}(eq)$ = obsah látky adsorbovanej na pôde pri adsorpčnej rovnováhe (μg g⁻¹);

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze pri adsorpčnej rovnováhe (μg cm⁻³). Táto koncentrácia sa stanoví pomocou hodnôt získaných zo slepého pokusu

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = obsah látky adsorbovanej na pôde pri adsorpčnej rovnováhe (μg);
 $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = obsah látky adsorbovanej v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (μg);
 m_{soil} = množstvo pevnej fázy, vyjadrenej ako sušina (suchá pôda) (g);
 V_o = počiatočný objem vodnej fázy v styku s pôdou (cm^3).

Vťah medzi A_{eq} a K_d je daný

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_o}{m_{\text{soil}}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

kde:

A_{eq} = percento adsorpcie pri adsorpčnej rovnováhe, %.

Organický uhlík normalizovaný adsorpčný koeficient K_{oc} súvisí s distribučným koeficientom K_d k obsahu organického uhlíka vo vzorke pôdy:

$$K_{\text{oc}} = K_d \cdot \frac{100}{\% \text{OC}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (6)$$

kde:

$\% \text{OC}$ = percento organického uhlíka vo vzorke pôdy (g g^{-1}).

K_{oc} koeficient predstavuje jednoduchú hodnotu, ktorá charakterizuje účasť vo väčšine nepolárnych organických zlúčenín medzi organickým uhlíkom v pôde alebo sedimentom a vodou. Adsorpcia týchto chemikálií sa koreluje na obsah organicky sorbujúcej tuhej látky (7), kde hodnoty K_{oc} závisia od špecifických charakteristík glejovitých frakcií, ktoré sa významne odlišujú v sorpčnej kapacite vzhľadom na odlišnosti v pôvode, vývoji atď.

2.1.1. Adsorpčné izotermy

Rovnica pre Freundlichove adsorpčné izotermy súvisí s množstvom adsorbovanej testovanej látky ku koncentrácii testovanej látky v roztoku pri rovnováhe (rovnica 8).

Výsledky sa triedia ako „adsopcia“ a na každú testovaciu trubicu, obsah adsorbovanej testovanej látky na pôdu po adsorbčnom teste [$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$], je niekde inde označená ako x/m sa vypočíta. Predpokladá sa, že rovnováha bola dosiahnutá a $C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ reprezentuje hodnotu rovnováhy:

$$C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{soil}}} = \frac{[C_o - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] \cdot V_o}{m_{\text{soil}}} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Freundlichova adsorpčná rovnica je zobrazená v (8).

$$C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_F^{\text{ads}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

alebo v lineárnom tvare:

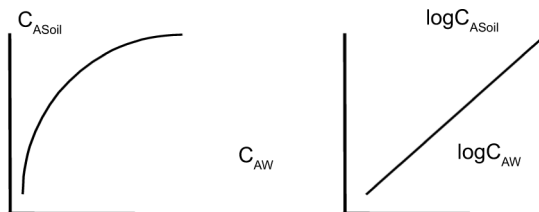
$$\log C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \log K_F^{\text{ads}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (9)$$

kde:

K_F^{ads} = Freundlichov adsorbčný koeficient; jeho rozmer je $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$. Len ak $1/n = 1$; vo všetkých ostatných prípadoch strmost $1/n$ je daná rozmerom $K_F^{\text{ads}} (\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{ g}^{-1})$;

n = regresná konštanta; $1/n$ bežný rozsah je v rozpätí 0,7 – 1,0, indikuje, že sorpčné údaje sú často mierne nelineárne.

Rovnice (8) a (9) sú zaznamenané a hodnoty K_F^{ads} a $1/n$ sú vypočítané regresnou analýzou s využitím rovnice (9). Korelačný koeficient r^2 z logaritmickej rovnice je tiež vypočítaný. Príklad takéhoto zobrazenia je na obr.2.



Obr. 2. Freundlichova adsorpčná krivka normálna a linearizovaná

2.1.2. Hmotnostná bilancia

Hmotnostná bilancia (MB) je definovaná ako percento látky, ktorá môže byť analyticky obnovená po adsorpcii testu oproti počiatočnému množstvu látky na začiatku testu.

Spracovanie výsledkov sa bude líšiť, ak je rozpúšťadlo kompletne miešateľné s vodou. V prípade vodou miešateľného rozpúšťadla je spracovanie výsledkov opísané v časti „Opis“, môže byť aplikované na stanovenie množstva látky obnovennej po extrakcii rozpúšťadla. Ak je rozpúšťadlo menej miešateľné s vodou, stanovenie/určenie obnoveného množstva sa musí stanoviť.

Hmotnostná bilancia MB na adsorpciu sa vypočíta nasledovne: vychádza sa z toho, že údaj (m_E) korešponduje so sumou hmotností testovaných chemikálií extrahovaných z pôdy a povrchu testovaných pojiť s rozpúšťadlom.

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

kde:

MB = hmotnostná bilancia (%);

m_E = celková hmotnosť testovanej látky vyextrahovanej z pôdy a stien testovacej nádoby v dvoch krokoch (μg);

C_0 = počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku v styku s pôdou ($\mu g \text{ cm}^{-3}$);

V_{rec} = objem kalu obnoveného po adsorpčnej rovnováhe (cm^3).

2.2. DESORPCIA

Desorpcia (D) je definovaná ako percento testovanej látky, ktoré je desorbované, vzťahnuté ku kvantite látky, ktorá bola adsorbovaná predtým za testovacích podmienok.

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (11)$$

kde:

D_{t_i} = desorpčné percento v jednotkovom bode/čase t_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy v časovom bode t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky adsorbovanej do pôdy pri adsorpčnej rovnováhe (μg).

Podrobné informácie o tom, ako sa má postupovať pri výpočte percenta desorpcie D_{t_i} paralelnej a sériovej metóde, sú uvedené v dodatku 5.

Zjavný desorpčný koeficient (K_{des}) je, za podmienok testu, pomer medzi obsahom lát zadržanej v pôde a hmotnostnou koncentráciou desorbovanej látky vo vodnom roztoku dosiahnutí desorpčnej rovnováhy.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

kde:

K_{des} = desorpčný koeficient ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);
 $m_{aq}^{des}(eq)$ = celková hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy pri desorpčnej rovnováhe (μg);
 V_T = celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas desorpčných kinetických testov (cm^3).

Návod na výpočet $m_{aq}^{des}(eq)$ je uvedený v dodatku 5, v časti pod názvom „Desorpcia“.

Poznámka

Ak bol urobený adsorpčný test, ktorý sa vykonal paralelnou metódou, objem V_T v rovnici 12 by mal byť rovnaký s objemom V_o .

2.2.1. Desorpčné izotermy

Rovnica pre Freundlichove desorpčné izotermy udáva vzťah obsahu testovanej látky, zadržanej adsorpciou na vzorke pôdy, ku koncentrácii testovanej látky v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (rovnica 16).

Pre každú testovaciu trubicu sa obsah látky zadržanej adsorpciou na pôdnej vzorke pri desorpčnej rovnováhe vypočíta nasledovne:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ je definovaná ako:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \frac{V_o}{V_r^F} - m_{aq}^A (\mu\text{g}) \quad (14)$$

kde:

$C_s^{des}(eq)$ = obsah testovanej látky zadržanej na pôdnej vzorke pri desorpčnej rovnováhe ($\mu\text{g g}^{-1}$);
 $m_m^{des}(eq)$ = hmotnosť látky stanovenej analyticky vo vodnej fáze pri desorpčnej rovnováhe (μg);
 m_{aq}^A = hmotnosť zostatkovej testovanej látky po adsorpčnej rovnováhe ku nekompletnému náhradnému objemu (μg);
 $m_{aq}^{des}(eq)$ = hmotnosť látky v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_o - V_R}{V_o} \right) \quad (15)$$

V_r^F = objem odobratého roztoku z trubice na stanovenie testovanej látky pri adsorpčnej rovnováhe (cm^3);
 V_R = objem glejovitého roztoku odobratého z trubice po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradení toho istého objemu 0,01M roztokom CaCl_2 (cm^3);

Freundlichova desorpčná rovnica je v (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

alebo v lineárnom tvare:

$$\log C_s^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_F^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

kde:

K_F^{des} = Freundlichov desorpčný koeficient;

n = regresná konštanta;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze pri desorpčnej rovnováhe ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Rovnice 16 a 17 sa môžu znázorniť a hodnoty K_F^{des} a vypočítajú sa z regresnej analýzy použitím rovnice 17.

Poznámka

Ak Freundlichov adsorpčný alebo desorpčný exponent $1/n$ je rovný 1, Freundlichova adsorpčná alebo desorpčná väzobná konštanta (K_F^{ads} a K_F^{des}) bude rovná adsorbčnej a desorpčnej rovnovážnej konštante (K_d a K_{des}) respektívne, a záznamy C_s a C_{aq} budú lineárne. Ak exponent nie je rovný 1, záznamy C_s a C_{aq} nebudú lineárne a adsorpčná a desorpčná konštanta sa budú meniť pozdĺž izotermy.

2.2.2. Správa z testu

Správa z testu má obsahovať nasledovné informácie:

- kompletnú identifikáciu použitých pôdnych vzoriek vrátane:
- geografické odkazy o mieste (zemepisná šírka, zemepisná dĺžka),
- dátum vzorkovania,
- použitý vzor (poľnohospodárska pôda, les atď.),
- hĺbka vzorkovania,
- obsah piesku (bahna alebo ílu),
- pH hodnoty (v 0,01 M CaCl_2),
- obsah organického uhlíka,
- obsah organickej hmoty,
- obsah dusíka,
- pomer C/N,
- kapacita výmeny kationov (mmol/kg),
- všetky informácie súvisiace s kumuláciou, skladovaním pôdnych vzoriek,
- kde je to vhodné, všetky relevantné informácie na interpretáciu adsorpcie/desorpcie testovanej látky,
- odkazy na metódy použité pre stanovenie každého parametra,

- informácie o testovanej látke, ak je to potrebné,
- teplota pri experimente,
- podmienky na odstredžovanie,
- analytický postup použitý na analýzu testovanej látky,
- rozhodnutie o výbere rozpúšťacieho činidla na prípravu zásobného roztoku testovanej látky,
- ak je to relevantné, uviesť korelácie robené výpočtom,
- údaje v súlade s prepisom ako je to v dodatku 6 a grafické znázornenie,
- všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov testu.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

- (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.
- (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 (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
- (8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
- (9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
- (11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
- (12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

- (13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83 – 122.
- (14) Hassett 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.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 Schiefferrstein 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.
- (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)-1,3,5-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.
- (27) 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.

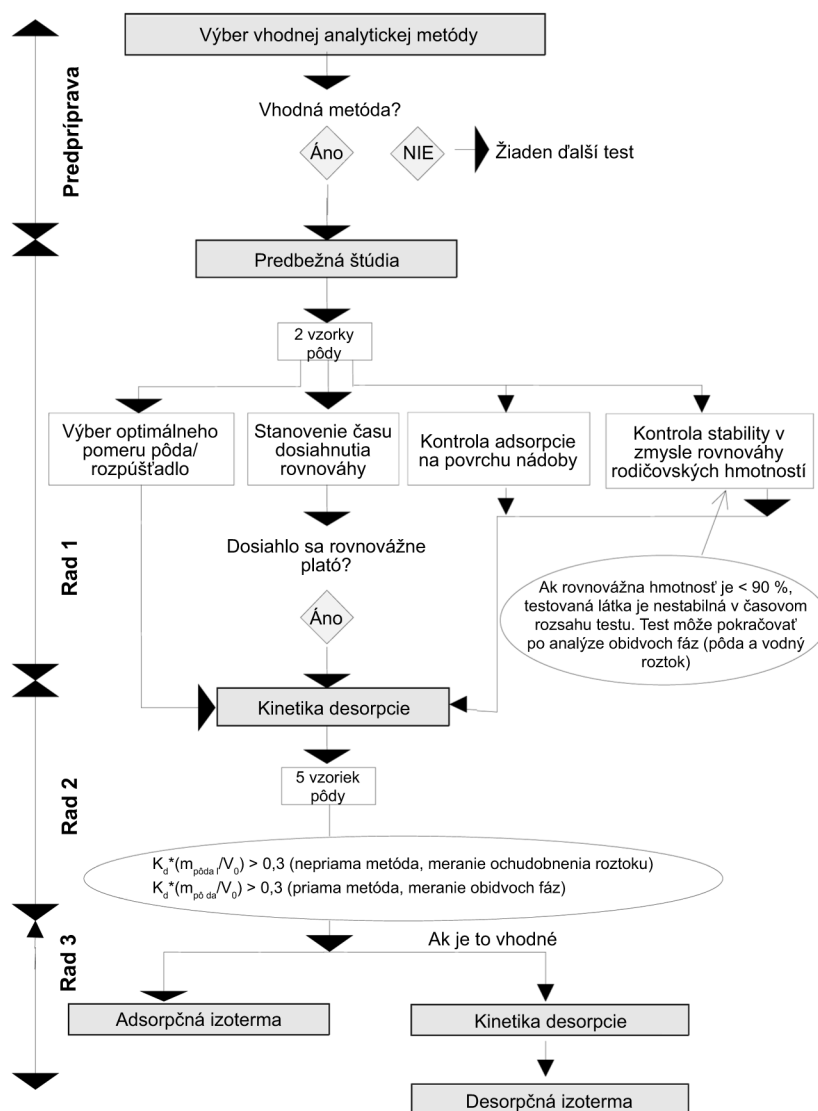
- (32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability“. *J. Environ. Toxic. Chem.*, 8(4), pp. 339 – 357.
- (33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. *J. of Soil Sci.*, 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 Karickhoff 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.
- (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 S 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.
- (53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality S Sampling S Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- (54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality S Sampling S Part 2: Guidance on sampling techniques.
- (55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality S Sampling S Part 3: Guidance on safety of sampling.
- (56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality S Sampling S Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- (57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality S Sampling S Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.³
- (58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality S Sampling S 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.

- (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 – 832.3
- (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) M., Kôrdel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493 – 2504.
- (75) Kôrdel W., Kotthoff G., Muller M. (1995), „HPLC Š screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil S results of a ring test“. *Chemosphere* 30 (7), pp. 1373 – 1384.
- (76) Kôrdel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC Š screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil S comparison of different stationary phases“. *Chemosphere* 27 (12), str. 2341 – 2352.
- (77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. *Weed Research*, Vol. 7, str. 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, str. 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.* str. 3973 – 93.
- (82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques generales de l'adsorption“. *Ann. Agron.* 31: str 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).

DODATOK 1

Schéma testu



DODATOK 2

VPLYV PRESNOSTI ANALYTICKEJ METÓDY A KONCENTRAČNÝCH ZMIEN NA PRESNOSŤ VÝSLEDKOV ADSORPCIE

Z nasledujúcej tabuľky (8.4) vyplýva, že rozdiel medzi počiatočnou hmotnosťou ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) a rovnovážnou hmotnosťou ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$) testovanej látky v roztoku je veľmi malý, 5 % odchýlka pri meraní výsledkov rovnovážnej hmotnosti sa prejaví 50 % odchýlkou vo výpočte hmotnosti látky absorbovanej v pôde ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) a 52,4 % vo výpočte K_d .

Množstvo pôdy $m_{\text{pôda}} = 10 \text{ g}$
 Objem roztoku $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg)	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg)	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R‡	K_d^*	R‡
PRE A = 9 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ alebo $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	100	1,000	skutočná hodnota	10	1,00	skutočná hodnota	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 %
PRE A = 55 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ alebo $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	50,0	0,500	skutočná hodnota	60,0	6,00	skutočná hodnota	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 %
PRE A = 99 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ alebo $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	1,100	0,011	skutočná hodnota	108,9	10,89	skutočná hodnota	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 %

kde:

$$*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}} \cdot K_d = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnosť testovanej látky v pôde v rovnovážnom stave, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnosť látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy, μg ;

$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = obsah testovanej látky v pôdnej fáze v rovnovážnom stave, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnej fáze v rovnovážnom stave, $\mu\text{g cm}^{-3}$

R = analytická odchýlka pri stanovení $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R‡ = vypočítaná odchýlka spôsobená analytickou chybou R.

DODATOK 3

TECHNIKA ODHADU K_d

1. Technika odhadu umožňuje predpoklad K_d na základe korelácie, napr. s hodnotami P_{ow} (12), (39), (63 – 68), s údajmi o rozpustnosti vo vode (12), (19), (21), (39), (68 – 73) alebo s údajmi o polarite získanými uplatnením HPLC na obrátených fázach (74 – 76). Ako je vidieť z tabuliek 1 a 2, hodnoty K_{oc} a K_{om} sa vypočítavajú podľa týchto rovníc a potom nepriamo, K_d podľa týchto rovníc:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)}$$

$$K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)}$$

2. Podstata týchto korelácií je založená na dvoch predpokladoch: (1) na organickej podstate pôdy, hlavne jej vplyvoch na adsorpciu látky a (2) na interakciách, hlavne medzi nepolárnymi látkami. Výsledkom týchto korelácií je: (1) nie sú alebo sú iba do istej miery aplikovateľné na polárne látky a (2) sú neaplikovateľné v prípadoch, kde obsah organickej látky v pôde je veľmi malý (12). Okrem toho, hoci medzi P_{ow} a adsorpciou (19) bola zistená uspokojivá súvzťažnosť, to isté sa nedá tvrdiť o vzťahu medzi rozpustnosťou vo vode a rozpätím adsorpcie (19), (21); keďže sú štúdie ohľadom tejto témy veľmi protichodné.
3. V tabuľkách 1 a 2 sú uvedené niektoré príklady korelácií medzi adsorpčným koeficientom a rozdeľovacím koeficientom pre oktanol-voda, ako aj rozpustnosť vo vode.

Tabuľka 1

Príklady korelácií medzi adsorpčným koeficientom a rozdeľovacím koeficientom pre oktanol-voda, ďalšie príklady pozri (12) (68).

Látky	Korelácie	Autori
Substituované močoviny	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Chlórované aromáty	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Rôzne prípravky na ochranu rastlín	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromatické uhľovodíky	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabuľka 2

Príklady korelácií medzi adsorpčným rozdeľovacím koeficientom a rozpustnosťou vo vode; ďalšie príklady pozri (68) (69).

Látky	Korelácie	Autori
Rôzne prípravky na ochranu rastlín	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984)(66)
Alifatické, aromatické chlórované látky	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α -naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Cyklické, alifatické aromatické látky	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 \text{ (mp-25)}$	Karickhoff(1981)(72)
Rôzne zlúčeniny	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

DODATOK 4

VÝPOČTY NA DEFINOVANIE PODMIENOK ODSREDŽOVANIA

1. Čas odstredžovania je stanovený nasledujúcim vzorcom za predpokladu, že častice majú sférický tvar:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Na zjednodušenie sú všetky parametre popísané v jednotkách SI (g, cm).

Kde:

ω = rýchlosť rotácie ($= 2 \pi \text{ rpm}/60$), rad s^{-1} ;
 rpm = počet otáčok za minútu;
 η = viskozita roztoku, $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
 r_p = polomer častice, cm;
 ρ_s = hustota pôdy (merná hmotnosť), g cm^{-3} ;
 ρ_{aq} = hustota roztoku (merná hmotnosť), g cm^{-3} ;
 R_t = vzdialenosť od stredu rotora odstredivky po vrchol roztoku v odstredžovacej skúmavke, cm;
 R_b = vzdialenosť od stredu rotora odstredivky po spodok roztoku v odstredžovacej skúmavke, cm;
 $R_b - R_t$ = výška stĺpca zmesi pôdy a roztoku v odstredžovacej skúmavke, cm.

V bežnej praxi sa používa dvojnásobok vypočítaného času odstredžovania, aby sa zaistila úplná separácia.

2. Rovnica (1) sa dá ďalej zjednodušiť, ak budeme považovať dynamickú viskozitu (η) a hustotu [mernú hmotnosť] (ρ_{aq}) roztoku za rovnú dynamickej viskozite a hustote vody pri 25 °C, teda $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g.s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g.cm}^{-3}$.

Potom je čas odstredžovania daný rovnicou (2):

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

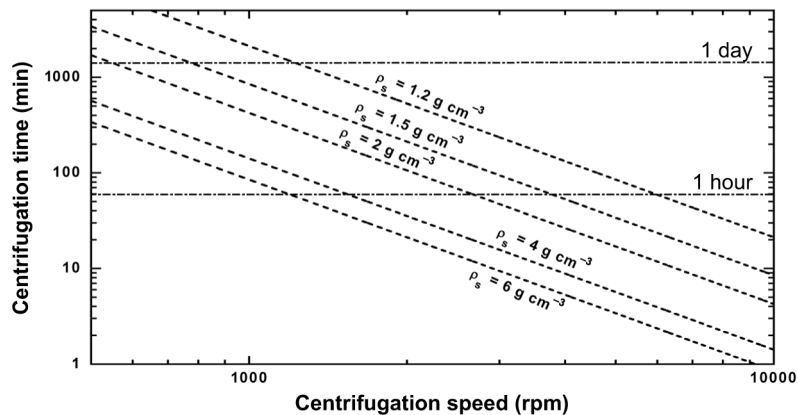
33. Z rovnice (2) je zrejmé, že nasledujúce dva parametre sú dôležité na definovanie podmienok odstredžovania, t. j. čas (t) a rýchlosť (rpm), aby sa dosiahla separácia častíc so špecifickou veľkosťou (v našom prípade priemer častíc 0,1 μm): merná hmotnosť pôdy a (2) výška stĺpca zmesi v odstredžovacej skúmavke ($R_b - R_t$), t. j. vzdialenosť, ktorú častica pôdy pokrýva od vrcholu roztoku po spodok skúmavky; je zrejmé, že pre stály objem bude výška stĺpca v skúmavke závisieť od štvorca polomeru skúmavky.

4. Obr. 1 predstavuje variácie v čase odstredžovania (t) verzus rýchlosť (rpm) pri rôznych hodnotách mernej hmotnosti pôdy (ρ_s) (obr. 1a) a rôzne výšky stĺpcov zmesi v odstredžovacej skúmavke (obr. 2a). Z obr. 1a je vidieť, že vplyv mernej hmotnosti pôdy sa stáva očividným; napr. pri klasickom odstredžovaní pri 3000 otáčkach/min. je čas odstredžovania približne 240 min. pri mernej hmotnosti pôdy 1,2 g cm^{-3} , zatiaľ čo pri mernej hmotnosti pôdy rovnajúcej sa 2,0 g cm^{-3} je to iba 50 min. Podobne (obr. 1b) pri klasickom odstredžovaní pri 3000 otáčkach/min. je čas odstredžovania približne 50 min. pri výške stĺpca zmesi 10 cm a iba 7 min. pri výške stĺpca 1 cm. Je však dôležité nájsť optimálny vzťah medzi odstredžovaním, ktoré vyžaduje najmenšiu možnú výšku stĺpca a ľahkou manipuláciou pre experimentátora pri oddeľovaní fáz po odstredžovaní.

5. Okrem toho, pri definovaní experimentálnych podmienok na separáciu fáz pôdy a roztoku je dôležité vziať do úvahy možnú existenciu tretej „pseudofázy“ koloidov. Tieto častice, s veľkosťou menšou ako 0,2 μm môžu mať významný vplyv na celý mechanizmus adsorpcie látky v pôdnej suspenzii. Po ukončení odstredžovania, ako je popísané vyššie, koloidy zostávajú vo vodnej fáze a sú podrobené analýze spolu s vodnou fázou. Takto sa stratí informácia o ich vplyve.

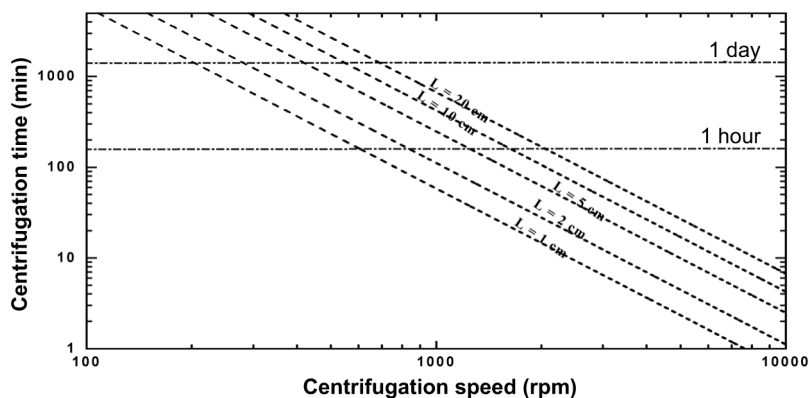
Ak má riadiace laboratórium veľkú odstredivku alebo možnosť ultrafiltrácie, adsorpcia/desorpcia látky vo vode sa dá preskúmať do väčšej hĺbky vrátane informácií o adsorpcii látky na koloidoch. V tomto prípade sa ultraodstredivka nastaví na 60 000 otáčok/min alebo sa použije ultrafiltrácia s filtrom o porozite/veľkosti pórov/100 000 daltonov, aby sa oddelili tri fázy – pôda, koloidy, roztok. Podľa toho sa upraví aj protokol o výsledkoch testu, aby sa všetky tri fázy stali súčasťou analýzy.

Obr. 1a



Variácie času odstred'ovania (t) verus rýchlosť odstred'ovania (rpm) na rôzne merné hmotnosti pôdy (ρ_s). $R_t = 10$ cm, $R_b - R_t = 10$ cm, $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$ g s $^{-1}$ cm $^{-1}$ a $\rho_{aq} = 1,0$ g.cm $^{-3}$ pri 25 °C.

Obr. 1b

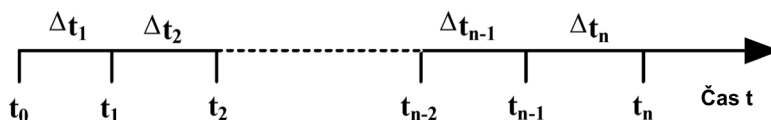


Variácie času odstred'ovania (t) verus rýchlosť odstred'ovania (rpm) na rôzne výšky stĺpca zmesi v odstred'ovacej skúmavke ($R_b - R_t$) = L ; $R_t = 10$ cm; $\eta = 0,89 \times 10^{-3}$ g s $^{-1}$ cm $^{-1}$, $\rho_{aq} = 1,0$ g.cm $^{-3}$ pri 25 °C a $\rho_s = 2,0$ g cm $^{-3}$.

DODATOK 5

VÝPOČET ADSORPCIE A (%) A DESORPCIE D (%)

Časová schéma postupu je:



Pri všetkých výpočtoch sa predpokladá, že testovaná látka je stabilná a vo väčšej miere sa neadsorbuje na stenách nádoby.

ADSORPCIA A (A %)

a) Paralelná metóda

Percento adsorpcie sa vypočíta na každú testovanú skúmavku (i) v každom časovom bode (t_i) podľa rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Členy tejto rovnice sa dajú vypočítat takto:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \text{ (}\mu\text{g)} \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \text{ (}\mu\text{g)} \quad (3)$$

kde:

A_{t_i} = percento adsorpcie [%] v časovom bode t_i ;

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = hmotnosť testovanej látky v pôde v čase t_i , analýza je (μg);

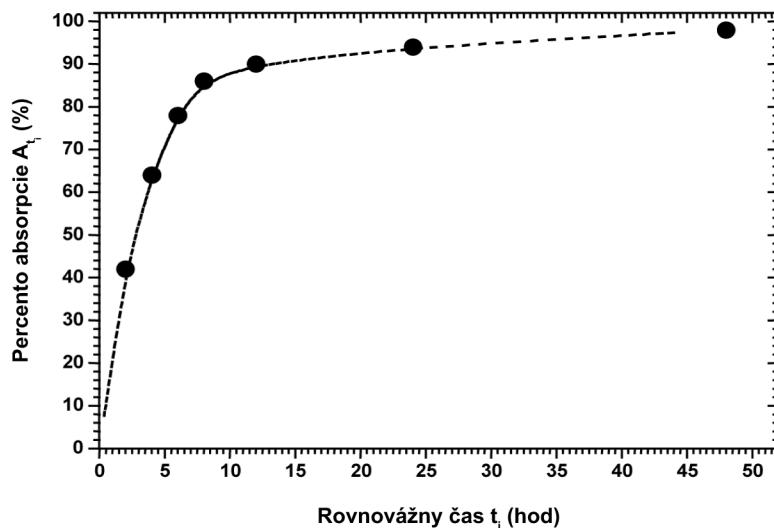
m_0 = hmotnosť testovanej látky v testovanej skúmavke na začiatku testu (μg);

C_0 = počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku, ktorý je v kontakte s pôdou ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v čase t_i , analýza je ukončená ($\mu\text{g cm}^{-3}$); táto koncentrácia sa stanovuje analyticky tak, že sa vezmú do úvahy hodnoty uvedené zo slepých pokusov

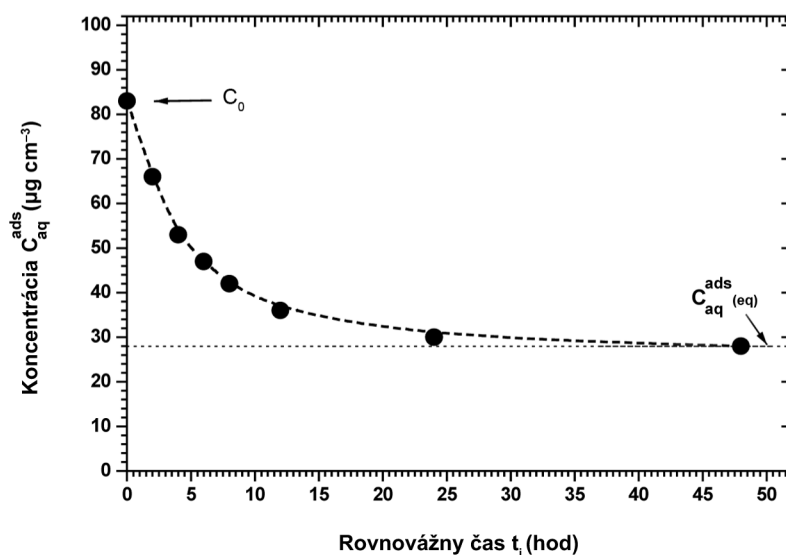
V_0 = počiatočný objem testovaného roztoku, ktorý je v kontakte s pôdou (cm^3).

Hodnoty percenta adsorpcie A_{t_i} alebo $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ sú zobrazené verzus čas a čas, po ktorom sa dosiahne sorpčná rovnováha, je stanovený. Príklady takýchto grafov sú uvedené v obr. 1 a 2.



Obr. 1

Graf adsorpčnej rovnováhy



Obr. 2

Závislosť hmotnostnej koncentrácie testovanej látky vo vodnej fáze (C_{aq}) od časub) *Sériová metóda*

Pri nasledujúcich rovniciach platí, že adsorpčná metóda sa vykonáva meraním testovanej látky v malých alikvotných častiach vodnej fázy za určitých časových intervalov.

— množstvo látky adsorbovanej na pôde počas každého časového intervalu sa vypočíta nasledovne:

— pre prvý časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

- pre druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

- pre tretí časový interval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (6)$$

- pre tretí časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (7)$$

- percento adsorpcie v každom časovom intervale $A_{\Delta t_i}$ sa vypočíta podľa nasledujúcej

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (8)$$

pričom percento adsorpcie A_{t_i} v časovom bode t_i je dané vyššie uvedenou rovnicou:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (9)$$

Hodnoty percenta adsorpcie A_{t_i} alebo $A_{\Delta t_i}$ (s ohľadom na potreby štúdie) sú zaznamenané oproti času a čas, po ktorom sa dosiahla sorpčná rovnováha, je stanovený.

- V rovnovážnom čase t_{eq} :

- hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôde je:

$$m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

- hmotnosť testovanej látky v roztoku je:

$$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)$$

- percento adsorpcie v rovnováhe je:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (12)$$

Vyššie uvedené parametre sa definujú ako:

$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v časových intervaloch $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ jednotlivo (μg);

$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky meraná v alikvótnych častiach V_a^A v časových bodoch $t_1, t_2, \dots, t_n$ jednotlivo (μg);

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnosť látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

V_a^A = objem alikvotnej časti, v ktorej je testovaná látka meraná (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = percento adsorpcie zodpovedajúce časovému intervalu Δt_i (%);

A_{eq} = percento adsorpcie v čase adsorpčnej rovnováhy (%).

DESORPCIA D (%)

Čas t_0 , v ktorom začína experiment na určenie desorpčnej kinetiky, sa považuje ten moment, v ktorom je nahradený maximálny objem roztoku testovanej látky rovnakým objemom roztoku 0,01 M CaCl₂.

a) *Paralelná metóda*

V časovom bode t_i sa hmotnosť testovanej látky meria vo vodnej fáze vybratej zo skúmavky i (V_r^i) a desorbovaná hmotnosť sa vypočíta podľa vzorca:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Pri desorpčnej rovnováhe platí, že $t_i = t_{eq}$, a teda $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Hmotnosť testovanej látky desorbovanej počas intervalu (Δt_i) je daná rovnicou:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Percento desorpcie sa vypočíta:

v časovom bode t_i podľa rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (15)$$

v časovom intervale (Δt_i) podľa rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (16)$$

kde:

D_{t_i} = percento desorpcie v časovom bode t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = percento desorpcie zodpovedajúce časovému intervalu Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = hmotnosť testovanej látky desorbovanej v časovom bode t_i (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = hmotnosť látky desorbovanej na pôde v časovom intervale Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = analyticky stanovená hmotnosť testovanej látky nameraná v časovom bode t_i a v roztoku V_r^i , ktorý bol analyzovaný (μg);

m_{aq}^A = hmotnosť testovanej látky, ktorá zostala z adsorpčnej rovnováhy kvôli nedokončenej substitúcii objemu (μg);

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

V_R = objem kalu odstráneného zo skúmavky po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradeného rovnakým objemom 0,01 M CaCl₂ (cm^3);

V_r^i = objem roztoku odohraného zo skúmavky i) na meranie testovanej látky v experimente desorpčnej kinetiky (cm^3).

Hodnoty desorpcie D_{t_i} alebo $D_{\Delta t_i}$ (podľa potrieb štúdie) sú zobrazené verzus čas a čas, po ktorom je dosiahnutá desorpčná rovnováha, je stanovený.

b) *Sériová metóda*

Nasledujúce rovnice zohľadňujú to, že adsorpčné postupy, ktoré predchádzali, boli uskutočnené meraním testovanej látky v malom alikvotnom objeme (v_a^A) vodnej fázy (sériová metóda v 1.9 Vykonanie testu). Predpokladá sa, že a) objem kalu odstráneného zo skúmavky po pokuse na získanie adsorpčnej kinetiky bol nahradený rovnakým objemom 0,01 M CaCl_2 roztoku (V_R) a b) celkový objem vodnej fázy, ktorá je v kontakte s pôdou (V_T), zostáva konštantná počas pokusu na získanie adsorpčnej kinetiky a je vyjadrená rovnicou:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

časovom bode t_i :

- hmotnosť testovanej látky meraná v malom alikvotnom objeme (v_a^D) a desorbovaná hmotnosť sa vypočítajú podľa rovnice:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- v desorpčnej rovnováhy $t_i = t_{eq}$ a preto $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

- percento desorpcie D_{t_i} sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \text{ (%) } \quad (20)$$

V časovom intervale pre tretí časový interval (Δt_i):

- pre prvý časový interval $\Delta t_i = t_i - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- pre druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \text{ and } m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

- pre n-tý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \right] \text{ and } m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Nakoniec, percento desorpcie v každom časovom intervale $D_{\Delta t_i}$ sa vypočíta pomocou nasledujúcej rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (24)$$

zatiaľ čo percento desorpcie D_{t_i} v každom časovom bode t_i je dané rovnicou:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (25)$$

kde sú vyššie uvedené parametre definované nasledovne:

- $m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), \dots, m_s^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky, ktorá zostáva absorbovaná na pôde po časových intervaloch $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ jednotlivo (μg);
 $m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), \dots, m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnosť testovanej desorbovanej látky počas časových intervalov $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ jednotlivo (μg);
 $m_m^{des}(t_1), m_m^{des}(t_2), \dots, m_m^{des}(t_n)$ = hmotnosť látky meranej v alikvótnej časti (v_a^D) v časovom bode $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ jednotlivo (μg);
 V_T = celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas pokusu na získanie desorpčnej kinetiky vykonaného sériovou metódou (cm^3);
 m_{aq}^A = hmotnosť látky, ktorá zostala z adsorpčnej rovnováhy kvôli neukončenej substitúcii objemu (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 = objem kalu odstráneného zo skúmavky po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradeného rovnakým objemom 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);
 v_a^D = objem alikvotnej časti odobratej na analytické použitie zo skúmavky (i) počas pokusu na zistenie desorpčnej kinetiky vykonaného sériovou metódou (cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

DODATOK 6

ADSORPCIA – DESORPCIA V PÔDE: PREHLAD ÚDAJOV

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12h): %

Teplota: °C

Vhodnosť analytickej metódy

Odvážená pôda	g	
Hmotnosť suchej pôdy	g	
Objem roztoku CaCl ₂	cm ³	
Menovitá koncentrácia finálneho roztoku	µg cm ⁻³	
Analytická koncentrácia finálneho roztoku	µg cm ⁻³	

Princíp použitej analytickej metódy:

Kalibrácia použitej analytickej metódy:

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): %

Teplota: °C

Druh analytickej metodológie:

nepriam ☐paralelná ☐sériová ☐priama ☐

Adsorpčný test: testované vzorky

	Symbol	Jednotky	Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas	
Skúmavka č.										
Odvážená pôda	—	g								
Pôda: suchá hmotnosť	m _{pôda}	g								
Objem vody v odváženej vode (vypočítany)	V _{ws}	cm ³								

	Symbol	Jednotky	Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas	
Objem 0,01 M CaCl ₂ roztoku v rovnovážnej pôde		cm ³								
Objem zásobného roztoku		cm ³								
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	V ₀	cm ³								
Počiatková koncentrácia testovaného roztoku	C ₀	µg cm ³								
Hmotnosť testovanej látky na začiatku testu	m ₀	µg								

Po vytrepávaní a odstred'ovaní

NEPRIAMA METÓDA

Paralelná metóda

Koncentrácia testovanej látky, vodná fáza, korekcia slepých pokusov	C _{aq} ^{ads} (t _i)	µg cm ⁻³								

Sériová metóda

Nameraná hmotnosť testovanej látky v alikvotnom objeme V _a ^A	m _m ^{ads} (t _i)	µg								

PRIAMA METÓDA

Hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôde	m _s ^{ads} (t _i)	µg								

Vypočet adsorpcie

Adsorpcia	A _{t_i}	%								
	A _{Δt_i}	%								
Hodnoty										
Koeficient adsorpcie	K _d	cm ³ g ⁻¹								
Hodnoty										
Koeficient adsorpcie	K _{oc}	cm ³ g ⁻¹								
Hodnoty										

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): %

Teplota: °C

Test adsorpcie: slepé pokusy a kontrola

	Sym- bol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrola	
Skúmavka č.								
Hmotnosť pôdy		g					0	0
Množstvo vody v odváženej pôde (vypočítané)		cm ³					—	—
Objem 0,01 M CaCl ₂ pridaného roztoku		cm ³						
Objem zásobného roztoku pridanej testovanej látky		cm ³	0	0				
Celkový objem vodnej fázy (vypočítaný)		cm ³					—	—
Počiatková koncentrácia testovanej látky vo vodnej fáze		µg cm ⁻³						
Po vytrepávaní a odstredovaní								
Koncentrácia vo vodnej fáze		µg cm ⁻³						

Pozn. Pridajte kolónky, ak je to potrebné.

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C 12 h): %

Teplota: °C

Hmotnostná bilancia

	Symbol	Jednotky				
Skúmavka č..						
Odvážená pôda	—	g				
Pôda: suchá hmotnosť	m _{pôda}	g				
Objem vody v odváženej pôde (vypočítané)	V _{ws}	ml				
Objem 0,01 M CaCl ₂ roztoku v rovnovážnej pôde		ml				
Objem zásobného roztoku		cm ³				
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	V ₀	cm ³				
Počiatková koncentrácia testovaného roztoku	C ₀	µg cm ⁻³				
Rovnovážny čas	—	h				

Po vytrebaní a odstred'ovaní						
Koncentrácia testovanej látky vodná fáza, vrátane korekcie rovnováhy slepého pokusu	$C_{aq}^{ads} (eq)$	$\mu g\ cm^{-3}$				
Rovnovážny čas	t_{eq}	h				
Prvé riedenie s rozpúšťadlom						
Nahradený objem vodnej fázy	V_{rec}	cm^3				
Pridaný objem rozpúšťadla	ΔV	cm^3				
Prvá extrakcia s rozpúšťadlom						
Signál analyzovaný v rozpúšťadle	S_{E1}	rôzne				
Koncentrácia testovanej látky v rozpúšťadle	C_{E1}	$\mu g\ cm^{-3}$				
Hmotnosť látky extrahovanej z pôdy a zo stein nádoby	m_{E1}	μg				
Druhé riedenie s rozpúšťadlom						
Nahradený objem vodnej fázy	ΔV_s	cm^3				
Pridaný objem vodnej fázy	$\Delta V'$	cm^3				
Druhá extrakcia s rozpúšťadlom						
Signál analyzovaný v rozpúšťadle	S_{E2}	var.				
Koncentrácia testovanej látky v rozpúšťadle	C_{E2}	$\mu g\ cm^{-3}$				
Hmotnosť látky extrahovanej z pôdy a zo stein nádoby	m_{E2}	μg				
Celková hmotnosť testovanej látky extrahovanej v dvoch krokoch	m_E	μg				
Hmotnostná bilancia	MB	%				

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): %

Teplota: °C

Adsorpčná izoterma

	Symbol	Jednotky								
Skúmavka č.										
Odvážená pôda	—	g								
Pôda: suchá hmotnosť	E	g								

	Symbol	Jednotky								
Objem vody v odváženej pôde (vypočítané)	V_{ws}	cm^3								
Objem 0,01 M CaCl_2 roztoku v rovnovážnej pôde		cm^3								
Pridaný objem zásobného roztoku		cm^3								
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou (vypočítaný)	V_0	cm^3								
Počiatková koncentrácia testovaného roztoku	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$								
Rovnovážny čas	—	h								

Po vytrepaní a odstredovaní

Koncentrácia látky vodná fáza, vrátane korekcie slepého pokusu	$C_{aq}^{ads}(\text{eq})$	$\mu\text{g cm}^{-3}$								
Teplota		$^{\circ}\text{C}$								
Adsorpčná hmotnosť na jednotke pôdy	$C_s^{ads}(\text{eq})$	$\mu\text{g g}^{-1}$								

Regresná analýza:

Hodnota K_F^{ads} :Hodnota $1/n$:Regresný koeficient r^2 :

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 $^{\circ}\text{C}$, 12 h): %Teplota: $^{\circ}\text{C}$ Druh analytickej metodológie: nepriama ☐ paralelná ☐ sériová ☐**Desorpčný test**

	Symbol	Jednotka	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Skúmavka č. vystupujúca z adsorpčného testu						
Hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v čase adsorpčnej rovnováhy	$m_s^{ads}(\text{eq})$	μg				
Nahradený objem vodnej fázy, nahradený objem 0,01 M CaCl_2	V_R	cm^3				
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	PM SM	V_0 V_T	cm^3 cm^3			

	Symbol	Jednotka	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Hmotnosť testovanej látky odloženej počas adsorpčnej rovnováhy kvôli nedokončenej substitúcii objemu	m_{aq}^A	μg				

Desorpčná kinetika

Nameraná hmotnosť látky desorbovaná z pôdy v čase t_i	$m_m^{\text{des}}(t_i)$	μg				
Objem roztoku odobraný zo skúmavky i) s cieľom merania testovanej látky	PM	V_r^i	cm^3			
	SM	v_a^D	cm^3			
Hmotnosť látky desorbovanej z pôdy v čase t_i (nameraná)	$m_{aq}^{\text{des}}(t_i)$	μg				
Hmotnosť látky desorbovanej z pôdy v časovom intervale Δt_i (nameraná)	$m_{aq}^{\text{des}}(\Delta t_i)$	μg				

Percento desorpcie

Desorpcia v čase t_i	D_{t_i}	%				
Desorpcia v časovom intervale Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Zdanlivý desorpčný koeficient	K_{des}					

PM: paralelná metóda

SM: sériová metóda

C.19. **ODHAD ADSORPČNÉHO KOEFICIENTU (K_{oc}) V PÔDE A V SPLAŠKOVOM KALE ZA POUŽITIA VYSOKOÚČINNNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE/HPLC/**

1. **METÓDA**

Táto metóda je totožná s metódou OECD TG121 (2001).

1.1. **ÚVOD**

Sorpčné správanie sa látok v pôde a splaškových kaloch môže byť opísané cez experimentálne stanovené parametre v zmysle testovacej metódy C.18. Dôležitým parametrom je adsorpčný koeficient, ktorý je definovaný ako pomer medzi koncentráciou látky v pôde/splaškoch a koncentrácie látky vo vodnej fáze pri adsorpčnej rovnováhe. Adsorpčný koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíka v pôde K_{oc} je vhodný indikátor väzbovej kapacity chemikálií na organické látky z pôdy/splaškov a dovoľuje urobiť porovnania rôznymi chemikáliami. Tento parameter môže byť odhadnutý cez korelácie s rozpustnosťou vo vode a n-oktanol/voda rozdeľovacím koeficientom (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

Experimentálna metóda opísaná v tomto teste používa vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu/HPLC/na odhadnutie adsorpčného koeficientu K_{oc} v pôde a splaškových kaloch (8). Odhady sú vyššej spoľahlivosti ako tie z QSAR výpočtov (9). Metóda odhadov nemôže úplne nahradiť série rovnovážnych experimentov používaných v testovacej metóde C.18. Avšak odhadnutý K_{oc} môže byť osožný pri vyberaní vhodných parametrov testu na štúdie adsorpcie/desorpcie podľa testovacej metódy C.18 vypočítaním K_d (distribučný koeficient) alebo K_f (Freundlichov adsorpčný koeficient) podľa rovnice 3 (pozri sekciu 1.2).

1.2. **DEFINÍCIE**

K_d : Distribučný koeficient je definovaný ako pomer rovnovážnej koncentrácie C rozpustenej testovacej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom zo sorbentu/pôda alebo splaškové kaly/a pôdnej fázy; je to bezrozmerná veličina, keď koncentrácie v oboch fázach sú vyjadrené na základe hmotnosť/hmotnosť. V prípade koncentrácie vo vodnej fáze je daná na základe hmotnosť/objem, potom jednotky sú ml.g^{-1} . K_d sa môže meniť s vlastnosťou sorbentu a môže byť závislé od koncentrácie.

$$K_d = \frac{C_{soil} \text{ or } C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

kde:

$C_{pôda}$ = koncentrácia testovacej látky v pôde pri rovnováhe ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

C_{kal} = koncentrácia testovacej látky v kale pri rovnováhe ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

C_{aq} = koncentrácia testovacej látky vo vodnej fáze pri rovnováhe ($\mu\text{g.g}^{-1}$, $\mu\text{g.ml}^{-1}$)

K_f : Freundlichov adsorpčný koeficient je definovaný ako koncentrácia testovacej látky v pôde alebo splaškovom kale (x/m), keď rovnovážna koncentrácia C_{aq} vo vodnej fáze je rovná 1; jednotky sú $\mu\text{g.g}^{-1}$ sorbent. Hodnota sa môže meniť s vlastnosťami sorbentu.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_{aq} \quad (1)$$

kde:

x/m = množstvo testovacej látky x (μg) adsorbované na množstve sorbentu m (g) pri rovnováhe

$1/n$ = nábeh Freundlichovej adsorpčnej izotermy

C_{aq} = koncentrácia testovacej látky vo vodnej fáze pri rovnováhe ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)

$$\text{At } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc} : Distribučný koeficient (K_d) alebo Freundlichov adsorpčný koeficient (K_f) normalizovaný na obsah organického uhlíka (f_{oc}) v sorbente, predovšetkým na neionizované chemikálie, je to vhodný indikátor na stupeň adsorpcie medzi látkou a sorbentom a umožňuje urobiť porovnania medzi rôznymi chemikáliami. V závislosti od rozmeru/jednotiek, v ktorých sú udávané (K_d a K_f , K_{oc}) môže byť bezrozmerný alebo mať jednotku (ml.g^{-1}) alebo ($\mu\text{g.g}^{-1}$) organickej látky.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \left(\text{bezrozmerný alebo } \text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \right) \text{ alebo } \frac{K_f}{f_{oc}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (3)$$

Vzťah medzi K_{oc} a K_d nie je vždy lineárny a preto K_{oc} hodnota sa môže meniť z pôdy na pôdu, ale ich variabilita je značne redukovaná porovnaním K_d alebo K_f hodnôt.

Adsorpčný koeficient (K_{oc}) je odvodený z kapacitného faktora (k') využívajúceho kalibračnú závislosť $\log k'$ versus $\log K_{oc}$ na vybrate referenčné zlúčeniny.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kde:

t_R = HPLC retenčný čas testovacej a referenčnej látky (minúty)

t_0 = HPLC mŕtvy čas (minúty) (pozri odsek 1.8.2)

P_{ow}: Rozdeľovací koeficient na systém oktanol – voda je definovaný ako pomer koncentrácií rozpustených látok v n-oktanele a vo vode – je to bezrozmerná hodnota.

$$P_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Štruktúrny vzorec, čistota a disociačná konštanta látok (ak je to vhodné) by mali byť známe pred použitím metódy. Informácia o rozpustnosti vo vode a v organických rozpúšťadlách, o rozdeľovacom koeficiente na systém oktanol – voda a hydrolyzačné charakteristiky sú vhodné.

Aby sme priviedli do vzájomného vzťahu FTPLC – retenčné údaje testovacej látky s jeho adsorpčným koeficientom, K_{oc} , bol stanovený kalibračný graf ako $\log K_{oc} = f(\log k')$. Mal by byť zostrojený minimálne so šiestich referenčných bodov, najmenej jeden bod nad a jeden pod očakávanou hodnotou na testovaciu látku. Presnosť metódy sa značne zlepši, ak sa použijú referenčné látky, ktorých štruktúra je príbuzná testovacej látke, štruktúre. Ak nie sú tieto údaje dostupné, potom je na užívateľovi, ktorý musí vybrať vhodné kalibračné látky. V tomto prípade bol vybraný obvyklejší set štruktúrovo heterogénnych látok. Látky a hodnoty K_{oc} , ktoré môžu byť použité, sú vypísané v dodatku v tabuľke 1 pre splaškové kaly a v tabuľke 3 pre pôdu. Výber iných kalibračných látok by mal byť opodstatnený.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

FTPLC je vykonávaná na analytických kolónach naplnených s komerčne dostupnou tuhú fázou kyanopropylom obsahujúcou lipofilické a pólové podiely. Je používaná mierne pólová stacionárna fáza zakotvená na kremičitanovej matici.

– O – Si	– CH ₂ – CH ₂ – CH ₂	– CN
silica	nepólová zložka	pólová skupina

Princíp testovacej metódy je podobný testovacej metóde A.8 (rozdeľovací koeficient, FTPLC metóda). Zatiaľ čo v tom čase prechádza cez kolónu spolu s mobilnou fázou, testovacia látka je interaktívna so stacionárnou fázou. Dvojité zloženie stacionárnej fázy, ktorá má polárny aj nepolárny charakter, umožňuje interakcie pólových aj nepólových skupín v molekule podobnou cestou ako v prípade organickej látky v pôdach alebo v splaškovo kalových maticiach. Toto umožňuje utvoriť vzťah medzi retenčným časom na kolóne a adsorpčným koeficientom z organickej látky.

pH má značný vplyv na sorpčné správanie sa predovšetkým na pólové látky. Pre poľnohospodársku pôdu alebo nádrže čistiarní odpadových vôd pH sa normálne mení pH v rozmedzí pH = 5,5 – 7,5. Pre ionizovateľné látky by mali byť vykonané dva testy s obidvoma, ionizovanou a neionizovanou formou, vo vhodnom tlmiacom roztoku, ale iba v prípade, keď najmenej 10 % testovacej zlúčeniny bude disociované v rozmedzí pH od 5,5 do 7,5.

Odkedy sa využíva na vyhodnotenie len vzťah medzi retenciou na HPLC kolóne a adsorpčným koeficientom, nevyžaduje sa žiadna kvalitatívna analytická metóda a je potrebné iba stanovenie retenčného času. Ak je dostupný vhodný set referenčných látok a môžu byť použité štandardné experimentálne podmienky, metóda poskytuje rýchlu a účinnú cestu na odhad adsorpčného koeficientu K_{oc} .

1.5. APLIKOVATELNOST TESTU

HPLC metóda je aplikovateľná na chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je dostupný vhodný detekčný systém (napr. spektrofotometer, radiačný detektor (a ktoré sú dostatočne stabilné počas trvania experimentu. Môže byť hlavne použitá na chemikálie, ktoré môžeme ťažko študovať pomocou iných experimentálnych systémov (napr. prchavé látky, ktoré nie sú rozpustné vo vode v koncentráciách, ktoré môžu byť merané analyticky. Látky s vysokou afinitou voči povrchu inkubačných systémov). Metóda môže byť použitá pri zmesiach, ktoré dávajú nerozlišené elučné skupiny. V takomto prípade najvyšší a najnižší limit na hodnotu $\log K_{oc}$ pre zlúčeniny v zmesi by mal byť daný.

Nečistoty môžu niekedy spôsobiť problémy pri interpretácii výsledkov z HPLC, ale majú iba malý význam, ak testovacia látka je jednoznačne analyticky identifikovaná a oddelená od nečistôt.

Metóda je platná na látky v tabuľke 1 v dodatku a bola tiež aplikovaná na rôzne iné chemické látky prislúchajúce do nasledujúcich chemických skupín:

- aromatické amíny (napr. trifluralín, 4-chlóranilín, 3,5-dinitroanilín, 4-metylanilín, N-metylanilín, 1-naftylamín),
- estery aromatických karboxylových kyselín (napr. metylester kyseliny benzoovej, etylester kyseliny 3,5-dinitrobenzovej),
- aromatické uhľovodíky (napr. toluén, xylén, etylbenzén, nitrobenzén,
- estery aryloxyfenoxy propionovej kyseliny (napr. diclofop-metyl, fenoxaprop-etyl, fenoxaprop-P-etyl),
- benzimidazol a imidazolové fungicídy (napr. carbendozim, fuberidazol, trianoxid),
- amidy karboxylových kyselín (napr. 2-chlórbenzamid, N,N-dimetylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),
- chlórované uhľovodíky (napr. endosulfan, DDT, hexachlórbenzén, chintozén, 1,2,3-trichlórbenzén),
- organofosforečné insekticídy (napr. azinofos-metyl, disulfoton, fenamiphos, izofens, pyra-zofos, sulprofos, triazofos),
- fenoly (napr. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlórofenol, 2,4,6-trichlórofenol, 1-naftol),
- deriváty fenyľmočoviny (napr. izoproturon, monolinuron, pencycuron),
- pigmenty farbív (napr. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)
- polyaromatické uhľovodíky (napr. acenaftén, naftalén),
- 1,3,5-trianzínové herbicídy (napr. prometrín, propazin, simazín, terbutrín),
- triazolové deriváty (napr. tebucanozol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Táto metóda nie je použiteľná na látky, ktoré reagujú s hociktorým z eluentov alebo so stacionárnou fázou. Tiež nie je aplikovateľná na látky, ktoré reagujú špecifickým spôsobom s anorganickými zložkami (napr. formácia klastrových komplexov s ílovými minerálmi). Metóda nemusí fungovať na povrchovo aktívne látky, anorganické zlúčeniny a slabé alebo silné organické kyseliny a zásady. Hodnota $\log K_{oc}$ môže byť stanovená

v rozmedzí od 1,5 do 5,0. Ionizovateľné látky musia byť merané za použitia tlmiacej mobilnej fázy, ale treba dbať, aby sa zabránilo zväžaniu tlmiačich zložiek roztoku alebo testovanej látky.

1.6. KRITÉRIÁ KVALITY

1.6.1. Presnosť

Obvykle môže byť adsorpčný koeficient testovacej látky odhadnutý v medziach $\pm 0,5$ log jednotky hodnoty, stanovenej sériou rovnovážnej metódy (pozri tabuľka 1 v dodatku). Vyššia presnosť môže byť dosiahnutá, ak sú použité referenčné látky s podobnou štruktúrou ako testovacia látka.

1.6.2. Opakovateľnosť

Stanovenie by sa malo vykonať najmenej dvakrát. Hodnoty $\log K_{oc}$ odvodené z jednotlivých meraní by mali byť v rozmedzí 0,25 log jednotky.

1.6.3. Reprodukovateľnosť

Doteraz nadobudnutá skúsenosť v používaní metódy potvrdzuje jej platnosť. Overovanie HPLC metódy, pri ktorej bolo použitých 48 látok (väčšinou pesticídov), na ktoré boli spoľahlivé dáta K_{oc} v pôdach dostupné, získal sa korelačný koeficient $R = 0,95$ (10), (11).

Vykonan sa vnútrolaboratórny porovnávaci test s 11 účastníckymi laboratóriami, aby sa zdokonalila validovacia metóda. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2 v dodatku.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. Predbežný odhad adsorpčného koeficientu

Rozdeľovači koeficient na systém oktanol/voda P_{ow} ($= K_{ow}$) a v určitej miere rozpustnosť vo vode môže byť použitý ako indikátor stupňa adsorpcie, predovšetkým pre neionizovateľné látky, a preto môže byť použitý na predbežné hľadanie rozsahu vhodných korelácií. Množstvo vhodných korelácií bolo publikovaných na niekoľko rôznych skupín chemikálií (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

1.7.2. Zariadenie

Vyžaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený bezpulzovou pumpou a vhodným detekčným zariadením. Odporúča sa použitie dávkovacieho ventilu s dávkovacou slučkou. Môže byť použitá komerčná kyano-propylová chemicky viazaná silica na kremičitanovom základe (napr. Hypersil a Zorbax KN). Medzi injekčný/dávkovací systém a analytickú kolónu môže byť umiestnená ochranná kolóna (predkolóna) z rovnakého materiálu ako analytická kolóna. Kolóny od rôznych dodávateľov sa môžu významne líšiť v ich separačnej účinnosti. Ako príklad – nasledujúci kapacitný faktor k' sa dosiahne: $\log k' > 0,0$ pre $\log K_{oc} = 3,0$ a $\log k' > -0,4$ pre $\log K_{oc} = 2,0$. Ak použijeme ako mobilnú fázu metanol/voda v pomere 55 ku 45 %.

1.7.3. Mobilné fázy

Bolo testovaných niekoľko mobilných fáz a nasledujúce dve sú odporúčané:

- metanol/voda (55/45 % objemových),
- metanol/0,01 M citrátový tlmivý roztok pH = 6,0 (55/45 % objemových).

Metanol, destilovaná voda alebo citrátový tlmivý roztok – stupne pre HPLC sa používajú na prípravu elučného rozpúšťadla. Zmes je pred použitím odplynená. Použije sa izokratické eluovanie. Ak zmesi etanol/voda nie sú vhodné, môžeme odskúšať iné zmesi organická látka/voda, napr. etanol/voda alebo acetonitril/voda. Pre iónové zlúčeniny sa odporúča používať tlmiace roztoky, aby sa stabilizovalo pH roztoku. Pozor treba dávať, aby sme sa vyhli vyzrážaniu soli alebo znečisteniu kolóny, čo sa môže vyskytnúť pri niektorých zmesiach organická fáza/tlmivý roztok.

Nemôžu byť používané žiadne aditíva, pretože môžu ovplyvniť sorpčné vlastnosti stacionárnej fázy, takže zmeny stacionárnej fázy môžu byť ireverzibilné. Z tohto dôvodu je dané, že experimenty, v ktorých sa používajú aditíva, sa vykonávajú na separátnych kolónach.

1.7.4. **Rozpúšťadlá**

Testovacie a referenčné látky by mali byť nerozpustné v mobilnej fáze.

1.8. **VYKONANIE TESTU**

1.8.1 **Podmienky testu**

Teplota počas merania by mala byť zapisovaná. Veľmi odporúčame používať oddelene kolónu s kontrolovanou teplotou, aby sa zistili konštantné podmienky počas kalibrácie, chodu na odhad a merania testovacej látky.

1.8.2. **Stanovenie mŕtveho času t_0**

Na stanovenie mŕtveho času t_0 môžu byť použité dve rôzne metódy (pozri odsek 1.2).

1.8.2.1. *Stanovenie mŕtveho času t_0 v zmysle homologického radu.*

Tento postup bol preverený, aby poskytoval spoľahlivú a štandardizovanú hodnotu t_0 – mŕtveho času. Podrobne pozri testovaciu metódu A.8: rozdeľovací koeficient (n-oktanol/voda), HPLC metóda.

1.8.2.2. *Stanovenie mŕtveho času pomocou inertnej látky, ktorá nie je zadržovaná na kolóne.*

Táto technika je založená na nastreknutí roztoku formamidu, močoviny alebo dusičnanu sodného. Meranie je potrebné vykonať najmenej dvakrát.

1.8.3. **Stanovenie retenčného času t_R**

Retenčné látky by mali byť vybrané ako bolo popísané v odseku 1.3. Môžu byť nadávkované ako zmiešané štandardy na stanovenie ich retenčných časov. Bolo potvrdené, že retenčný čas každého referenčného štandardu je neovplyvnený prítomnosťou iných referenčných štandardov. Kalibrácia by sa mala vykonávať v pravidelných intervaloch najmenej dvakrát denne, aby sme vysvetlili neočakávané zmeny v účinnosti kolóny. Kalibrácia – nadávkovanie kalibračnej zmesi. Kalibračnú zmes by sme mali nadávkovať pred a po dávkovaní testovacej látky, aby sme si potvrdili, že retenčné časy sa neposúvajú. Testovacie látky sa dávajú osobitne v množstve tak malom ako je to možné, aby sme sa vyhli preťaženiu kolóny a stanovia sa retenčné časy.

Aby sme zvýšili spoľahlivosť merania, stanovenie by malo byť vykonané najmenej dvakrát. Hodnota $\log K_{oc}$ získaná z jednotlivých meraní by mala spadať do rozmedzia 0,25 log jednotky.

1.8.4. **Vyhodnotenie**

Kapacitné faktory k' sú vypočítané z mŕtveho času t_0 a retenčných časov t_R vybraných referenčných látok podľa rovnice 4/pozri odsek 12/. $\log k'$ údaje referenčných látok sú uvedené oproti ich $\log K_{oc}$ hodnotám na sériu rovnovážnych pokusov/experimentov/daných v tabuľke 1 a 3 v dodatku. Využívajúc tento graf je hodnota $\log k'$ testovacej látky potom použitá na stanovenie jeho hodnoty $\log K_{oc}$. Ak aktuálne výsledky ukazujú, že $\log K_{oc}$ testovacej látky je mimo kalibračný rozsah, test by sa mal zopakovať s použitím inej vhodnej testovacej látky.

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

Správa musí zahŕňať nasledujúce informácie:

- identitu testovacích alebo referenčných látok a ich čistotu, hodnotu pK_a , ak je relevantná,
- opis zariadenia a pracovné podmienky, napr. typ a rozmery analytickej predkolóny, spôsob detekcie, mobilnú fázu (pomer zložiek a pH), rozsah teplôt počas merania,

- mŕtvý čas a metódu použítú na jeho stanovenie,
- množstvá testovacích a referenčných látok vstupujúcich do kolóny,
- retenčné časy referenčných zlúčenín použitých na kalibráciu,
- detaily získanej regresnej krivky ($\log k'$ vs $\log K_{oc}$) a graf regresnej krivky,
- priemer retenčných údajov a odhad $d \log K_{oc}$ hodnoty na testovaciu zlúčeninu,
- chromatogramy.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

- (1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.
- (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, s. 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, s. 227 – 231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, s. 297 – 312.
- (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, s. 833 – 846.
- (8) W. Kõrdel, 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), s. 121 – 128.
- (9) M. Mueller, W. Kõrdel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), s. 2493 – 2504.
- (10) W. Kõrdel, 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), s. 2341 – 2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kõrdel, 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, s. 285 – 304.
- (12) W. Kõrdel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373 – 1384.

DODATOK

Tabuľka 1

Porovnanie K_{oc} hodnôt na pôdne a splaškové kaly a vypočítané hodnoty podľa skrínigovej HPLC metódy ⁽¹⁾ ⁽²⁾

Látka	Číslo CAS	log K _{oc} splaškové kaly	log K _{oc} HPL C	Δ	log K _{oc} pôdy	log K _{oc} HPL C	Δ
atrazín	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
fention	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
fenyl ester kyseliny benzoovej	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
acetanilíd	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
anilín	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichlóranilín	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), s. 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), s. 107 – 119.

Tabuľka 2

Výsledky laboratórnych porovnávacích testov (11 zúčastnených laboratórií) vykonaných s cieľom vylepšiť a potvrdiť platnosť HPLC-metódu ⁽¹⁾

Látka	Číslo CAS	log K _{oc}	K _{oc}	log K _{oc}
		[OECD 106]	[HPLC-metóda]	
atrazín	1912-24-9	1,81	78 + 16	1,89
monuron	150-68-5	1,99	100 + 8	2,00
triapentenol	77608-88-3	2,37	292 + 58	2,47
linuron	330-55-2	2,59	465 + 62	2,67
fention	55-38-9	3,31	2062 + 648	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), s. 1373 – 1384.

Tabuľka 3

Odporúčané referenčné látky na skríningovú HPLC metódu vychádzajúcu z adsorpčných údajov na pôdu

Referenčná látka	Číslo CAS	log K _{oc} hodnoty dávok	číslo K _{oc} údajov	log S.D.	Zdroj
acetanilid	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-dimetylmenezamid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metylbenezamid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
metylbenzoan	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
atrazín	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
anilín	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
triazooxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
naftalén	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
metfiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3 -trichlorbenzén	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
fention	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
priama červen 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-endosulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
diclofop-metyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
fenantrén	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
basic blue 41 zmes	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	(a)
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.

(c) Údaje poskytnuté priemyslom.

C.20. REPRODUKČNÝ TEST NA DAPHNIA MAGNA

1. METÓDA

Táto testovacia metóda reprodukčnej toxicity je totožná s metódou OECD TG 211 (1998).

1.1. ÚVOD

Prvotným cieľom testu je odhadnúť vplyv chemických látok a prípravkov na reprodukčný výstup *Daphnia magna*.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Rodičovské živočíchy: sú samičky *Daphnia magna* prítomné od začiatku testu a ktorých reprodukčný výstup je objektom štúdie.

Potomstvo: sú mladé *Daphnie* vyprodukované rodičovskými živočíchmi v priebehu testu.

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia, pri ktorej je badateľný štatisticky významný efekt tejto látky na reprodukciu a rodičovskú mortalitu (v $p < 0,05$), keď porovnávame s kontrolou v medziach stanoveného času pôsobenia.

Koncentrácia s nezisteným vplyvom (neúčinná koncentrácia NOEC): je testovaná koncentrácia ihneď pod LOEC, ktorá je porovnávaná s kontrolnou, nemá štatisticky významný vplyv ($p < 0,05$) v rámci danej expozičnej doby.

EC_x: je koncentrácia testovanej látky rozpustenej vo vode, ktorá spôsobí x % redukciu reprodukcie *Daphnie magna* v medziach určenej expozičnej doby.

Vlastný pomer rastu: je meranie rastu populácie, ktoré zahŕňa reprodukčný výstup a mortalitu špecifickú pre istú dobu života (20), (21), (22). Pri ustálenom stave populácie je nula. Pre rastúcu populáciu to bude pozitívna hodnota a pre znižujúcu populáciu bude negatívna. Bezpochyby neskoršie nie je udržateľná a vedie napokon k vymretiu.

Detekčný limit: je najnižšia koncentrácia, ktorá môže byť zistená, ale nie kvantifikovaná.

Medze stanovenia: je najnižšia koncentrácia, ktorá môže byť kvantitatívne zmeraná.

Mortalita: živočích sa považuje za mŕtvy, keď sa nepohybuje, napr. keď nie je schopný plávať alebo ak nie je pozorovaný pohyb prívěskov alebo podbruška do 15 sekúnd po jemnom potrasení testovacej nádoby. (Ak sa použije iná definícia, musí byť uvedená spolu s jej odkazmi.)

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Mladá samička *Daphnií*, mladšia ako 24 hodín na začiatku testu je vystavená testovacej látke pridanej do vody rôznych koncentrácií. Test trvá 21 dní. Na konci testu sa odhaduje celkový počet živého potomstva vyprodukovaného rodičovským živočíchom, ktorý prežil do konca testu, to znamená, že mláďatá vyprodukované dospelými jedincami, ktorí uhynuli počas testu, sú vylúčené z výpočtov. Reprodukčný výstup rodičovských živočíchov môže byť vyjadrený rôznymi spôsobmi (napr. počet žijúceho potomstva vyprodukovaného na živočícha za deň od prvého dňa, keď bolo spozorované potomstvo), ale okrem toho je opísaný ako celkový počet mláďat vyprodukovaných rodičovskými živočíchmi prežívajúcimi do konca testu. Reprodukčný výstup živočíchov vystavených testovacej látke je porovnávaný s kontrolnou vzorkou, aby sa stanovila najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC) a teda aj nezistiteľná účinná koncentrácia (NOEC). A okrem toho, tak ako je to len možné, sú dáta analyzované za použitia regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá zapríčiní x % redukciu reprodukčného výstupu (napr. EC₅₀, EC₂₀ alebo EC₁₀).

Počet prežívajúcich rodičovských živočíchov a čas prvého potomstva musí byť taktiež zaznamenaný. Taktiež iné látky s príbuzným efektom na parametre ako napr. rast (dĺžka) a možný vnútorný pomer rastu je taktiež možné otestovať.

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LATKE

Výsledky testu akútnej toxicity (pozri metódu C.2, časť I), vykonaného na *Daphnii magne*, sú dostupné. Výsledky môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovacích koncentrácií v reprodukčných testoch. Je potrebné poznať rozpustnosť vo vode aj tlak pár testovanej látky a mať spoľahlivú analytickú metódu na kvantifikáciu látky v testovanom roztoku so známou účinnosťou a známym detekčným limitom.

Informácie o testovanej látke, ktoré sú použité pri stanovení podmienok testu, zahŕňajú štruktúrny vzorec, svetelnú stabilitu, stabilitu pri podmienkach testu, pKa (disociačná konštanta), P_{ow} a výsledky testu na rýchlu biodegradáciu (pozri metódu C.4).

1.5. VALIDITA TESTU

Aby bol test platný, je potrebné kontrolovať nasledujúce kritériá na vykonanie testu:

- mortalita rodičovských živočíchov nemá na konci testu presiahnuť 20 % na jedného,
- významný počet živých potomkov vyprodukovaných rodičovským živočíchom prežívajúcich do konca testu je > 60 .

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Zariadenie

Testovacia nádoba a ostatné zariadenia, ktoré prichádzajú do kontaktu s testovaným roztokom, musia byť celé vyrobené zo skla alebo z iného chemicky inertného materiálu. Testovacie nádoby sú obvykle sklenené kadičky.

Okrem toho sa vyžadujú niektoré alebo všetky nasledujúce zariadenia:

- kyslíkový meter (zariadenie na meranie kyslíka) mikroelektrodou alebo iným vhodným zariadením merajúcim rozpustný kyslík v malých objemoch vzoriek,
- príslušné zariadenie na kontrolu teploty,
- pH-meter,
- zariadenie na meranie tvrdosti vody,
- zariadenie na stanovenie celkovej koncentrácie organického kyslíka (TOC) vo vode alebo zariadenie chemickej spotreby kyslíka (COD),
- vhodné zariadenie na kontrolovanie svetelného režimu a meranie intenzity svetla.

1.6.2. Testované organizmy

Druh používaný v testoch je *Daphnia magna* Straus. Môžu byť použité aj iné druhy dafnií pod podmienkou, že spĺňajú kritériá validity (kritériá validity podobné reprodukčným výstupom v kontrolnej vzorke sú významné pre druhy Dafnia.) Ak sa použijú iné druhy dafnií, musia byť jasne definované a ich použitie musí byť opodstatnené.

Výhodnejšie je identifikovanie klonov genotypmi. Výskum (1) ukázal, že reprodukčná účinnosť klonu A, ktorý pochádza z IRCHA vo Francúzsku, (3) dôsledne vyhovuje kritériám validity v zmysle ≥ 60 potomkov na rodičovského živočícha prežívajúceho, keď sú kultivované za podmienok opísaných v tejto metóde. Sú však akceptovateľné aj iné klony, zabezpečujúce, že kultúra dafnií uspokojuje kritériá validity testu.

Na začiatku testu majú živočíchy menej ako 24 hod. a nesmú byť prvým vrhom potomstva. Mali by byť získané zo zdravého materiálu (t. j. nevykazujú žiadne známky stresu ako vysoká mortalita, prítomnosť samčiekov a ephippia oneskorenie v produkcii prvého potomstva, bezfarebné živočíchy atď.). Zásobné živočíchy musia byť udržiavané v kultivovaných podmienkach (svetlo, teplota, médium kŕmenie a počet organizmov na jednotku objemu) podobných tým, ktoré sa používajú pri teste. Ak médium dafniovej kultúry použité v teste je odlišné od bežnej kultúry dafnií, je dobré zaradiť pred testom aklimatizačnú periódu trvajúcu obvykle okolo troch týždňov (t. j. jedna generácia), aby sme sa vyhli skresľovaniu rodičovských živočíchov.

1.6.3 Testovacie médium

V tomto teste odporúčame použiť úplne definované médium. Tým sa môžeme vyhnúť použitiu aditív (napr. chalúh, pôdnych extraktov atď.), ktoré sú ťažko charakterizovateľné a zároveň sa zlepšujú možnosti štandardizácie medzi laboratóriami. Elendt M4 (4) a M7 médiá (pozri dodatok 1) sú vhodné na tento účel. Aj iné médiá (napr. (5), (6)) sú však akceptovateľné na zisťovanie účinnosti kultúry *Daphnia magna*, ak sa ukáže, že uspokojujú kritériá validity testu.

Ak sú použité médiá, ktoré obsahujú nedefinované aditíva, tieto aditíva musia byť špecifikované jasne a informácie musia byť poskytnuté vo výpise testu na zloženie, obzvlášť s dôrazom na obsah uhlíka, keďže toto môže napomôcť pri poskytovaných dávkach potravy. Odporúča sa, aby celkový organický uhlík (TOC) a/alebo chemicky požadovaný kyslík (COD) bol pri príprave zásoby organických aditív definovaný a bol vykonaný odhad výsledku k TOC/COD v testovanom médiu. Ďalej sa odporúča, aby úroveň TOC v médiu (t. j. pred prídavkom rias) bol pod 2 mg/l (7).

Keď testované látky obsahujú kovy, je dôležité rozpoznať, že vlastnosti testovaného média (t. j. tvrdosť, chelatačná kapacita – schopnosť vykonávať chelačné komplexy) môžu mať súvislosť s toxicitou testovanej látky. Z tohto dôvodu sa vyžaduje úplne definované médium, v súčasnosti sú však iba Elendt M4 a M7 plne definované médiá, ktoré sú vhodné na dlhohožijúce kultúry *Daphnia magna*. Obidve médiá obsahujú chelátotvornú zložku EDTA (etyléndiamíntetraoktamin kyselina). Pri práci (2) sa ukázalo, že evidentná-zjavná toxicita kadmia je vo všeobecnosti nižšia, keď sa reprodukčný test vykoná v M4 a M7 médiách, ako v médiách neobsahujúcich EDTA. M4 a M7 nie sú doporučené na testovanie látok obsahujúcich kovy a iné médiá obsahujúce známe chelátotvorné zložky by sa nemali taktiež používať. Pre kov obsahujúce látky sa odporúča použiť alternatívne médium tak ako napr. ASTM znovu stanovená tvrdá čerstvá voda (7), ktorá neobsahuje žiadne EDTA, s pridaným extraktom z chalúh (8). Táto kontribúcia ASTM rekonštruovanej tvrdej čerstvej vody a chaluhového extraktu je tiež vhodná na dlhohožijúce kultúry a testovanie *Daphnie magna* (2), hoci sa stále uplatňuje proces, pri ktorom sa tvoria mierne chelátové komplexy, spôsobené organickými zložkami v pridanom extrakte z chalúh.

Na začiatku a počas testu má byť koncentrácia rozpusteného kyslíka okolo 3 mg/l. pH v rozmedzí 6 – 9 a obvykle sa nemení viac ako 1,5 jednotky v žiadnom teste. Doporučená tvrdosť vody je približne 140 mg/l (ako CaCO₃). Testy na tejto úrovni a vyššej demonštrujú účinnosť reprodukcie v súlade s kritériami validity (9), (10).

1.6.4 Testované roztoky

Testovacie roztoky určitých koncentrácií sa obvykle pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky sa najčastejšie pripravujú rozpustením látky v testovacom médiu.

V niektorých prípadoch sa odporúča použitie organických rozpúšťadiel alebo látok tvoriacich disperziu, aby sa pripravil zásobný roztok v požadovanej koncentrácii, ale malo by byť vyvinuté všetko úsilie, aby sa vyhlo použitiu takýchto materiálov. Príklady vhodných rozpúšťadiel sú acetón, etanol, metanol, dimetyl-formanid a trietylenglykol. Príklady vhodných látok tvoriacich disperzie sú Cremophor RH 40, metylcelulóza 0,01 % a HCO-40. V niektorých prípadoch testovaná látka v testovacom roztoku by nemala dosiahnuť limit rozpustnosti v testovacom médiu.

Rozpúšťadlá sa používajú na prípravu zásobných roztokov, ktoré môžu byť presne dávkované priamo do vody. V odporúčaných koncentráciách rozpúšťadiel vo finálnom testovacom médiu (napr. < 0,1 ml/l), rozpúšťadlá uvedené vyššie nebudú toxické a nezvyšujú rozpustnosť danej látky vo vode.

Disperzanty (látky tvoriace disperzie) napomáhajú v presnom dávkovaní a pri tvorbe disperzií. V odporúčaných koncentráciách vo finálnom testovacom médiu (< 0,1 ml/l) látky tvoriace disperzie nie sú toxické a nezvyšujú rozpustnosť danej látky vo vode.

1.7. KONCEPCIA TESTU

Postupy by mali byť umiestnené v testovacích nádobách a všetky nasledujúce činnosti sú vykonávané náhodným spôsobom. Neúspech vykonaného môže byť výsledkom odchýlky vysvetľovanej koncentračným efektom. Najmä ak sú experimentálne jednotky zamenené v postupe alebo koncentračnom rade, potom niektoré časovo príbuzné efekty, ako napr. únava operátora alebo iné chyby môžu viesť k zvýšeniu vplyvov pri vysokých koncentráciách. Okrem toho, ak výsledky testu majú tendenciu byť ovplyvnené počiatočnými alebo environmentálnymi podmienkami testu, ako napr. umiestnením v laboratóriu, potom by sa malo zväžiť pozastavenie testu.

1.8. POSTUP

1.8.1. Podmienky expozície

1.8.1.1 Trvanie

Test trvá 21 dní.

1.8.1.2 Loading

Rodičovské živočíchy sú udržiavané individuálne, jeden na testovaciu nádobu s objemom 50 – 100 ml média v každej nádobe.

Väčšie objemy sú niekedy potrebné na uspokojenie požiadaviek analytického postupu použitého na stanovenie koncentrácie testovanej látky, hoci združovanie kópií na chemickú analýzu je tiež prípustné. Ak sa použijú objemy väčšie ako 100 ml, dávkovanie dané pre dafnie je potrebné zvýšiť na zabezpečenie primeranej dostupnosti potravy a v súlade s kritériami validity. Na prietochný test z technických príčin môže byť vybraná alternatívna koncepcia testu (napr. štyri skupiny po 10 živočíchoch vo veľkoobjemovom teste), ale všetky zmeny koncepcie testu musia byť zaznamenané.

1.8.1.3. Počet živočíchov

Na semistatický test je najmenej 10 živočíchov držaných samostatne, na každú testovanú koncentráciu najmenej 10 živočíchov je držaných v kontrolnej sérii.

Na prietochné testy je 40 živočíchov rozdelených do štyroch skupín po 10 na každú testovanú koncentráciu (1). Môže sa používať aj menší počet živočíchov a odporúča sa minimálne 20 živočíchov na koncentráciu rozdelených do dvoch alebo viacerých skupín s rovnakým počtom živočíchov (napr. štyri opakovania, každé s piatimi dafniami). Zapamätajte si, že pri testoch, pri ktorých sú zvieratá umiestnené v skupinách, nebude možné vyjadriť reprodukčný výstup ako celkový počet žijúcich potomkov vyprodukovaných na rodiča prežívajúceho do konca testu, ak rodičovský živočích uhynie. V tomto prípade reprodukčný výstup bude vyjadrený ako celkový počet žijúcich potomkov vyprodukovaných na rodiča prítomného na začiatku testu.

1.8.1.4. Kŕmenie

Pri semistatickom teste sa kŕmenie vykonáva denne, najmenej trikrát za týždeň (napr. zodpovedajúc zmenám média). Odchýlky od tohto musia byť zaznamenané (napr. pri prietochnom teste).

Počas testu sú rodičovské živočíchy kŕmené prednostne živými bunkami rias jednou alebo viacerými z nasledujúcich: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (teraz *Pseudokirchneriella subcapitata*) (11) a *Scenedesmus subspicatus*. Zásobovanie potravou je založené na množstve organického uhlíka (C) poskytovaného každému rodičovskému živočíchovi. Výskum (12) ukázal, že pre *Daphnia magna* je dávka na úrovni 0,1 – 0,2 mg C/dafnia/deň postačujúca na dosiahnutie požadovaného množstva mláďat, aby boli v súlade s kritériami validity testu. Prídel môže byť počas periódy testu dodávaný buď v stálej miere, alebo ak je žiaduce, v menšej miere môže byť použitý na začiatku a potom zvýšený počas testu, aby sa bral ohľad na rast rodičovského živočícha. V tomto prípade by mal prídel zostať v medziach odporúčaného rozpätia 0,1 – 0,2 mg C/dafnia/deň po celý čas.

Ak budú použité náhradné merania, ako napr. počet buniek rias alebo absorbcia svetla, aby sa naplnila úroveň dávky (napr. pretože meranie obsahu uhlíka je časovo náročné), každé laboratórium musí vytvoriť svoj vlastný nomogram, spojený s náhradným meraním obsahu uhlíka kultúry rias (pozri dodatok 2 – odporúčanie na: ako zostrojiť nomogram). Nomogram kontrolujeme najmenej raz do roka a častejšie, ak sa zmenili podmienky v kultúre rias. Zistilo sa, že svetelná absorbcia je lepšia náhrada za údaje o obsahu uhlíka ako počet buniek (13).

Koncentrovaná suspenzia rias sa pridáva k dafniám, aby sa minimalizoval objem kultúry rias prenášaný do testovacích nádob. Koncentrácia rias sa dosiahne odstredovaním, po ktorom nasleduje znovuprevedenie na suspenziu v destilovanej vode, v deionizovanej vode alebo médiom kultúry dafnia.

1.8.1.5. Svetlo

16 hodín svetla o intenzite nepresahujúcej $15 - 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

1.8.1.6. Teplota

Teplota testovaného média je v rozmedzí $18 - 22^\circ\text{C}$, na žiaden test, ak je to možné, by sa však teplota nemala meniť viac ako o 2°C v rámci týchto limitov (napr. $18 - 20^\circ\text{C}$, $19 - 21^\circ\text{C}$, $20 - 22^\circ\text{C}$). Je vhodné použiť prídavnú testovaciu nádobu s cieľom monitoringu teploty.

1.8.1.7. Vetranie

Testovacia nádoba musí byť vetraná počas testu.

1.8.2. Testovacie koncentrácie

Obvykle sa požíva najmenej 5 testovacích koncentrácií zaradených do geometrických sérií so separačným faktorom nepresahujúcim hodnotu 3,2 a vhodným počtom opakovaní na každú testovanú koncentráciu (pozri odsek 1.8.1.3.). Musí byť poskytnuté potvrdenie, ak bolo použitých menej ako 5 koncentrácií. Látky sa netestujú v testovacích médiách nad hranicou rozpustnosti.

Pri stanovení koncentračného rozsahu je treba mať na pamäti:

- i) ak je cieľom získať LOEC/NOEC, najnižšia testovaná koncentrácia musí byť dosť nízka, takže plodnosť pri tejto koncentrácii nie je značne nižšia ako v kontrolnej vzorke. Ak to tak nie je, test sa musí zopakovať s redukovanou najnižšou koncentráciou;
- ii) ak je cieľom získať LOEC/NOEC, najvyššia testovaná koncentrácia musí byť dosť vysoká, takže plodnosť pri tejto koncentrácii je značne nižšia ako v kontrolnej vzorke. Ak to tak nie je, test sa musí opakovať, pričom sa zvýši najvyššia koncentrácia;
- iii) ak je EC_x odhadovaný účinok na reprodukciu EC_x , je vhodné použiť postačujúcu koncentráciu na definovanie EC_x s vhodným stupňom spoľahlivosti. Ak je odhadnutý účinok EC_{50} na reprodukciu, je vhodné, aby najvyššia testovaná koncentrácia bola vyššia ako táto koncentrácia EC_{50} . Inak i keď bude ešte možné odhadnúť EC_{50} , interval spoľahlivosti na EC_{50} bude veľmi široký a nebude možné dostačujúco odhadnúť primeranosť vhodného modelu;
- iv) rozsah testovaných koncentrácií by nemal zahŕňať žiadnu koncentráciu, ktorá má štatisticky významný efekt na prežívajúcich dospelých, keďže toto môže zmeniť charakter testu z jednoduchého reprodukčného na kombinovaný reprodukčný a test mortality vyžadujúci omnoho viac komplexnú štatistickú analýzu.

Prvotné znalosti o toxicite testovanej látky (napr. z akútneho testu a/alebo zo štúdie určenia rozsahu) pomôžu pri výbere vhodných testovaných koncentrácií.

Kde sa použije rozpúšťadlo alebo látka, aby sa napomohlo príprave testovacieho roztoku (pozri odsek 14.), finálna koncentrácia v testovacej nádobe nesmie byť väčšia ako 1ml/l a musí byť rovnaká vo všetkých testovacích nádobách.

1.8.3. Kontrola

Jedna kontrolná séria testovacieho média a ak je to podstatné, tak aj jedna kontrolná séria obsahujúca rozpúšťadlo a látky tvoriace disperzie, sa musí analyzovať v testovanej sérii. Keď sa použijú, koncentrácia rozpúšťadla a látky tvoriace disperziu musí byť rovnaká ako v nádobe obsahujúcej testovanú látku. Použije sa vhodný počet opakovaní, paralelných stanovení (pozri odsek 1.8.1.3.).

Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient okolo významného počtu žijúcich potomkov vyprodukovaných na jedného rodičovského živočícha v kontrolnej vzorke je $\leq 25\%$ a toto je popísané na testovaciu koncepciu používajúcu individuálne chované živočíchy.

1.8.4. Obnova testovaného média

Frekvencia obnovy testovacieho média závisí od stability testovacej látky, ale musí sa obnoviť najmenej trikrát za týždeň. Ak z úvodných testov stability (pozri odsek 14) je zrejmé, že koncentrácia testovanej látky je nestabilná (t. j. mimo rozsahu 80 – 120 % nominálu alebo poklesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie) cez maximálnu periódu obnovy (t. j. tri dni), mala by sa venovať pozornosť častejšej obnove média alebo používať priebežný prietochový test.

Keď je médium vymieňané v semistatickom teste, pripraví sa druhá séria testovacích nádob a rodičovské živočíchy sú prenesené do nich, napríklad sklenenou pipetou vhodného priemeru. Objem média preneseného s dafniami musí byť minimálny.

1.8.5. Pozorovania

Výsledky pozorovaní urobených počas testu sa zaznamenávajú do hárku údajov (pozri príklady v dodatkoch 3 a 4). Ak sa vyžadujú iné merania, môžu byť požadované dodatočné pozorovania.

1.8.6. Potomok

Potomok vyprodukovaný každým rodičovským živočíchom je radšej premiestnený a počíta sa denne od objavenia sa prvého potomstva, aby sa im zabránilo konzumovať potravu určenú pre dospelých jedincov. Na účel tejto metódy je potrebné počítať iba počet žijúcich potomkov, ale prítomnosť nedozretých vajčiek alebo nežijúci potomkovia musia byť zaznamenané.

1.8.7. Mortalita

Mortalitu medzi rodičovskými živočíchmi zaznamenávajúte denne aspoň v rovnakom čase, ako je počítané potomstvo.

1.8.8. Iné parametre

Hoci táto metóda je principiálne stanovená, vytvorená na odhadovanie vplyvov na reprodukciu, je možné, že iné vplyvy môžu byť tiež dostatočne kvantifikované, aby umožnili štatistickú analýzu. Merania rastu sú vysoko žiaduce, keďže zadávajú informácie o možných subletálnych vplyvoch, ktoré sú užitočnejšie ako meranie reprodukcie samotné, meranie dĺžky rodičovských živočíchov (t. j. dĺžka tela bez análnej kosti) sa odporúča na konci testu. Iné parametre môžeme merať alebo počítať zahŕňajúc čas prvého potomstva (a nasledujúcich vrhov), počet a veľkosť vrhov na jedného živočicha, počet premrhaných vrhov, prítomnosť samčiekov a efipia a vnútorný pomer rastu populácie.

1.8.9. Frekvencia analytických stanovení a meraní

Koncentrácia kyslíka, teplota, tvrdosť vody a pH hodnoty sa merajú aspoň raz za týždeň v čerstvom a starom médiu, v kontrolnom a pri vyšších koncentráciách testovanej látky.

Koncentrácia testovanej látky počas testu je stanovená v pravidelných intervaloch.

V semistatických testoch, kde je očakávaná zostávajúca koncentrácia testovanej látky v rozmedzí $\pm 20\%$ z nominálu (t. j. v rozsahu 80 – 120 %, pozri 1.4. a 1.8.4.) sa odporúča ako minimum, najvyššia a najnižšia testovaná koncentrácia je analyzovaná, keď je čerstvo pripravená a v čase obnovy počas prvého týždňa testu (t. j. analýza sa vykoná na vzorke z rovnakého roztoku – keď je čerstvo pripravený a obnovený.) Tieto stanovenia sú potom opakované aspoň raz za týždeň.

V testoch, kde sa neočakáva zostatková koncentrácia testovanej látky v rozmedzí $\pm 20\%$ nominálu, je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie testovanej látky, keď sú čerstvo pripravené a po obnove. Hoci na tieto testy, kde má meraná počiatočná koncentrácia testovanej látky nie je v rozmedzí $\pm 20\%$ nominálu, ale kde dostatočná evidencia môže preukázať, že počiatočná koncentrácia je opakovateľná a stabilná (t. j. v rozsahu 80 – 120 % z počiatočnej koncentrácie), chemické stanovenia sa zredukovujú v týždňoch 2 a 3 na test najvyššej a najnižšej testovanej koncentrácie. Vo všetkých prípadoch stanovenie koncentrácií testovanej látky na obnovu sa vyžaduje vykázať iba v jednej nádobe na každú testovanú koncentráciu.

Ak sa použije priebežný (prietočný test), je vhodný podobný vzorkovací režim ako bol popísaný pri semistatickom teste (ale meranie „starého“ roztoku nie je v tomto prípade aplikovateľné). Hoci môže byť vhodné zvýšiť počet vzorkovacích príležitostí počas prvého týždňa (t. j. tri skupiny meraní), aby sa zistilo, že testované koncentrácie zostávajú stabilné. V týchto typoch testov pomer prietoku riedidla a testovanej látky musí byť kontrolovaný denne.

Ak je evidencia koncentrácie látky, ktorá je testovaná, uspokojivo zachovaná v rozmedzí $\pm 20\%$ nominálnej alebo počiatočnej koncentrácie počas testu, potom výsledky môžu byť založené na nominálnych alebo počiatočných nameraných hodnotách. Ak odchýlka od nominálnej alebo počiatočnej nameranej koncentrácie je väčšia ako $\pm 20\%$, výsledky budú vyjadrené v pojmach čas – hmotnosť (pozri dodatok 5).

2. ÚDAJE A VÝSLEDKY

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Účelom tohto testu je stanoviť efekt testovanej látky na celkový počet živých potomkov vyprodukovaných jedným rodičovským živočíchom prežívajúcim do konca testu. Celkový počet potomkov na rodičovského živočícha sa vypočíta na každú testovaciu nádobu (t. j. replikát – opakovanie). Ak v niektorom opakovaní rodičovský živočích uhynie počas testu alebo sa zmení na samčeka, potom sa replikát vylúči z analýzy. Analýza sa bude následne zakladať na redukovanom počte replikátov.

Na odhad LOEC ako aj na NOEC na vplyvy chemikálií na reprodukčný výstup je potrebné vypočítať významný reprodukčný výstup cez replikáty cez každú koncentráciu a združené reziduálne štandardné odchýlky, môže sa to vykonať za použitia analýzy rozptylu (ANOVA). Priemer na každú koncentráciu musí byť potom porovnaný s priemerom kontrolnej vzorky za použitia vhodnej niekoľkonásobnej porovnávacej metódy Dunnettov alebo Williamsov test je užitočný (14), (15), (16), (17). Je potrebné kontrolovať, či ANOVA dodržiava predpoklad homogenity rozptylu. Odporúča sa vykonať test graficky skôr ako cestou testu formálneho významu (18); vhodná alternatíva je urobiť Barlettov test. Ak sa nedodrží tento predpoklad, potom je pozornosť zameraná na transformáciu údajov do homogenizačného rozptylu pred použitím ANOVA alebo vykonať vážený ANOVA. Veľkosť vplyvu detegovaná použitím ANOVA (t. j. najmenšia významná odchýlka) musí byť vypočítaná a zaznamenaná.

Na odhad koncentrácie, ktorá môže spôsobiť 50 % pokles v reprodukčnom výstupe (t. j. EC_{50}), by mala byť vhodná krivka z dát, ako napr. logaritmická krivka vyhotovená za použitia štatistickej metódy, ako napr. metódy najmenších štvorcov. Krivka má mať také parametre, aby sa EC_{50} a jej štandardná odchýlka mohli priamo odhadnúť. Toto veľmi uľahčí výpočet intervalov spoľahlivosti okolo EC_{50} . Pokiaľ nie sú dostatočné dôvody na uprednostnenie odlišných hladín spoľahlivosti, mali by sa uviesť dvojstranné 95 % intervaly hladín spoľahlivosti. Vhodný postup bude predovšetkým poskytovať prostriedky na odhadnutie významu straty primeranosti. Môžeme to spraviť graficky alebo podielom zostatkovej sumy štvorcov v „strate prítomnosti“ a „čistej chyby zložiek“ a vykonaním testu významnosti na stratu primeranosti. Pretože postupy dávajúce vysokú plodnosť majú tendenciu viac variovať v počte vyprodukovaných potomkov ako procesy vykazujúce nízku plodnosť, pozornosť by sa mala upriamiť na váženie spozorovaných hodnôt s cieľom zobrazenia rôzneho rozptylu v odlišných procesových skupinách [pozri základné informácie (18)].

V analýze údajov z finálneho kruhového testu (2) logistická krivka bola prispôbená použitím nasledujúceho modelu, hoci aj iné vhodné modely môžu byť použité:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

kde:

Y: = celkový počet mláďat na rodičovského živočícha prežívajúceho do konca testu (vypočítané na každú nádobu)

x: = koncentrácia látky

c: = očakávaný počet mláďat, keď $x = 0$

x_0 : = EC_{50} v populácii

b: = tangenta (nábehový parameter)

Tento model je prijateľný vo veľkom počte situácií, ale sú tu testy, na ktoré nie je vhodný. Je potrebné vykonať kontrolu validity modelu, ako bolo odporúčané vyššie. V niektorých prípadoch môže byť vhodný hormesis model, ktorý pri nízkych koncentráciách dáva zvýšený efekt (19).

Ostatné vplyvy koncentrácií, ako napr. EC_{10} a EC_{20} môžu byť tiež odhadnuté, hoci môže byť výhodnejšie použiť iné určenie parametrov modelu z toho použitého na odhad EC_{50} .

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí zahŕňať nasledujúce:

2.2.1. Testovaná látka:

- fyzikálny charakter a podstatné fyzikálno-chemické vlastnosti,
- chemické identifikačné údaje vrátane čistoty.

2.2.2. Testované druhy:

- klony (či sú geneticky otypované), dodávateľ a zdroj (ak je známy) a použité podmienky kultúr. Ak sú použité iné druhy ako *Daphnia magna*, musí to byť uvedené a odôvodnené.

2.2.3. Podmienky testu:

- použitý testovací postup (procedúra, metóda), (napr. semistatická, objem, dávkovanie v počte dafnií na liter),
- fotoperiód a intenzita svetla,
- koncepcia testu (napr. počet paraleliek, replík, opakovaní, počet rodičov na paralelu, repliku),
- detaily o použitom médiu kultúry,
- ak bol použitý, prídavky organických látok zahrňujúce zloženie, zdroj, metódu prípravy, TOC/COD zásobné roztoky, odhad výsledného TOC/COD v testovanom médiu,
- podrobné informácie o kŕmení zahrňujúce množstvo v (mg C/*Daphnia*/deň) a tabuľku (napr. typ potravy, zahrňujúci špecifický druh rias a ak je známy, tak aj rod, podmienky kultúry),
- metódu prípravy zásobného roztoku a frekvenciu obnovy (roztok alebo dispergovadlo a ak boli použité, musia byť udané ich koncentrácie).

2.2.4. Výsledky:

- výsledky nejakých predbežných štúdií stability testovacej látky,
- nominálne testované koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacích nádobách, (pozri príklad na háčky údajov – výpisy dodatok 4), účinnosť pokrytia metódy a medza stanoviteľnosti musia byť uvedené,
- kvalita vody v rámci testovacích nádob (t. j. pH, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, TOC a/alebo COD a tvrdosť vody, kde je to možné) (pozri príklad na háčky údajov – dodatok 3),
- úplný záznam žijúcich potomkov na každého rodičovského živočícha (pozri príklad na karty bezpečnostných údajov – dodatok 3),
- počet uhynutých medzi rodičovskými živočíchmi a dni, v ktorých sa vyskytli (pozri príklad na karty bezpečnostných údajov – dodatok 3),

- koeficient kontroly plodnosti (založený na celkovom počte žijúcich potomkov na rodičovského živočícha prežívajúceho do konca testu),
- graf celkového počtu žijúceho potomstva na jedného rodičovského živočícha (na každú repliku, paralelu), prežívajúceho do konca testu versus koncentrácia testovanej látky),
- najnižšia zistená efektívna koncentrácia (LOEC) na reprodukciu obsahujúca popis štatisticky používaných metód a indikácia, akej veľkosti je detegovaný a nezistiteľné účinná koncentrácia (NOEC) na reprodukciu, keď je to vhodné, LOEC/NOEC na mortalitu rodičovských živočíchov musí byť tiež uvedené,
- keď je to vhodné, EC_{50} na reprodukciu a intervaly spoľahlivosti, graf zodpovedajúceho modelu používaného na ich výpočet, tangenta krivky dávkovej odozvy a jej štandardnej chyby,
- ostatné zistené biologické efekty alebo meranie: výpis ostatných biologických efektov, ktoré boli získané alebo namerané (napr. rast rodičovských živočíchov) vrátane všetkých vhodných odôvodnení,
- vysvetlenie na každú odchýlku od testovacej metódy.

3.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- (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, s. 257 – 265.
- (4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, s. 25 – 33.
- (5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.
- (6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, s. 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.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), s. 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, s. 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), s. 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, s. 2053 – 2058.

-
- (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, s. 459 – 466.
- (14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, s. 1096 – 1121.
- (15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, s. 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, s. 103 – 117.
- (17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, s. 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, s. 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, s. 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, s. 1156 – 1166.

DODATOK 1

PRÍPRAVA PLNE DEFINOVANÉHO MÉDIA ELENĐT M7 A M4

Aklimatizácia do Elendt M7 a M4 média

Niektoré laboratória podstúpili ťažkosti pri priamom prenose *Daphnia* do média M4 (1) a M7. Určité úspechy sa dosiahli postupnou aklimatizáciou, t. j. premiestnením z vlastného prostredia do 30 percentného Elendtu, potom do 60 percentného Elendtu a potom do 100 percentného Elendtu. Aklimatizačné periódy môžu byť dlhé až jeden mesiac.

PRÍPRAVA

Stopové prvky

Separované zásobné roztoky (I) jednotlivých stopových prvkov sú najprv pripravované vo vode vhodnej čistoty, napr. deionizovaná, destilovaná alebo voda získaná reverznou osmózou. Z týchto rôznych zásobných roztokov (I) je pripravený druhý samostatný (jednoduchý) zásobný roztok (II), ktorý obsahuje všetky stopové prvky (kombinovaný roztok), t. j.:

Zásobný roztok I (samostatná látka)	Množstvo pridávané k vode (mg/l)	Koncentrácia (vo vzťahu k médiu M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte nasledujúce množstvo zásobného roztoku I do vody (ml/1)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl * 4 H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ * 6 H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	5 000	2 000	—	—
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 991	2 000	—	—

Posledné dva roztoky Na₂EDTA a FeSO₄ sa pripravujú jednotlivo, nalievajú sa spolu a hneď sa autoklávuju:

21 Fe-EDTA roztok		1 000	20,0	5,0

Médiá M4 a M7

Médiá M4 a M7 sa pripravujú použitím zásobného roztoku II, makroživín a vitamínov nasledujúcim spôsobom:

	Množstvo pridávané k vode (mg/l)	Koncentr ácia (vo vzťahu k médiu M4)	Množstvo zásobného roztoku pridávaného na prípravu média (ml/l)	
			M4	M7
Zásobný roztok II kombinované stopové prvky		20	50	50

Zásobný roztok makroživín (jedna látka)

CaCl ₂ * 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	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 ₂ SiO ₃ * 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Zásobný roztok kombinovaných vitamínov	—	10 000	0,1	0,1

Zásobný roztok kombinovaných vitamínov sa pripravuje pridaním 3 vitamínov do 1 l vody, ako je uvedené nižšie:

Tiamín hydrochlorid	750	10 000	—	—
Kyanokobalamin (B ₁₂)	10	10 000	—	—
Biotin	7,5	10 000	—	—

Zásobný roztok kombinovaných vitamínov sa uskladňuje zamrazený v malých alikvótnych dieloch. Vitamíny sa do média pridávajú krátko pred použitím.

Poznámka 1 Aby sa zabránilo vyzrážaniu solí pri príprave kompletného média, pridáme alikvótne diely zásobného roztoku do približne 500 – 800 ml deionizovanej vody a potom doplníme do 1 litra.

Poznámka 2 Prvá zmienka o médiu M4 sa nachádza v publikácii od autora: Elendt, B.P. z r. 1990 s názvom Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, s. 25 – 33.

DODATOK 2

ANALÝZA CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (TOC) A TVORBA MONOGRAMU NA OBSAH TOC
RIASOVÉHO KRMIVA

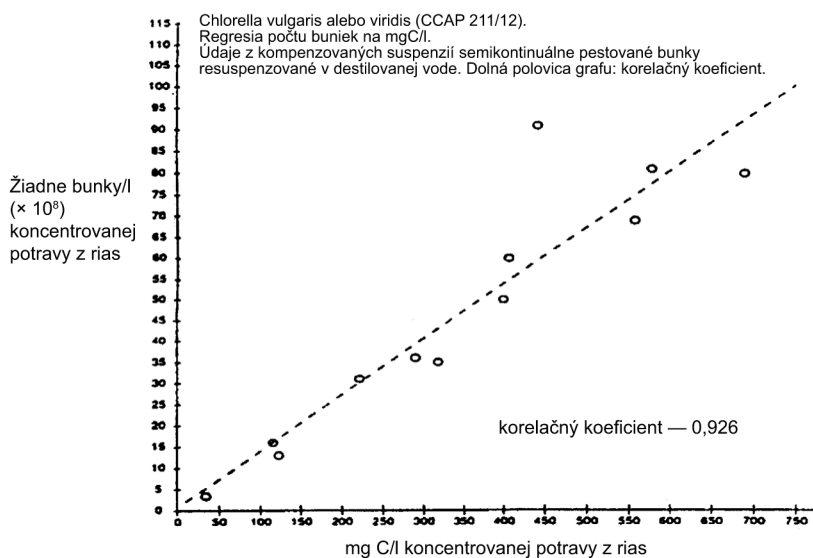
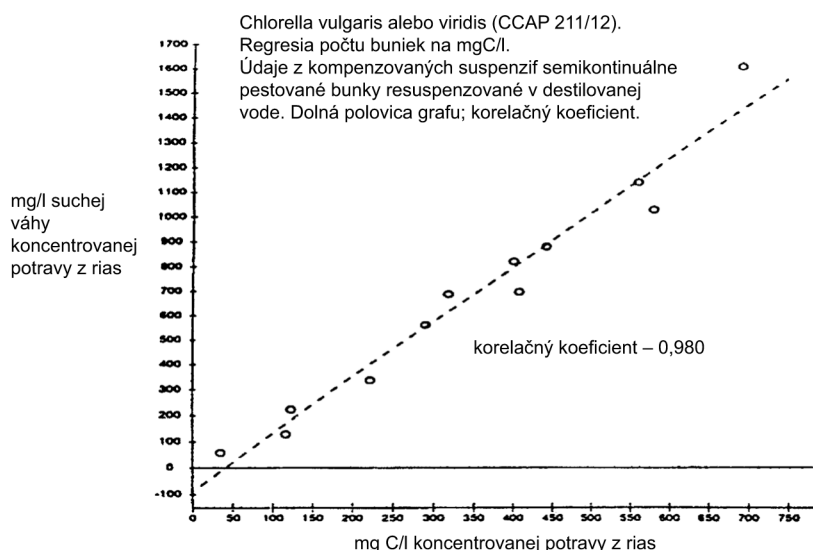
Je známe, že obsah uhlíka v riasách nie je obvykle meraný priamo, ale pomocou korelácií (t. j. nomogramov), náhradných meraní ako napr. počtu buniek rias alebo absorpcie svetla.

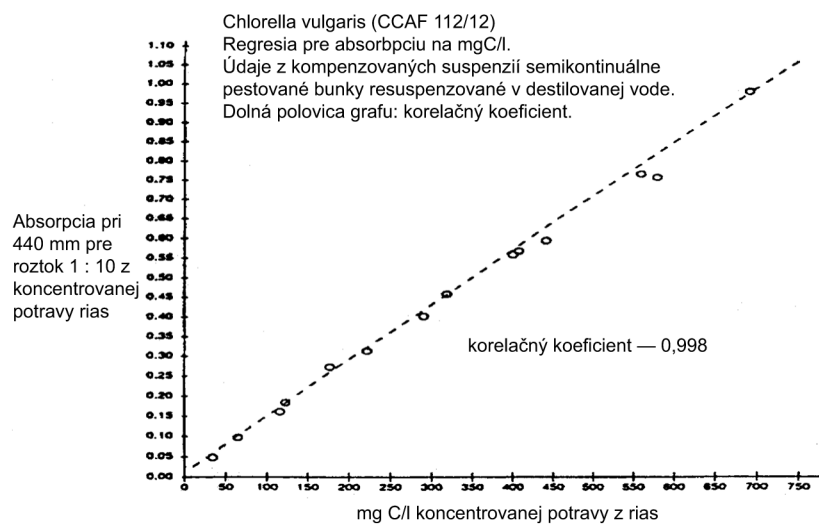
TOC by malo byť merané metódou vysokoteplotnej oxidácie radšej ako UV alebo persulfátovou metódou (pozri The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Na prípravu nomogramu riasy sa separujú z rastového prostredia (médiu) odstredovaním, po ktorom nasleduje znova prevedenie rozpustené na suspenziu v destilovanej vode. Meranie náhradných parametrov a TOC koncentrácie v každej vzorke sa opakuje trikrát. Urobíme slepý pokus v destilovanej vode a koncentrácia TOC sa odhadne z TOC koncentrácie vzorky rias.

Nomogram by mal byť lineárny v celom rozsahu požadovaných koncentrácií uhlíka. Príklady sú uvedené nižšie.

Poznámka: Tieto nemôžu byť použité na konverziu, je potrebné, aby si laboratóriá pripravili ich vlastné nomogramy.





PREHLAD ÚDAJOV ZAZNAMENÁVAJÚCICH OBNOVU MÉDIA, FYZIKÁLNYCH A CHEMICKÝCH ÚDAJOV, KŔMENIE, REPRODUKCIU DAFNÍ A MORTALITU DOSPELÝCH JEDINCOV

Číslo pokusu:	Údaje datované k:				Klon:				Médium:				Druh potravy:				Testovaná látka:				Nominálna koncentrácia:			
Deň	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Obnova média (háčik)																								
PH (¹)																							nová	
																							stará	
O ₂ mg/l (¹)																							nová	
																							stará	
Teplota (°C) (¹)																							nová	
																							stará	
Podané krmivo (háčik)																								
Žiadny živý potomok (²)																								Celková
Nádoba 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								

Číslo pokusu:	Údaje datované k:					Klon:		Médium:					Druh potravy:				Testovaná látka:				Nominálna koncentrácia:			
Deň	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
9																								
10																								
																							Celková	
Kumulovaná úmrtnosť dospelých jedincov ⁽³⁾																								

⁽¹⁾ Určuje, ktorá nádoba bola použitá pri pokuse.

⁽²⁾ Záznam prerušených vrhov ako „AB“ v príslušnej kolónke.

⁽³⁾ Záznam úmrtnosti dospelých živočíchov označených ako „M“ v príslušnej kolónke.

DODATOK 4

PREHLAD ÚDAJOV TÝKAJÚCICH SA ZAZNAMENÁVANIA VÝSLEDKOV CHEMICKÝCH ANALÝZ

a) Merané koncentrácie

Nominálna koncentrácia	Týždeň/vzorka č. 1		Týždeň/vzorka č. 2		Týždeň/vzorka č. 3	
	Čerstvá	Stará	Čerstvá	Stará	Čerstvá	Stará

b) Merané koncentrácie ako percento z nominálu

Nominálna koncentrácia	Týždeň/vzorka č. 1		Týždeň/vzorka č. 2		Týždeň/vzorka č. 3	
	Čerstvá	Stará	Čerstvá	Stará	Čerstvá	Stará

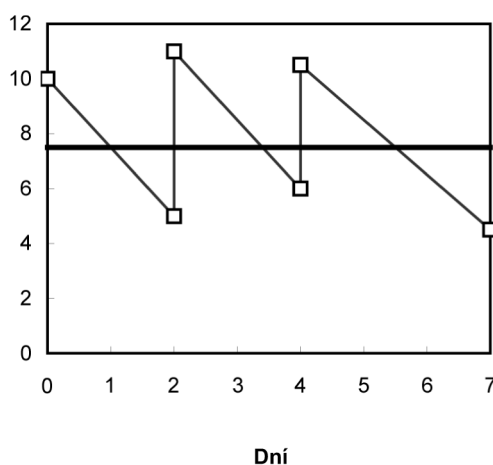
DODATOK 5

VÝPOČET ČASOVO-VÁŽENÉHO PRIEMERU

Je známe, že koncentrácia testovanej látky môže poklesnúť v perióde medzi obnovou (výmenou) média, preto je to potrebné brať do úvahy, aká koncentrácia sa vybrala ako reprezentatívna z rozsahu koncentrácií skúšaných rodičovskou dafniou. Výber musí byť založený tak na biologickom význame ako aj na štatistickom. Napríklad ak je reprodukcia myslená predovšetkým vrcholom odskúšanej koncentrácie, potom sa musí použiť maximálna koncentrácia. Hoci ak je dlhotrvajúci alebo akumulovaný vplyv jedovatej látky považovaný za dôležitejší, priemerná koncentrácia je významnejšia. V tomto prípade použiteľný vhodný priemer je časovo vážená priemerná koncentrácia – vysvetlenie variácií (odchýlok) v okamžitej koncentrácií v čase.

Obrázok 1:

Príklad časovo-váženého priemeru



Obrázok 1 znázorňuje príklad zjednodušeného testu trvajúceho sedem dní s médiom obnoveným v dňoch 0, 2 a 4.

Tenka cik-caková krivka predstavuje koncentráciu v akomkoľvek časovom bode. Predpokladá sa, že pokles koncentrácie bude sprevádzať exponenciálny rozkladný proces.

Šesť zobrazených bodov predstavuje zistené koncentrácie namerané na začiatku a konci každej periódy obnovy.

Hrubá čiara indikuje (určuje) pozíciu časovo-váženého priemeru.

Časovo-vážený priemer je vypočítaný tak, že plocha pod časovo-váženým priemerom je rovná plocha pod koncentračnou krivkou. Na vyššie uvedený príklad je ilustrovaný výpočet v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Výpočet časovo-váženého priemeru

Číslo výmeny	Dni	Koncentrácia 0	Koncentrácia 1	Ln(konc.0)	Ln(konc.1)	Plocha
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

Číslo výmeny	Dni	Koncentrácia 0	Koncentrácia 1	Ln(konc.0)	Ln(konc.1)	Plocha
Celkový počet dní: 7					Celková plocha	50,091
					Časovo- vážený prie- mer	7,156

Dni = počet dní v období výmeny

Koncentrácia 0 je nameraná koncentrácia na začiatku každého obdobia výmeny

Koncentrácia 1 je nameraná koncentrácia na konci každého obdobia výmeny

Ln(konc.0) = prirodzený logaritmus koncentrácie 0

Ln(konc.1) = prirodzený logaritmus koncentrácie 1

Plocha je plocha pod exponenciálnou krivkou na každé obdobie výmeny. Vypočítava sa podľa:

$$plocha = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times \text{počet dní}$$

Časovo-vážený priemer je celková plocha vydelená celkovým počtom dní.

Je samozrejmé, že pri reprodukčnom teste sa u dafnií rozšíri, aby pokryla 21 dní.

Je zrejmé, že pokiaľ sa pozorovania uskutočňujú iba na začiatku a konci každého obdobia výmeny, nie je možné potvrdiť, že rozkladný proces je skutočne exponenciálny. Rôzne výpočty plochy sa prejavajú rôznymi krivkami. Exponenciálny rozkladný proces je však nepravdepodobný a v prípade chýbajúcich informácií je vhodné použiť najlepšiu krivku.

Ak chemická analýza nenájde žiadnu látku na konci obdobia výmeny, je potrebné na to upozorniť. Ak nie je možné odhadnúť, ako rýchlo sa látka stráca z roztoku, je taktiež nemožné získať skutočnú plochu pod krivkou, a preto nemožno získať príslušný časovo-vážený priemer.

C.21. PÔDNE MIKROORGANIZMY: TEST TRANSFORMÁCIE DUSÍKA

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 216 (2000).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu, určenú na stanovenie dlhodobých účinkov chemikálií po jednorazovej expozícii na aktivitu pôdných mikroorganizmov transformovať dusík. Test sa v podstate zakladá odporúčaniami Organizácie na ochranu rastlín v Európe a stredomorskej oblasti (1). Zohľadnili sa však aj ďalšie usmernenia vrátane German Biologische Bundesanstalt (2), US Environmental Protection Agency (3), SETAC (4) a Medzinárodnej organizácie pre normalizáciu (5). Na OECD workshope o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v Belgirate, Taliansko, v roku 1995 (6) sa dohodlo množstvo a typy pôd používaných v tomto teste. Odporúčania pre odoberanie, manipuláciu a skladovanie vzoriek pôdy sa zakladajú na Usmerňovačom dokumente ISO (7) a odporúčaní z workshopu v Belgirate. Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností testovaných látok sa môže vyžadovať stanovenie účinkov na mikrobiálnu aktivitu pôdy, napr. keď sa vyžadujú údaje o potenciálnych vedľajších účinkoch výrobkov na ochranu rastlín na pôdnu mikroflóru, alebo keď sa predpokladá expozícia pôdných mikroorganizmov inými chemikáliami, ako sú výrobky na ochranu rastlín. Test transformácie dusíka sa vykonáva na stanovenie účinkov takýchto chemikálií na pôdnu mikroflóru. Ak sa testujú agrochemikálie (napr. výrobky na ochranu rastlín, hnojivá, chemikálie používané v lesníctve) vykonáva sa test transformácie dusíka a aj test transformácie uhlíka. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, test transformácie dusíka je postačujúci. Ak však hodnoty EC_{50} testu transformácie dusíka pre takéto chemikálie ležia v rozsahu zistenom pre komerčne dostupné inhibitory nitrifikácie (napr. nitrapyrín), môže sa vykonať test transformácie uhlíka, aby sa získali ďalšie informácie.

Pôdy pozostávajú zo živých a neživých zložiek, ktoré existujú v komplexných a heterogénnych zmesiach. Mikroorganizmy zohrávajú významnú úlohu pri rozkladaní a transformácii organických látok v úrodných pôdach, pričom mnohé druhy prispievajú k rôznym aspektom úrodnosti pôdy. Každý dlhodobý vplyv na tieto biochemické procesy by mohol potenciálne narušiť obeh živín a toto by mohlo ovplyvniť úrodnosť pôdy. Transformácia uhlíka a dusíka sa vyskytuje vo všetkých úrodných pôdach. Aj keď sa mikrobiálne populácie, ktoré sú zodpovedné za tieto procesy, odlišujú v prípade jednotlivých pôd, cesty transformácie sú v podstate rovnaké.

Táto opísaná testovacia metóda je určená na stanovenie dlhodobých nepriaznivých účinkov látky na proces transformácie dusíka v aeróbných povrchových pôdach. Testovacia metóda umožňuje aj stanovenie účinkov látky na transformáciu uhlíka v pôdnej mikroflóre. Tvorba dusíka sa uskutočňuje následne po degradácii väzieb medzi uhlíkom a dusíkom. Preto, ak sa rovnaké miery produkcie dusíka zistia v ošetrenej a kontrolnej pôde, je veľmi pravdepodobné, že hlavné cesty degradácie sú neporušené a funkčné. Substrát vybraný na test (prášková múka z lucerny) má vhodný pomer uhlíka a dusíka (zvyčajne medzi 12/1 a 16/1). Na základe tohto sa deficit uhlíka počas testu zníži a ak sú mikrobiálne populácie poškodené chemikáliou, môžu sa v priebehu 100 dní zotaviť.

Testy, z ktorých sa táto testovacia metóda vyvinula, boli prednostne určené pre látky, pri ktorých sa dá predpokladať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. Toto je prípad, napríklad výrobkov na ochranu rastlín, pri ktorých je známa aplikačná dávka v teréne. V prípade agrochemikálií postačuje testovanie dvoch dávok, ktoré zodpovedajú predpokladanej alebo predpovedanej aplikačnej dávke. Agrochemikálie sa môžu testovať ako aktívne zložky (a.z.) alebo ako zložené výrobky. Test sa však neobmedzuje na agrochemikálie. Zmenením množstva testovanej látky aplikovanej na pôdu a aj spôsobu, akým sa údaje vyhodnocujú, sa môže test použiť aj na chemikálie, v prípade ktorých nie je známe predpokladané množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. A takto sa pre iné chemikálie ako agrochemikálie stanovujú účinky série koncentrácií na transformáciu dusíka. Údaje z týchto testov sa použijú na prípravu krivky reakcie na dávku a vypočítajú sa hodnoty EC_x , kde x je definovaný účinok v percentuálnom vyjadrení.

1.2. DEFINÍCIE

Transformácia dusíka: konečná degradácia organickej látky, ktorá obsahuje dusík, mikroorganizmami prostredníctvom procesu amonifikácie a nitrifikácie na príslušný anorganický konečný produkt nitrát.

EC_x (Efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí x percentnú inhibíciu transformácie dusíka na nitrát.

EC₅₀ (Stredná efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí 50 percentnú (50 %) inhibíciu transformácie dusíka na nitrát.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Preosiata pôda sa doplní s práškovou rastlinnou múkou a buď sa ošetrí testovanou látkou, alebo sa ponechá bez ošetrovania (kontrola). Ak sa testujú agrochemikálie, odporúčajú sa minimálne dve testované koncentrácie a tieto koncentrácie sa vyberú vzhľadom na najvyššiu koncentráciu predpokladanú v teréne. Po 0, 7, 14 dňoch a 28 dňoch inkubácie sa vzorky ošetrovaných a kontrolných pôd extrahujú vo vhodnom rozpúšťadle a stanoví sa množstvo nitrátu v extraktoch. Miera tvorby nitrátu v ošetrovaných vzorkách sa porovná s mierou v kontrolách a vypočíta sa percentuálna odchýlka ošetrovanej vzorky od kontroly. Všetky testy prebiehajú aspoň 28 dní. Ak sú na 28. deň rozdiely medzi ošetrovanými a neošetrovanými pôdami rovnaké alebo väčšie ako 25 %, merania pokračujú do maximálne 100 dní. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, testovaná látka sa pridá v sérii koncentrácií do vzoriek pôdy a zmerajú sa množstvá nitrátu, ktorý sa vytvorí v ošetrovaných a kontrolných vzorkách po 28 dňoch inkubácie. Výsledky z testov s viacerými rozdielnymi koncentraciami sa analyzujú s použitím regresného modelu a vypočítajú sa hodnoty EC_x (t. j. EC₅₀, EC₂₅ a/alebo EC₁₀). Pozri definície.

1.5. VALIDITA TESTU

Hodnotenia výsledkov testu s agrochemikáliami sa zakladajú na relatívne malých rozdieloch (t. j. priemerná hodnota ± 25 %) medzi koncentraciami nitrátu v kontrolných a ošetrovaných vzorkách pôdy, takže veľké odchýlky v kontrolách môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Z tohto dôvodu odchýlka medzi paralelnými kontrolnými vzorkami má byť menšia ako ± 15 %.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Aparatúra

Používajú sa testovacie nádoby, vyrobené z chemicky inertného materiálu. Mali by mať vhodný objem v súlade s postupom, použitým na inkubáciu pôd, t. j. hromadná inkubácia alebo séria jednotlivých vzoriek pôdy (pozri oddiel 1.7.1.2). Je potrebné venovať pozornosť minimalizovaniu strát vody, a aj tomu, aby sa počas testu umožnila výmena plynov (napr. testovacie nádoby sa môžu zakryť perforovanou polyetylénovou fóliou). Keď sa testujú prchavé látky, použijú sa nádoby, ktoré sa dajú utesniť a plynotesné nádoby. Tieto majú mať takú veľkosť, aby mohli byť asi do jednej štvrtiny svojho objemu vyplnené vzorkou pôdy.

Používa sa bežné laboratórne zariadenie vrátane:

- miešacieho zariadenia: mechanická miešačka alebo rovnocenné zariadenie,
- odstredivky (3 000 g) alebo filtračného zariadenia (s beznitrátovým filtračným papierom),
- prístroj s vhodnou citlivosťou reprodukovateľnosťou na analýzu nitrátu.

1.6.2. Výber a počet pôd

Použije sa jediná pôda. Odporúčané charakteristiky pôdy sú tieto:

- obsah piesku: nie menej ako 50 % a nie viac ako 75 %,
- pH: 5,5 – 7,5,
- obsah organického uhlíka: 0,5 – 1,5 %,

- stanoví sa mikrobiálna biomasa (8), (9) a obsah uhlíka v nej má byť aspoň 1 % celkového organického uhlíka v pôde.

Vo väčšine prípadov pôda s týmito charakteristikami predstavuje najhorší prípad, ktorý môže nastať, pretože adsorpcia testovanej chemikálie je minimálna a jej dostupnosť pre mikroflóru je maximálna. Následne nie sú vo všeobecnosti potrebné testy s inými pôdami. Za určitých okolností však, t. j. ak sa predpokladá hlavné použitie testovanej látky v konkrétnych pôdach, ako sú kyslé lesné pôdy, alebo v prípade elektrostaticky nabitých chemikálií, môže byť potrebné použiť ďalšiu pôdu.

1.6.3. Odber a skladovanie vzoriek pôdy

1.6.3.1. Odber

Potrebné sú podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, dátumy ošetrovateľských výrobkov na ochranu rastlín, ošetrovania organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo náhodné kontaminácie. Miesto, vybrané na odber pôdy, má byť také, aby umožňovalo dlhodobé použitie. Stále pasienky, polia s ročnými plodinami (okrem kukurice) alebo husto zasiate rastliny na zelené hnojivo sú vhodné. Vybrané miesto na odber sa nesmie ošetrovať výrobkami na ochranu rastlín minimálne jeden rok pred odberom. Aspoň šesť mesiacov sa nesmie použiť ani žiadne organické hnojivo. Použitie minerálneho hnojiva je prijateľné iba v prípade, ak sa v súlade s požiadavkami na vzorky plodín a vzoriek pôdy neodoberú skôr ako minimálne tri mesiace po aplikácii hnojiva. Je potrebné vyhnúť sa použitiu pôdy ošetrenej hnojivami so známymi biocídnymi účinkami (napr. kyanamid vápenatý).

Vzorky by sa nemali odberať počas alebo bezprostredne po dlhých obdobiach (viac ako 30 dní) sucha alebo nadmernej vlhky. Vzorky ornej pôdy odoberajú z hĺbky 0 až 20 cm. Pre vzorky pôdy z pastvín (lúk) alebo iných pôd, ktoré sa dlhšiu dobu neorú (aspoň jedno vegetačné obdobie), môže byť maximálna hĺbka odberu vzoriek o niečo väčšia ako 20 cm (napr. 25 cm).

Vzorky pôdy sa prepravujú v nádobách a za teplotných podmienok, ktoré zaručujú, že sa pôvodné vlastnosti pôdy významne nezmenia.

1.6.3.2. Uchovávanie

Uprednostňuje sa použitie čerstvo odobratých pôd z terénu. Ak nie je možné vyhnúť sa skladovaniu v laboratóriu, pôdy sa môžu skladovať v tme pri 4 ± 2 °C najviac tri mesiace. Počas uchovávania vzoriek sa musia zabezpečiť aeróbne podmienky. Ak sa pôdy odoberajú z oblastí, kde sú zamrznuté aspoň tri mesiace do roka, môže sa uvažovať o skladovaní šesť mesiacov pri mínus 18 °C až mínus 22 °C. Pred každým pokusom sa stanoví mikrobiálna biomasa skladovaných pôd a uhlík v biomase by mal tvoriť aspoň 1 % z celkového obsahu organického uhlíka v pôde (pozri oddiel 1.6.2).

1.6.4. Manipulácia a príprava pôdy na test

1.6.4.1. Preinkubácia

Ak sa pôda skladuje (pozri oddiel 1.6.3.2), odporúča sa preinkubácia v trvaní medzi 2 a 28 dňami. Teplota a obsah vlhkosti pôdy počas preinkubácie by mali byť rovnaké, ako sú tie, ktoré sa použijú v teste (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

1.6.4.2. Fyzikálno-chemické charakteristiky

Pôda sa ručne zbaví veľkých predmetov (napr. kameňov, častí rastlín atď.) a potom sa vlhká preoseje tak, aby sa príliš nevysušila, na veľkosť častíc menšiu alebo rovnajúcu sa 2 mm. Obsah vlhkosti vzorky pôdy sa nastaví destilovanou alebo deionizovanou vodou na hodnotu medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody.

1.6.4.3. Obohatenie organickým substrátom

Pôda sa obohatí vhodným organickým substrátom, napr. práškovou múkou z lucerny-trávy-zeleného krmiva (hlavná zložka: *Medicago sativa*) s pomerom C/N medzi 12/1 a 16/1. Odporúčaný pomer lucerna – pôda je 5 g lucerny na kilogram pôdy (suchá hmotnosť).

1.6.5. Príprava testovanej látky na aplikáciu do pôdy

Testovaná látka sa zvyčajne aplikuje s použitím nosiča. Nosičom môže byť voda (pre látky rozpustné vo vode) alebo inertná tuhá látka ako napr. jemný kremenný piesok (veľkosť častíc: 0,1 – 0,5 mm). Kvapalné nosiče, ktoré sú iné ako voda (napr. organické rozpúšťadlá ako acetón, chloroform), by sa nemali používať, lebo môžu poškodzovať mikrobiotú. Ak sa ako nosič použije piesok, môže byť pokrytý testovanou látkou, ktorá je rozpustená alebo suspendovaná vo vhodnom rozpúšťadle. V takýchto prípadoch sa rozpúšťadlo pred zmiešaním s pôdou odparí. Pre optimálnu distribúciu testovanej látky v pôde sa odporúča pomer 10 g piesku na kilogram pôdy (suchá hmotnosť). Kontrolné vzorky sa ošetrí iba rovnakým množstvom vody a/alebo kremenného piesku.

Pri testovaní prchavých chemikálií je potrebné pokiaľ možno zabrániť stratám počas ošetrovania a pokúsiť sa o zabezpečenie homogénnej distribúcie v pôde (napr. testovaná látka sa na niekoľkých miestach vstrekuje do pôdy).

1.6.6. Testované koncentrácie

Pri testovaní agrochemikálií by sa mali použiť aspoň dve koncentrácie. Nižšia koncentrácia by mala zohľadňovať prinajmenšom očakávané maximálne množstvo, ktoré sa dostane do pôdy za zvyčajných okolností v praxi, pričom vyššia koncentrácia by mala byť násobkom nižšej koncentrácie. Koncentrácie testovanej látky, pridanej do pôdy, sa vypočítajú za predpokladu jednotného zabudovania do hĺbky 5 cm a objemovej hmotnosti pôdy 1,5. V prípade agrochemikálií, ktoré sa aplikujú priamo do pôdy, alebo v prípade chemikálií, pre ktoré sa dá predpovedať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy, odporúčané testované koncentrácie sú maximálne predpovedané environmentálne koncentrácie [Predicted Environmental Concentration (PEC)] a päťnásobok týchto koncentrácií. Látky, pri ktorých sa očakáva, že sa budú aplikovať do pôdy niekoľkokrát za sezónu, sa testujú s koncentraciami, ktoré sa stanovujú vynásobením PEC maximálnym predpokladaným počtom aplikácií. Horná testovaná koncentrácia by však nemala prekročiť desaťnásobok maximálnej jednorazovej aplikácie dávky. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa geometrický rad s aspoň piatimi koncentraciami. Testované koncentrácie by mali byť v rozsahu potrebnom na stanovenie hodnot EC_{50} .

1.7. VYKONANIE TESTU**1.7.1. Podmienky expozície****1.7.1.1. Ošetrovanie a kontrola**

Pri testovaní agrochemikálií sa pôda rozdelí do troch dávok s rovnakou hmotnosťou. Dve dávky sa zmiešajú s nosičom, ktorý obsahuje produkt, a ďalšia sa zmieša s nosičom bez produktu (kontrola). Odporúčajú sa minimálne tri paralelné vzorky pre ošetrovanú a aj neošetrovanú pôdu. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálií sa pôda rozdelí do šiestich dávok s rovnakou hmotnosťou. Päť vzoriek sa zmieša s nosičom, ktorý obsahuje testovanú látku, a šiesta vzorka sa zmieša s nosičom bez chemikálie. Odporúčajú sa tri paralelné vzorky pre ošetrovanú a aj kontrolnú pôdu. Je potrebné venovať pozornosť zabezpečeniu homogénnej distribúcie testovanej látky v ošetrovaných vzorkách pôdy. Počas zmiešavania je potrebné zabrániť, aby sa pôda ubila, alebo sa vytvorili hrudky.

1.7.1.2. Inkubácia vzoriek pôdy

Inkubácia vzoriek pôdy sa môže vykonať dvomi spôsobmi: ako hromadné vzorky každej ošetrovanej a neošetrovanej pôdy alebo série jednotlivých a rovnako veľkých čiastočných vzoriek každej ošetrovanej a neošetrovanej pôdy. Ak sa však testujú prchavé látky, test sa uskutoční len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú hromadne, pripravujú sa veľké množstvá ošetrovanej a neošetrovanej pôdy a čiastočné vzorky, ktoré sa majú analyzovať, sa odoberú podľa potreby počas testu. Množstvo pripravené na začiatku pre každé ošetrovanie a kontrolu závisí od veľkosti čiastočných vzoriek, počtu paralelných vzoriek použitých na analýzu a predpokladaného maximálneho počtu odberov vzoriek. Pôdy inkubované hromadne sa dôkladne premiešajú pred odberom čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú ako série jednotlivých vzoriek pôdy, každá ošetrovaná a neošetrovaná hromadne inkubovaná pôda sa rozdelí do požadovaného počtu čiastočných vzoriek a tieto vzorky sa použijú podľa potreby. V pokusoch, pri ktorých sa predpokladajú viac ako dva odbery, sa pripraví dostatočný počet čiastočných vzoriek, aby sa zohľadnili všetky paralelné vzorky a odbery. Aspoň tri paralelné vzorky testovanej pôdy by sa mali inkubovať za aeróbnych podmienok. Počas všetkých testov by sa mali použiť vhodné nádoby s dostatočnou plynnou fázou, aby sa zabránilo vytvoreniu anaeróbných podmienok. Ak sa testujú prchavé látky, test sa uskutoční len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek.

1.7.1.3. Podmienky testu a trvanie

Test sa uskutočňuje v tme pri teplote miestnosti 20 ± 2 °C. Obsah vlhkosti vzoriek pôdy by sa mal počas testu zachovať medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde (pozri oddiel 1.6.4.2) s rozptátím ± 5 %. Podľa potreby sa môže pridať destilovaná, deionizovaná voda.

Minimálne trvanie testu je 28 dní. Pri testovaní agrochemikálií sa porovnáva miera tvorby nitrátu v ošetrovaných a kontrolných vzorkách. Ak sa odlišujú o viac ako 25 % na 28. deň, test pokračuje, pokiaľ sa nedosiahne rozdiel rovný alebo menší ako 25 %, alebo maximálne 100 dní, podľa toho, čo je kratšie. V prípade iných látok ako agrochemikálie sa test ukončí po 28 dňoch. Na 28. deň sa množstvo nitrátu v ošetrovaných a kontrolných vzorkách pôdy stanoví a vypočítajú sa hodnoty EC_x .

1.7.2. Odber vzoriek a analýza pôd

1.7.2.1. Harmonogram odberu vzoriek

Pri testovaní agrochemikálií sa vzorky pôdy analyzujú na nitrát v dni 0, 7, 14 a 28. Ak je potrebný predĺžený test, uskutočnia sa po 28. dni ďalšie merania v 14-denných intervaloch.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie použije sa aspoň päť testovaných koncentrácií a vzorky pôdy sa analyzujú na nitrát na začiatku (deň 0) a na konci expozície (28 dní). Ak sa to pokladá za potrebné, môže sa pridať napr. na siedmy deň prechodné meranie. Údaje získané na 28. deň sa použijú na stanovenie hodnoty EC_x pre chemikáliu. V prípade potreby sa môžu použiť v správe o počiatočnom množstve nitrátu v pôde údaje kontrolných vzoriek z dňa 0.

1.7.2.2. Analýza vzoriek pôdy

Množstvo nitrátu, ktoré sa vytvorí v každej ošetrenej a kontrolnej paralelnej vzorke, sa stanoví pri každom odbere. Nitrát sa extrahuje z pôdy pretrepávaním vzoriek s vhodným extrakčným činidlom, napr. 0,1 M roztokom chloridu draselného. Odporúča sa pomer 5 ml KCl na gram suchého hmotnostného ekvivalentu pôdy. Na optimalizáciu extrakcie by mali byť nádoby, v ktorých sa nachádza pôda a extrakčné činidlo, naplnené najviac do polovice. Zmesi sa pretrepávajú 60 minút pri 150 otáčkach za minútu (rpm). Zmesi sa odstreďujú alebo prefiltrujú a kvapalnú fázu sa analyzujú na nitrát. Kvapalné extrakty, ktoré neobsahujú častice, sa môžu skladovať pred analýzou pri mínus 20 ± 5 °C do šiestich mesiacov.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Ak sa test uskutočňuje s agrochemikáliami, množstvo nitrátu, ktoré sa vytvorí v každej paralelnej vzorke pôdy, sa zaznamená a priemerné hodnoty všetkých paralelných vzoriek sa uvedú v podobe tabuliek. Miera transformácie dusíka sa vyhodnotí vhodnými a všeobecne uznávanými štatistickými metódami (napr. F-test, 5 % úroveň významnosti). Množstvá vytvoreného nitrátu v mg nitrátu/kg suchej hmotnosti pôdy/deň. Miera tvorby nitrátu v každej ošetrenej vzorke sa porovná s kontrolnou vzorkou a vypočíta sa percentuálna odchýlka od kontrolnej vzorky.

Ak sa test uskutočňuje s inými látkami ako agrochemikáliami, stanoví sa množstvo vytvoreného nitrátu v každej paralelnej vzorke a krivka reakcie na dávku na stanovenie hodnôt EC_x . Množstvá nitrátu (t. j. mg nitrátu/kg suchej hmotnosti pôdy) zistené v ošetrovaných vzorkách po 28 dňoch sa porovná s množstvami zistenými v kontrole. Z týchto údajov sa vypočítajú hodnoty inhibície v percentuálnom vyjadrení pre každú testovanú koncentráciu. Tieto percentuálne hodnoty sa vynesú proti koncentrácií a potom sa použijú štatistické postupy na výpočet hodnôt EC_x . Hranice spoľahlivosti ($p = 0,95$) pre vypočítané EC_x sa tiež stanoví s použitím štandardných postupov (10), (11), (12).

Testované látky, ktoré obsahujú veľké množstvá dusíka, môžu prispieť k množstvám nitrátu vytvoreného počas testu. Ak sa tieto látky testujú pri vysokej koncentrácii (napr. chemikálie, pri ktorých sa predpokladá opakované používanie), musia sa zahrnúť do testu príslušnej kontroly (t. j. pôda plus testovaná látka, ale bez rastlinnej múky). Údaje z týchto kontrol sa musia zohľadniť vo výpočtoch EC_x .

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak je pri hodnotení výsledkov z testov s agrochemikáliami rozdiel v miere tvorby nitrátu medzi nižším ošetrovaním (t. j. maximálna očakávaná koncentrácia) a kontrolou rovný alebo menší ako 25 % pri každom odbere vzoriek po dni 28, môže sa vyhodnotiť, že produkt nemá dlhodobý vplyv na transformáciu dusíka v pôdach. Pri hodnotení výsledkov testov s inými chemikáliami ako agrochemikáliami sa používajú hodnoty EC_{50} , EC_{25} a/alebo EC_{10} .

3. PODÁVANIE SPRÁV

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Úplnú identifikáciu použitej pôdy, vrátane:

- geografických údajov o mieste (zemepisná šírka, dĺžka),
- informácie o histórii miesta (t. j. rastlinný porast, ošetrovania s výrobkami na ochranu rastlín, ošetrovania s hnojivami, náhodná kontaminácia atď.),
- štruktúra využitia (napr. poľnohospodárska pôda, les atď.),
- hĺbka odberu vzoriek (cm),
- obsah piesku/bahna/ílu (% suchej hmotnosti),
- pH (vo vode),
- obsah organického uhlíka (% suchej hmotnosti),
- obsah dusíka (% suchej hmotnosti),
- počiatočná koncentrácia nitrátu (mg nitrátu/kg suchej hmotnosti),
- kapacita výmeny kationov (mmol/kg),
- mikrobiálna biomasa v percentách celkového organického uhlíka,
- údaje o metódach použitých na stanovenie každého parametra,
- všetky informácie týkajúce sa odberu a skladovania vzoriek pôdy,
- údaje o prípadnej preinkubácii pôdy.

Testovaná látka:

- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,
- chemické identifikačné údaje, v prípade potreby vrátane štruktúrneho vzorca, čistoty (t. j. v prípade výrobkov na ochranu rastlín percento účinnej látky), obsah dusíka.

Substrát:

- zdroj substrátu,
- zloženie (t. j. múka z lucerny, múka z lucerny – trávy – zeleného krmiva),
- obsah uhlíka, dusíka (% suchej hmotnosti),
- veľkosť otvorov sita (mm).

Testovacie podmienky:

- údaje o obohatení pôdy organickým substrátom,
- počet použitých koncentrácií testovanej chemikálie a v prípade potreby zdôvodnenie vybraných koncentrácií,
- údaje o aplikácii testovanej látky do pôdy,
- inkubačná teplota,
- obsah vlhkosti v pôde na začiatku a počas testu,
- použitá metóda inkubácie pôdy (t. j. hromadná alebo ako séria jednotlivých čiastkových vzoriek),
- počet paralelných vzoriek,
- počet odberov,
- metóda použitá na extrakciu nitrátu z pôdy.

Výsledky:

- analytický postup a zariadenie použité na analýzu nitrátu,
- údaje vo forme tabuliek, vrátane jednotlivých a priemerných hodnôt pri stanovení nitrátu,
- odchýlka medzi paralelnými a kontrolnými vzorkami,
- vysvetlenie prípadných korekcií pri výpočtoch,
- percentuálna odchýlka v mierach tvorby nitrátu pri každom odbere alebo v prípade potreby hodnota EC_{50} s 95 % hranicou spoľahlivosti, iné EC_x (t. j. EC_{25} alebo EC_{10}) s intervalmi spoľahlivosti a graf krivky reakcie na dávku,
- štatistické spracovanie výsledkov,
- všetky informácie a pozorovania umožňujúce interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

- (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) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

-
- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.
 - (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.
 - (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
 - (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
 - (10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 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.

C.22. PÔDNE MIKROORGANIZMY: TRANSFORMAČNÝ TEST UHLÍKA

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 217 (2000).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu, určenú na skúmanie dlhodobých potenciálnych účinkov chemikálií jednorazovej expozície výrobkami na ochranu rastlín, a prípadne iných chemikálií, na aktivitu pôdných mikroorganizmov transformovať uhlík. Test sa v podstate zakladá odporúčaniami Organizácie na ochranu rastlín v Európe a stredomorskej oblasti (1). Zohľadnili sa aj ďalšie usmernenia ako German Biologische Bundesanstalt (2), US Environmental Protection Agency (3) a SETAC (4). OECD workshop o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v Belgirate, Taliansko, v roku 1995 (5) sa dohodol na množstve a type pôd používaných v tomto teste. Odporúčania pre odoberanie, manipuláciu a skladovanie vzoriek pôdy sa zakladajú na Usmerňovacom dokumente ISO (6) a odporúčaní z workshopu v Belgirate.

Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností testovaných látok sa môže vyžadovať stanovenie účinkov na mikrobiálnu aktivitu pôdy, napr. keď sa vyžadujú údaje o potenciálnych vedľajších účinkoch výrobkov na ochranu rastlín na pôdnu mikroflóru, alebo ak sa predpokladá expozícia pôdných mikroorganizmov iným chemikáliám, ako sú výrobky na ochranu rastlín. Test transformácie uhlíka sa vykonáva na stanovenie účinkov takýchto chemikálií na pôdnu mikroflóru. Ak sa testujú agrochemikálie (napr. výrobky na ochranu rastlín, hnojivá, chemikálie používané v lesnom hospodárstve) vykonáva sa test transformácie uhlíka a aj test transformácie dusíka. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, test transformácie dusíka je postačujúci. Ak však hodnoty EC_{50} testu transformácie dusíka pre takéto chemikálie sú v rozsahu zistenom pre komerčne dostupné inhibitory nitrifikácie (napr. nitrapyrín), na získanie ďalších informácií sa môže vykonať test transformácie uhlíka.

Pôdy pozostávajú zo živých a neživých zložiek, ktoré existujú v komplexných a heterogénnych zmesiach. Mikroorganizmy zohrávajú významnú úlohu pri rozkladaní a transformácii organických látok v úrodných pôdach, pričom mnohé druhy prispievajú k rôznym aspektom úrodnosti pôdy. Každý dlhodobý vplyv na tieto biochemické procesy by mohol potenciálne narušiť obeh živín a to by mohlo ovplyvniť úrodnosť pôdy. Transformácia uhlíka a dusíka sa vyskytuje vo všetkých úrodných pôdach. Aj keď sa mikrobiálne populácie, zodpovedné za tieto procesy, odlišujú v prípade jednotlivých pôd, cesty transformácie sú v podstate rovnaké.

Táto testovacia metóda je určená na stanovenie dlhodobých nepriaznivých účinkov látky na proces transformácie uhlíka v aeróbných povrchových pôdach. Tento test je citlivý na zmeny veľkosti a aktivity mikrobiálnych populácií, zodpovedných za transformáciu uhlíka, keďže vystavuje tieto populácie pôsobeniu chemikálií a nedostatku uhlíka. Používa sa piesková pôda, chudobná na organické látky. Táto pôda sa ošetrí testovanou látkou a inkubuje za podmienok, ktoré umožňujú rýchly mikrobiálny metabolizmus. Za týchto podmienok sa zdroje ľahko dostupného uhlíka v pôde rýchlo spotrebujú. Toto spôsobí nedostatok uhlíka, ktoré zabíja mikrobiálne bunky a vyvoláva latentný stav a/alebo sporuláciu. Ak test prebieha viac ako 28 dní, súhrn týchto reakcií sa môže stanoviť v kontrolách (neošetrenej pôdy) ako progresívna strata metabolicky aktívnej biomasy (7). Ak na biomasu v pôde vystavenú nedostatku uhlíka, v podmienkach testu pôsobí prítomnosť chemikálie, nemusí sa vrátiť na rovnakú úroveň ako kontrola. A preto narušenie spôsobené testovanou látkou kedykoľvek počas testu bude často pretrvávajúť do konca testu.

Testy, z ktorých sa táto testovacia metóda vyvinula, boli prednostne určené pre látky, pri ktorých sa dá predpokladať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. Napríklad v prípade výrobkov na ochranu rastlín, pri ktorých je známa aplikačná dávka v teréne. V prípade agrochemikálií je testovanie dvoch dávok, ktoré zodpovedajú predpokladanej alebo predpovedanej aplikačnej dávke, dostačujúce. Agrochemikálie sa môžu testovať ako aktívne zložky (a.z.) ako zložené výrobky. Test však sa však obmedzuje na chemikálie s predvídateľnými environmentálnymi koncentraciami. Zmenením množstva testovanej látky aplikovanej na pôdu a spôsobu, akým sa údaje vyhodnocujú, sa test môže použiť aj na chemikálie, v prípade ktorých nie je známe predpokladané množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. A tým sa pri iných chemikáliách ako agrochemikáliách stanovujú účinky série koncentrácií na transformáciu uhlíka. Údaje z týchto testov sa použijú na prípravu krivky vzťahu medzi dávkou a reakciou a vypočítajú sa hodnoty EC_x , kde x je definované ako účinok v percentuálnom vyjadrení.

1.2. DEFINÍCIE

Transformácia uhlíka: je degradácia organickej látky mikroorganizmami na anorganický konečný produkt oxid uhličitý.

EC_x (Efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí x percentnú inhibíciu transformácie uhlíka na oxid uhličitý.

EC₅₀ (Stredná efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí 50 percentnú inhibíciu transformácie uhlíka na oxid uhličitý.

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Preosiata pôda sa ošetrí testovanou látkou, alebo sa ponechá bez ošetrovania (kontrola). Ak sa testujú agrochemikálie, odporúčajú sa minimálne dve testované koncentrácie a tieto koncentrácie sa vyberú vo vzťahu k najvyššej koncentrácii predpokladanej v teréne. Po 0., 7., 14. a 28. dni inkubácie sa vzorky ošetrovaných a kontrolných pôd zmiešajú s glukózou a merajú sa glukózou indukované rýchlosti respirácie po sebe nasledujúcich 12 hodín. Rýchlosti respirácie sa vyjadrujú ako uvoľnený oxid uhličitý (mg oxidu uhličitého/kg suchej pôdy/h) alebo spotrebovaný kyslík (mg kyslíka/kg pôdy/h). Priemerná rýchlosť respirácie vo vzorkách s ošetrovanou pôdou sa porovná s pôdou v kontrole a vypočíta sa percentuálna odchýlka ošetrovanej pôdy od kontroly. Všetky testy prebiehajú aspoň 28 dní. Ak na 28. deň sa rozdiely medzi ošetrovanými a neošetrovanými pôdami rovnajú alebo sú väčšie ako 25 %, merania pokračujú v 14 dňových intervaloch do maximálne 100 dní. Ak sa testujú iné chemikálie ako agrochemikálie, pridáva sa séria koncentrácií testovanej látky ku vzorkám pôdy a glukózou indukované rýchlosti respirácie (t. j. priemer množstiev vzniknutého oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka) sa stanovujú po 28 hodinách. Výsledky z testov zo série koncentrácií sa analyzujú s použitím regresného modelu a vypočítajú sa hodnoty EC_x (t. j. EC₅₀, EC₂₅ a/alebo EC₁₀). Pozri definície.

1.5. VALIDITA TESTU

Hodnotenia výsledkov testu s agrochemikáliami sa zakladajú na relatívne malých rozdieloch (t. j. priemerná hodnota $\pm$ 25 %) medzi uvoľneným oxidom uhličitým alebo spotrebovaným kyslíkom v (alebo prostredníctvom) kontrolných a ošetrovaných vzorkách pôdy, takže veľké odchýlky v kontrolách môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Z tohto dôvodu odchýlka medzi paralelnými kontrolnými vzorkami má byť menšia ako $\pm$ 15 %.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. Aparatúra

Použijú sa testovacie nádoby, vyrobené z chemicky inertného materiálu. Mali by mať vhodný objem v súlade s postupom použitým na inkubáciu pôd, t. j. hromadná inkubácia alebo séria jednotlivých vzoriek pôdy (pozri oddiel 1.7.1.2). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa minimalizovali straty vody, a aj tomu, aby sa počas testu umožnila výmena plynov (napr. testovacie nádoby sa môžu zakryť perforovanou polyetylénovou fóliou). Keď sa testujú prchavé látky, použijú sa nádoby, ktoré je možné utesniť a plynotesné nádoby. Tieto nádoby by mali mať takú veľkosť, aby mohli byť asi do jednej štvrtiny svojho objemu vyplnené vzorkou pôdy.

Na stanovenie glukózou indukovanej respirácie sa vyžadujú inkubačné systémy a prístroje na meranie tvorby oxidu uhličitého alebo spotreby kyslíka. Príklady takýchto systémov a nástrojov sa nachádzajú v literatúre (8), (9), (10), (11).

1.6.2. Výber a počet pôd

Použije sa jediná pôda. Odporúčané charakteristiky pôdy sú tieto:

- obsah piesku: nie menej ako 50 % a nie viac ako 75 %;
- pH: 5,5 – 7,5;
- obsah organického uhlíka: 0,5 – 1,5 %;
- mikrobiálna biomasa sa zmeria (12), (13) a jej obsah uhlíka by mal byť aspoň 1 % celkového organického uhlíka v pôde.

Vo väčšine prípadov pôda s týmito charakteristikami predstavuje najhorší prípad, ktorý môže nastať, pretože adsorpcia testovanej chemikálie je minimálna a jej dostupnosť pre mikroflóru je maximálna. Následne nie sú vo všeobecnosti potrebné testy s inými pôdami. Za určitých okolností však, t. j. ak sa predpokladá hlavné použitie testovanej látky v konkrétnych pôdach, ako sú kyslé lesné pôdy, alebo v prípade elektrostaticky nabitých chemikálií, sa môže vyžadovať použitie ďalšej pôdy.

1.6.3. **Odber a skladovanie vzoriek pôdy**

1.6.3.1. *Odber*

K dispozícii by mali byť podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, dátumy ošetrových výrobkami na ochranu rastlín, ošetrovania organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo náhodné kontaminácie. Miesto, vybraté na odber pôdy, má byť také, aby umožňovalo dlhodobé použitie. Vhodné sú stále pasienky, polia s ročnými plodinami (okrem kukurice) alebo husto zasiate rastliny na zelené hnojivo. Vybraté miesto na odber sa nesmie ošetrovať výrobkami na ochranu rastlín minimálne jeden rok pred odberom. Aspoň šesť mesiacov sa nesmie použiť ani žiadne organické hnojivo. Použitie minerálneho hnojiva je prijateľné iba v prípade, ak je potrebné pre plodiny a vzorky pôdy sa neodoberú skôr ako aspoň tri mesiace po aplikácii hnojiva. Je potrebné vyhnúť sa použitiu pôdy ošetrenej hnojivami so známymi biocídnymi účinkami (napr. kyanamid vápenatý).

Vzorky sa neodoberajú počas dlhých období (viac ako 30 dní) sucha alebo nadmernej vlhky alebo bezprostredne po nich. Vzorky ornej pôdy odoberajú z hĺbky 0 až 20 cm. Pre vzorky pôdy z pastvín (lúk) alebo iných pôd, ktoré sa dlhšiu dobu neorú (aspoň jedno vegetačné obdobie), môže byť maximálna hĺbka odberu vzoriek o niečo väčšia ako 20 cm (napr. 25 cm). Vzorky pôdy sa prepravujú v nádobách a za teplotných podmienok, ktoré zaručujú, že sa pôvodné vlastnosti pôdy významne nezmenia.

1.6.3.2. *Uchovávanie*

Uprednostňuje sa použitie čerstvo odobratých pôd z terénu. Ak sa nedá zabrániť skladovaniu v laboratóriu, pôdy sa môžu skladovať v tme pri 4 ± 2 °C najviac tri mesiace. Počas uchovávania vzoriek sa musia zabezpečiť aeróbne podmienky. Ak sa pôdy odoberajú z oblastí, kde sú zamrznuté aspoň tri mesiace do roka, môže sa uvažovať o skladovaní šesť mesiacov pri mínus 18 °C. Pred každým pokusom sa stanoví mikrobiálna biomasa skladovaných pôd a uhlík v biomase má tvoriť aspoň 1 % celkového obsahu organického uhlíka v pôde (pozri oddiel 1.6.2).

1.6.4. **Manipulácia a príprava pôdy na test**

1.6.4.1. *Preinkubácia*

Ak sa pôda skladuje (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3), odporúča sa preinkubácia v trvaní medzi 2 a 28 dňami. Teplota a obsah vlhkosti pôdy počas preinkubácie by mali byť rovnaké, ako sa použije v teste (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Fyzikálno-chemické charakteristiky*

Pôda sa ručne zbaví veľkých predmetov (napr. kameňov, častí rastlín atď.) a potom sa vlhká preoseje tak, aby sa príliš vysušila, na veľkosť častíc menšiu alebo rovnajúcu sa 2 mm. Obsah vlhkosti vzorky pôdy sa nastaví destilovanou alebo deionizovanou vodou na hodnotu medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody.

1.6.5. **Príprava testovanej látky na aplikáciu do pôdy**

Testovaná látka sa zvyčajne aplikuje s použitím nosiča. Nosičom môže byť voda (pre látky rozpustné vo vode) alebo inertná tuhá látka ako napr. jemný kremenný piesok (veľkosť častíc: 0,1 – 0,5 mm). Kvapalné nosiče, ktoré sú iné ako voda (napr. organické rozpúšťadlá ako acetón, chloroform), by sa nemali používať, lebo môžu poškodzovať mikroflóru. Ak sa použije piesok ako nosič, môže byť pokrytý testovanou látkou rozpustenou alebo suspendovanou vo vhodnom rozpúšťadle. V takýchto prípadoch sa rozpúšťadlo pred zmiešaním s pôdou odparí. Pre optimálnu distribúciu testovanej látky v pôde sa odporúča pomer 10 g piesku na kilogram pôdy (suchá hmotnosť). Kontrolné vzorky sa ošetrí iba rovnakým množstvom vody a/alebo kremenného piesku.

Pri testovaní prchavých chemikálií je potrebné zabrániť stratám počas ošetrovania a pokúsiť sa o zabezpečenie homogénnej distribúcie v pôde (napr. testovaná látka sa na niekoľkých miestach vstriečne do pôdy).

1.6.6. Testované koncentrácie

Ak sa testujú výrobky na ochranu rastlín alebo iné chemikálie s predvídateľnými environmentálnymi koncentraciami, použijú sa aspoň dve koncentrácie. Nižšia koncentrácia by mala zohľadňovať prinajmenšom očakávané maximálne množstvo, ktoré sa dostane do pôdy za zvyčajných okolností v praxi, pričom vyššia koncentrácia by mala byť násobkom nižšej koncentrácie. Koncentrácie testovanej látky pridanej do pôdy sa vypočítajú za predpokladu jednotného zabudovania do hĺbky 5 cm a objemovej hmotnosti pôdy 1,5. V prípade agrochemikálií, ktoré sa aplikujú priamo do pôdy, alebo v prípade chemikálií, pre ktoré sa dá predpovedať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy, odporúčané testovacie koncentrácie sú maximálne predvídateľné environmentálne koncentrácie [Predictable Environmental Concentration (PEC)] a päťnásobok týchto koncentrácií. Látky, pri ktorých sa očakáva, že sa budú aplikovať do pôd niekoľkokrát za sezónu, sa testujú s koncentraciami, ktoré sa stanovujú vynásobením PEC maximálnym predpokladaným počtom aplikácií. Horná testovaná koncentrácia by však nemala prekročiť desaťnásobok maximálnej jednorazovej aplikácie dávky.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa geometrický rad s aspoň piatimi koncentraciami. Odporúča sa, aby testované koncentrácie boli v rozsahu potrebnom na stanovenie hodnôt EC_{50} .

1.7. VYKONANIE TESTU

1.7.1. Podmienky expozície

1.7.1.1. Ošetrovanie a kontrola

Pri testovaní agrochemikálií, sa pôda rozdelí do troch dávok s rovnakou hmotnosťou. Dve dávky sa zmiešajú s nosičom, ktorý obsahuje produkt a ďalšia sa zmieša s nosičom bez produktu (kontrola). Odporúčajú sa minimálne tri paralelné vzorky pre ošetrovanú a aj neošetrovanú pôdu. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálií sa pôda rozdelí do šiestich dávok s rovnakou hmotnosťou. Päť vzoriek sa zmieša s nosičom obsahujúcim testovanú látku a šiesta vzorka sa zmieša s nosičom bez chemikálie. Odporúčajú sa tri paralelné vzorky pre ošetrovanú a aj kontrolnú vzorku. Je potrebné venovať pozornosť zabezpečeniu homogénnej distribúcie testovanej látky v ošetrovaných vzorkách pôdy. Počas miešania je potrebné zabrániť, aby sa pôda ubila, alebo sa vytvorili hrudky.

1.7.1.2. Inkubácia vzoriek pôdy

Inkubácia vzoriek pôdy sa môže vykonať dvomi spôsobmi: ako hromadné vzorky každej ošetrovanej a neošetrovanej pôdy alebo série jednotlivých a rovnako veľkých čiastočných vzoriek každej ošetrovanej a neošetrovanej pôdy. Ak sa však testujú prchavé látky, test by sa mal uskutočniť len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú hromadne, pripravujú sa veľké množstvá ošetrovanej a neošetrovanej pôdy a čiastočné vzorky, ktoré sa majú analyzovať, sa odoberú podľa potreby počas testu. Množstvo pripravené na začiatku pre každé ošetrovanie a kontrolu závisí od veľkosti čiastočných vzoriek, počtu paralelných vzoriek použitých na analýzu a predpokladaného maximálneho počtu odberov vzoriek. Pôdy, inkubované hromadne, sa dôkladne premiešajú pred odberom čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú ako série jednotlivých vzoriek pôdy, každá ošetrovaná a neošetrovaná hromadne inkubovaná pôda sa rozdelí do požadovaného počtu čiastočných vzoriek a tieto vzorky sa použijú podľa potreby. V experimentoch, pri ktorých sa predpokladá viac ako dva odbery, sa pripraví dostatočný počet čiastočných vzoriek, aby sa zohľadnili všetky paralelné vzorky a odbery. Odporúča sa, aby sa aspoň tri paralelné vzorky testovanej pôdy inkubovali za aeróbnych podmienok (pozri oddiel 1.7.1.1). Počas všetkých testov sa by sa mali použiť vhodné nádoby s dostatočnou plynnou fázou, aby sa zabránilo vytvoreniu anaeróbnych podmienok. Ak sa testujú prchavé látky, test sa by sa mal vykonať len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek.

1.7.1.3. Podmienky testu a trvanie

Test sa uskutočňuje v tme pri teplote miestnosti 20 ± 2 °C. Obsah vlhkosti vzoriek pôdy sa počas testu zachová medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde (pozri oddiel 1.6.4.2) s rozpätím ± 5 %. Podľa potreby sa môže pridať destilovaná, deionizovaná voda.

Minimálne trvanie testu je 28 dní. Pri testovaní agrochemikálií sa porovnávajú množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v ošetrovaných a kontrolných vzorkách. Ak sa odlišujú o viac ako 25 % na 28. deň, test pokračuje, pokiaľ sa nedosiahne rozdiel, ktorý sa rovná alebo je menší ako 25 %, alebo maximálne 100 dní, podľa toho, čo je kratšie. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálie sa test ukončí po 28 dňoch. Na 28. deň sa množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v ošetrovaných a kontrolných vzorkách pôdy stanovujú a vypočítajú sa hodnoty EC_{50} .

1.7.2. Odber vzoriek a analýza pôd

1.7.2.1. Harmonogram odberu vzoriek

Pri testovaní agrochemikálií sa vzorky pôdy analyzujú na glukózou indukované rýchlosti respirácie v dni 0, 7, 14 a 28. Ak je potrebný predĺžený test, uskutočnia sa po 28. dni ďalšie merania v 14-denných intervaloch.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa aspoň päť testovaných koncentrácií a vzorky pôdy sa analyzujú na glukózou indukovanú respiráciu na začiatku (deň 0) a na konci vymedzeného času expozície (28 dní). Ak sa to pokladá za potrebné, môže sa pridať napr. na 7. deň prechodné meranie. Údaje, získané na 28. deň, sa použijú na stanovenie hodnoty EC_x pre chemikáliu. Podľa potreby sa môžu použiť údaje kontrolných vzoriek z dňa 0 na odhad počiatočných množstiev metabolicky aktívnej biomasy v pôde (12).

1.7.2.2. Meranie glukózou indukovaných rýchlostí respirácie

Rýchlosť respirácie, indukovaná glukózou v každej ošetrenej a kontrolnej paralelnej vzorke, sa stanoví pri každom odbere. Vzorky pôdy sa zmiešajú s dostatočným množstvom glukózy, aby sa zistila okamžitá maximálna respiračná reakcia. Množstvo glukózy, potrebnej na zistenie maximálnej respiračnej reakcie z danej pôdy, sa môže stanoviť v predbežnom teste s použitím série koncentrácií glukózy (14). Pre pieskové pôdy s 0,5 – 1,5 % organického uhlíka, 2 000 mg až 4 000 mg glukózy na kg suchej hmotnosti pôdy je zvyčajne dostačujúce. Glukóza sa môže pomlieť na prášok s čistým kremenným pieskom (10 g piesku/kg suchej hmotnosti pôdy) a homogénne sa zmieša s pôdou.

Vzorky s pridanou glukózou sa inkubujú vo vhodnej aparatúre na stanovenie rýchlosti respirácie buď kontinuálne, každú hodinu, alebo každé dve hodiny (pozri oddiel 1.6.1) pri 20 ± 2 °C. Uvoľnený oxid uhličitý alebo spotrebovaný kyslík sa stanoví 12 po sebe nasledujúcich 12 hodín a merania sa začnú čo najskôr, t. j. do 1 až 2 hodín po pridaní glukózy. Celkové množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka počas 12 hodín sa zmerajú a stanovia sa priemerné rýchlosti respirácie.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Ak sa testujú agrochemikálie, množstvo uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v každej paralelnej vzorke pôdy sa zaznamená a priemerné hodnoty všetkých paralelných vzoriek sa uvedú v podobe tabuliek. Výsledky sa vyhodnotia vhodnými a všeobecne uznávanými štatistickými metódami (napr. F-test, 5 % úroveň významnosti). Rýchlosti respirácie indukovanej glukózou sa vyjadrujú v mg oxidu uhličitého/kg suchej hmotnosti pôdy/h alebo mg kyslíka/suchú hmotnosť pôdy/h. Priemerná hodnota miery tvorby oxidu uhličitého alebo priemerná hodnota miery spotrebovaného kyslíka sa porovná s hodnotami v kontrole a vypočíta sa percentuálna odchýlka od kontroly.

Ak sa test uskutočňuje s inými látkami ako agrochemikáliami, stanovia sa množstvá uvoľneného oxidu uhličitého a spotrebovaného kyslíka v každej paralelnej vzorke a vyhotoví sa krivka reakcie na dávku na stanovenie hodnôt EC_x . Rýchlosti respirácie indukovanej glukózou (t. j. mg oxidu uhličitého/kg suchej hmotnosti pôdy/h alebo mg kyslíka/suchú hmotnosť pôdy/h) zistené v ošetrených vzorkách po 28 dňoch sa porovnávajú s hodnotami zistenými v kontrole. Z týchto údajov sa vypočítajú hodnoty inhibície v percentuálnom vyjadrení pre každú testovanú koncentráciu. Tieto percentuálne hodnoty sa vynesú proti koncentracii a použijú sa štatistické postupy na výpočet hodnôt EC_x . Hranice spoľahlivosti ($p = 0,95$) pre vypočítané EC_x sa stanovia tiež s použitím štandardných postupov (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak sa pri hodnotení výsledkov z testov s agrochemikáliami rozdiel v rýchlostiach respirácie medzi ošetrením s nižšími dávkami (t. j. maximálna očakávaná koncentrácia) a kontrolou rovná alebo je menší ako 25 % pri každom odbere vzoriek po dni 28, môže sa vyhodnotiť, že produkt nemá dlhodobý vplyv na transformáciu uhlíka v pôde. Pri hodnotení výsledkov testov s chemikáliami inými ako agrochemikáliami sa používajú hodnoty EC_{50} , EC_{25} a/alebo EC_{10} .

3. PODÁVANIE SPRÁV**SPRÁVA O TESTE**

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Úplnú identifikáciu použitej pôdy vrátane:

- geografických údajov o mieste (zemepisná šírka, zemepisná dĺžka),
- informácie o histórii miesta (t. j. rastlinný porast, ošetrovania s výrobkami na ochranu rastlín, ošetrovania s hnojivami, náhodná kontaminácia atď.),
- štruktúra využitia (napr. poľnohospodárska pôda, les atď.),
- hĺbka odberu vzoriek (cm),
- obsah piesku/bahna/ílu (% suchej hmotnosti),
- pH (vo vode),
- obsah organického uhlíka (% suchej hmotnosti),
- obsah dusíka (% suchej hmotnosti),
- kapacita výmeny kationov (mmol/kg),
- počiatočná mikrobiálna biomasa v percentách celkového organického uhlíka,
- údaje o metódach použitých na stanovenie každého parametra,
- všetky informácie týkajúce sa odberu a skladovania vzoriek pôdy,
- údaje o prípadnej preinkubácii pôdy.

Testovaná látka:

- fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,
- chemické identifikačné údaje, v prípade potreby vrátane štruktúrneho vzorca, čistoty (t. j. v prípade výrobkov na ochranu rastlín percento účinnej látky), obsahu dusíka.

Testovacie podmienky:

- údaje o obohatení pôdy organickým substrátom,
- počet použitých koncentrácií testovanej chemikálie a v prípade potreby zdôvodnenie vybratých koncentrácií,
- údaje o aplikácii testovanej látky do pôdy,
- inkubačná teplota,
- obsah vlhkosti pôdy na začiatku a počas testu,

- použitá metóda inkubácie pôdy (t. j. hromadná alebo ako séria jednotlivých čiastkových vzoriek),
- počet paralelných vzoriek,
- časy odberov.

Výsledky:

- metóda a zariadenie použité na meranie rýchlostí respirácie,
- údaje v podobe tabuliek, vrátane jednotlivých a priemerných hodnôt množstiev oxidu uhličitého alebo kyslíka,
- odchýlka medzi paralelnými a kontrolnými vzorkami,
- vysvetlenie prípadných korekcií pri výpočtoch,
- percentuálna odchýlka v glukózou indukovaných rýchlostiach respirácie pri každom odbere alebo v prípade potreby hodnota EC_{50} s 95 % hranicou spoľahlivosti, iné EC_x (t. j. EC_{25} alebo EC_{10}) s intervalmi spoľahlivosti a graf krivky reakcií na dávku,
- štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby,
- všetky informácie a pozorovania umožňujúce interpretáciu výsledkov.

4. ODKAZY

- (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) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-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.
- (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.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

-
- (11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A., and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77 – 81.
 - (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate induced respiration method.
 - (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
 - (14) Malkomes, H.-P. (1986). 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.

C.23. AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V PÔDE

1. METÓDA

Táto testovacia metóda zodpovedá OECD TG 307 (2002).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda je založená na existujúcich usmerneniach (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Metóda opísaná v tejto testovacej metóde je navrhnutá na hodnotenie aeróbnej a anaeróbnej transformácie chemikálií v pôde. Experimenty sa vykonávajú na stanovenie i) miery transformácie testovanej látky a ii) charakteru a miery tvorby a rozkladu produktov transformácie, ktorým rastliny a pôdne organizmy môžu byť vystavené. Takéto štúdie sa vyžadujú pre chemikálie, ktoré sa priamo aplikujú to pôdy alebo ktoré sa môžu dostať do pôdneho prostredia. Výsledky takýchto laboratórnych štúdií sa môžu použiť aj na vypracovanie protokolov pre odbery a analýzy pre príslušné štúdie v teréne.

Aeróbne a anaeróbne štúdie s jedným typom pôdy sú zvyčajne dostačujúce na hodnotenie ciest transformácie (8) (10) (11). Miery transformácie sa stanovujú aspoň v troch ďalších pôdach (8) (10).

Na workshope OECD o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v talianskom Belgirate v roku 1995 (10), sa dohodlo konkrétne množstvo a typ pôd používaných v tomto teste. Typy testovaných pôd by mali byť reprezentatívne pre environmentálne podmienky v mieste, kde dôjde k použitiu chemikálie alebo uvoľneniu. Napríklad chemikálie, ktoré sa môžu uvoľniť v subtropickom až tropickom podnebí, sa testujú s ferrasolmi alebo nitosolmi (FAO systém). Workshop vydal tiež odporúčania, založené na pokynoch ISO (15), týkajúce sa odberu, manipulácie a skladovania vzoriek pôdy. Používanie ryžových pôd sa v tejto metóde tiež posudzuje.

1.2. DEFINÍCIE

Testovaná látka: každá látka, či ide o východiskovú zlúčeninu alebo príslušné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré vzniknú z biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej látky, vrátane CO₂ a produktov, ktoré sú vo viazaných rezíduách.

Viazané rezíduá: „Viazané rezíduá“ sú zlúčeniny v pôde, rastlinách alebo zvieratách, ktoré pretrvávajú po extrakcii v matici vo forme východiskovej zlúčeniny alebo jej metabolitu(-ov)/produktov transformácie. Extrakčné metódy nemusia podstatne meniť samotné zlúčeniny alebo štruktúru matrice. Charakter väzby sa čiastočne dá objasniť extrakčnými metódami, ktorými sa mení matrica, a zložitými analytickými technikami. Doposiaľ sa týmto spôsobom identifikovali napríklad kovalentné iónové a sorpčné väzby, ako aj zadržiavanie. Vo všeobecnosti vznik viazaných rezíduí významne znižuje biologickú prístupnosť a dostupnosť (12) [upravené z IUPAC 1984 (13)].

Aeróbna transformácia: reakcie, ktoré sa vyskytujú v prítomnosti molekulárneho kyslíka (14).

Anaeróbna transformácia: reakcie, ktoré sa vyskytujú v neprítomnosti molekulárneho kyslíka (14).

Pôda: je zmes minerálnych a organických chemických zložiek, pričom organické chemické zložky obsahujú zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a s vysokými molekulovými hmotnosťami a s malými (prevažne mikro-) organizmami. Pôda sa môže spracovávať v dvoch stavoch:

- nenarušená, ako sa vytvorila v priebehu času, v charakteristických vrstvách s rozličnými typmi pôdy;
- narušená, ako sa zvyčajne nachádza v poľnohospodársky využívaných oblastiach alebo ako sa vyskytuje pri odbere vzoriek kopaním a použije v tejto testovacej metóde (14).

Mineralizácia: je úplná degradácia organickej zlúčeniny na CO₂ a H₂O v aeróbných podmienkach a na CH₄, CO₂ a H₂O v anaeróbných podmienkach. V súvislosti s touto testovacou metódou, ak sa používa zlúčenina označená¹⁴ C, mineralizácia znamená rozsiahlu degradáciu, počas ktorej sa označený atóm uhlíka oxiduje za uvoľnenia príslušného množstva¹⁴ CO₂ (14).

Polčas: $t_{0,5}$ je čas, za ktorý sa transformuje 50 % testovanej látky, ak sa transformácia dá opísať kinetikou prvého rádu; je nezávislý od koncentrácie.

DT₅₀ (Doba odbúrania 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %; odlišuje sa od polčasu $t_{0,5}$, ak transformácia nepostupuje podľa kinetiky prvého rádu.

DT₇₅ (Doba odbúrania 75): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 75 %.

DT₉₀ (Doba odbúrania 90): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 90 %.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa použijú na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie spektroskopickými a chromatografickými metódami.

1.4. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Metóda je použiteľná na všetky chemické látky (neoznačené alebo rádioaktívne označené), pre ktoré je k dispozícii analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na mierne prchavé, neprchavé, vo vode rozpustné alebo vo vode nerozpustné zlúčeniny. Test sa nepoužíva na chemikálie, ktoré sú veľmi prchavé z pôdy (napr. fumiganty, organické rozpúšťadlá), a teda sa pri experimentálnych podmienkach testu nemôžu uchovať v pôde.

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery transformácie sa môže použiť neoznačená alebo označená testovaná látka. Označený materiál sa vyžaduje pri skúmaní ciest transformácie a pri stanovení hmotnostnej bilancie. Odporúča sa označenie pomocou ^{14}C , ale môže použiť aj označenie inými izotopmi, ako napr. ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Značka sa umiestni pokiaľ možno v najstabilnejšej(-ích) časti(-iach) molekuly ⁽¹⁾. Čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred uskutočnením testu aeróbnej a anaeróbnej transformácie v pôde sú potrebné tieto informácie o testovanej látke:

- a) rozpustnosť vo vode (metóda A.6);
- b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;
- c) tlak pár (metóda A.4) a Henryho konštanta;
- d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda (metóda A.8);
- e) chemická stabilita v tme (hydrolyza) (metóda C.7);
- f) pK_a , ak molekula podlieha protonácii alebo deprotonácii [usmernenie OECD 112] (16).

Ďalšie užitočné informácie môžu zahŕňať údaje o toxicite testovanej látky pre pôdne mikroorganizmy [testovacie metódy C.21 a C.22] (16).

Je potrebné mať k dispozícii analytické metódy (vrátane extrakčných a purifikačných metód) na kvantifikáciu a identifikáciu testovanej látky a jej produktov transformácie.

⁽¹⁾ Napríklad, ak testovaná látka obsahuje jeden kruh, označenie tohto kruhu je potrebné; ak testovaná látka obsahuje dva alebo viac kruhov, môžu byť potrebné samostatné štúdie na hodnotenie osudu každého označeného kruhu a na získanie príslušných informácií o tvorbe produktov transformácie.

1.6. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Vzorky pôdy sa ošetrí testovanou látkou a inkubujú v tme v bankách biometrického typu alebo v prietokových systémoch za kontrolovaných laboratórnych podmienok (pri konštantnej teplote a vlhkosti pôdy). Po príslušných časových intervaloch sa vzorky pôdy extrahujú a analyzujú na východziu látku a na produkty transformácie. Prchavé produkty sa tiež zhromažďia na analýzu s použitím príslušných absorpčných zariadení. S použitím materiálu označeného ^{14}C sa môžu merať rôzne miery mineralizácie testovanej látky zachytením uvoľneného $^{14}\text{CO}_2$ a môže sa stanoviť hmotnostná bilancia, vrátane tvorby viazaných rezíduí v pôde.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY**1.7.1. Regenerácia**

Extrakcia a analýza minimálne dvoch paralelných vzoriek pôdy ihneď po pridaní testovanej látky poskytne prvý dôkaz reprodukovateľnosti analytickej metódy a rovnomerného rozdelenia testovanej látky pri aplikácii. Regenerácie v neskorších štádiách experimentov sú dané príslušnými hmotnostnými bilanciami. Regenerácie by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % pre označené chemikálie (8) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie (3).

1.7.2. Reprodukovateľnosť a citlivosť analytickej metódy

Reprodukovateľnosť analytickej metódy (okrem účinnosti extrakcie v počiatočnom štádiu) na kvantifikovanie testovanej látky a produktov transformácie sa môže overiť paralelnou analýzou rovnakého extraktu pôdy inkubovaného dostatočne dlho, aby vznikli produkty transformácie.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie má byť aspoň 0,01 mg/kg pôdy (ako testovaná látka) alebo 1 % aplikovanej dávky, podľa toho ktorá hodnota je nižšia. Je potrebné stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

1.7.3. Presnosť údajov o transformácii

Regresná analýza koncentrácií testovanej látky v závislosti od času poskytuje príslušné informácie o spoľahlivosti transformačnej krivky a umožňuje výpočet hraníc spoľahlivosti pre polčasy (v prípade kinetiky pseudo prvého rádu) alebo hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} .

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY**1.8.1. Prístroje a chemické reagenty**

Inkubačné systémy pozostávajú zo statických uzatvorených systémov alebo vhodných prietokových systémov (7) (17). Príklady vhodného prietokového prístroja na inkubáciu pôdy biometrického typu sú znázornené na obrázkoch 1 a 2. Obe dva typy inkubačných systémov majú výhody a obmedzenia (7) (17).

Sú potrebné štandardné laboratórne prístroje, a osobitne tieto:

- analytické prístroje, ako napr. GLC-, HPLC-, TLC-zariadenie, vrátane vhodných detekčných systémov na analýzu rádioaktívne označených alebo neoznačených látok alebo inverzná izotopová zriedňovacia metóda,
- identifikačné prístroje (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.),
- kvapalný scintilačný počítač,
- oxidačné činidlo na spaľovanie rádioaktívneho materiálu,
- odstredivka,
- extrakčný prístroj (napríklad centrifugačné kyvety na extrakciu za studena a Soxhletov extraktor na kontinuálnu refluxnú extrakciu),
- prístroje na zvýšenie koncentrácie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka);

- vodný kúpeľ,
- mechanická miešačka (napr. stroj na miesenie, rotačný mixér).

Použité chemické reagenty zahŕňajú napríklad:

- NaOH, analytická kvalita, 2 mol/dm³ alebo iná vhodná zásada (napr. KOH, etanolamín),
- H₂SO₄, analytická kvalita, 0,05 mol/dm³,
- etylénglykol, analytická kvalita,
- tuhé absorpčné materiály, napr. nátrónové vápno a polyuretánové zátky,
- organické rozpúšťadlá, analytická kvalita, napr. acetón, metanol atď.,
- scintilačná kvapalina.

1.8.2. Aplikácia testovanej látky

Aby sa testovaná mohla pridať do pôdy a distribuovať v nej, môže sa rozpustiť vo vode (deionizovanej alebo destilovanej) alebo v prípade potreby v minimálnych množstvách acetónu alebo iných organických rozpúšťadlách (6), v ktorých je testovaná látka dostatočne rozpustná a stabilná. Množstvo zvoleného rozpúšťadla by nemalo mať významný vplyv na mikrobiálnu aktivitu pôdy (pozri oddiely 1.5 a 1.9.2 – 1.9.3). Je potrebné zabrániť, aby sa používali rozpúšťadlá inhibujúce mikrobiálnu aktivitu, ako je chloroform, dichlórmetán a iné halogenované rozpúšťadlá.

Testovaná látka sa môže tiež pridať ako tuhá látka, napr. zmiešaná v kremennom piesku (6) alebo v malých čiastočných vzorkách pôdy, ktoré sa vysušia na vzduchu a sterilizujú. Ak sa testovaná látka pridá s použitím rozpúšťadla, rozpúšťadlo by sa malo odpariť predtým, ako sa čiastočná vzorka s pridanou látkou pridá k pôvodnej nesterilnej vzorke pôdy.

V prípade bežných chemikálií, ktoré sa dostávajú do pôdy najmä prostredníctvom splaškového kalu/aplikácie v poľnohospodárstve, sa testovaná látka najskôr pridá do kalu, ktoré sa potom aplikuje do vzorky pôdy. (pozri oddiely 1.9.2 a 1.9.3)

Použitie zložených produktov sa zvyčajne neodporúča. Použitie zloženého materiálu však môže byť vhodnou alternatívou, napríklad v prípade ťažko rozpustných testovaných látok.

1.8.3. Pôdy

1.8.3.1. Výber pôdy

Na stanovenie transformačnej cesty sa môže použiť reprezentatívna pôda; piesočnatá hlina alebo prachovitá (bahenná) hlina, alebo hlina alebo hlinitý piesok [podľa FAO a USDA klasifikácie (18)] s pH 5,5 – 8,0, s obsahom organického uhlíka 0,5 % – 2,5 % a mikrobiálnou biomasou s obsahom aspoň 1 % celkového organického uhlíka (10).

Pre štúdie miery transformácie sa použijú aspoň tri ďalšie pôdy predstavujúce rozsah relevantných pôd. Pôdy sa odlišujú v obsahu organického uhlíka, pH, obsahu ílu a mikrobiálnej biomasy (10).

Všetky pôdy by mali byť charakterizované aspoň týmito vlastnosťami textúry (% piesok, % bahno, % íl) [klasifikácia podľa FAO a USDA (18)], pH, kationová výmenná kapacita, organický uhlík, objemová hmotnosť, charakteristika retencie vody⁽¹⁾ a mikrobiálna biomasa (iba pre aeróbne štúdie). Ďalšie informácie o vlastnostiach pôdy môžu byť užitočné pri interpretácii výsledkov. Na stanovenie charakteristík pôdy sa môžu použiť odporúčané metódy v odkazoch (19) (20) (21) (22) (23). Mikrobiálna biomasa sa stanoví s použitím metódy substrátom indukovanej respirácie (SIR) (25) (26) alebo alternatívnymi metódami (20).

⁽¹⁾ Charakteristiku retencie vody v pôde je možné merať ako kapacitu poľa, ako kapacitu zadržiavania vody alebo ako sací tlak vody (pF). Na vysvetlenie pozri dodatok 1. V správe z testu je potrebné uviesť, či charakteristiky retencie vody a objemová hmotnosť pôd boli stanovené v nenarušených vzorkách z terénu alebo narušených (spracovaných) vzorkách.

1.8.3.2. Odber, manipulácia a skladovanie pôd

Potrebné sú podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odoberala. Uvádza sa presná poloha, porast, ošetrovania chemikáliami, ošetrovania organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo iné kontaminácie. Na štúdie transformácie sa nepoužívajú pôdy, ktoré boli ošetrované testovanou látkou alebo jej štrukturálnymi analógmi v priebehu ostatných štyroch rokov (10) (15).

Pôda má byť čerstvo odobratá z terénu (z horizontu A alebo vrchnej 20 cm vrstvy) s obsahom vody v pôde, ktorý umožní preosiatie. V prípade iných pôd ako ryžové polia sa vzorky neodoberajú počas alebo bezprostredne po dlhých obdobiach (> 30 dní) sucha, mrazu alebo záplav (14). Vzorky sa dopravujú tak, aby sa minimalizovali zmeny v obsahu vody v pôde a uchovávali sa v tme za čo najväčšieho prístupu vzduchu. Na tento účel zvyčajne postačí voľne zaviazané polyetylénové vrecúško.

Pôda by sa mala spracovať čo najskôr po odbere vzoriek. Porast, väčšie kusy pôdných živočíchov a kamene sa odstránia pred preosiatím cez 2 mm sito, ktorým sa odstránia malé kamienky, živočíchy a zvyšky rastlín. Je potrebné zabrániť nadmernému vysušeniu a rozdrveniu pôdy pred preosiatím (15).

Ak je ťažké odobrať vzorky v zime v teréne (zamrznutá pôda alebo pokrytá vrstvami snehu), môže sa odobrať zo šarže pôdy, uchovávanej v skleníku pod porastom (napr. tráva alebo zmes trávy a ďateliny). V každom prípade sa uprednostňujú štúdie s čerstvo odobratou pôdou z terénu, ale ak sa odobratá a spracovaná pôda musela skladovať pred začiatkom štúdie, musia sa dodržať vhodné skladovacie podmienky a iba na obmedzený čas ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ maximálne tri mesiace), aby sa zachovala mikrobiálna aktivita⁽¹⁾. Podrobné pokyny na odber, manipuláciu a skladovanie pôd, ktoré sa použijú na biotransformačné pokusy sa nachádzajú v odkazoch (8) (10) (15) (26) (27).

Predtým, ako sa spracovaná pôda použije v tomto teste, mala by sa podrobiť preinkubácii na umožnenie klíčenia a odstránenia semien a na opätovné nastolenie rovnováhy mikrobiálneho metabolizmu po následnej zmene podmienok odberu alebo skladovania na podmienky inkubácie. Vo všeobecnosti je vhodná doba preinkubácie medzi 2 a 28 dňami za teplotných podmienok a vlhkosti približujúcej sa skutočnému testu (15). Čas skladovania a preinkubácie spolu nesmie trvať dlhšie ako tri mesiace.

1.9. VYKONANIE TESTU

1.9.1. Testovacie podmienky

1.9.1.1. Teplota pri teste

Počas celého obdobia testovania by sa pôdy mali inkubovať v tme pri konštantnej teplote, predstavujúcej klimatické podmienky, kde sa vyskytne použitie alebo uvoľnenie. Pre všetky testované látky, ktoré sa môžu dostať do pôdy v miernom podnebí, sa odporúča teplota $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplota by sa mala sledovať.

V prípade chemikálií, aplikovaných alebo uvoľnených v chladnejšom podnebí (napr. v severných krajinách počas obdobia jesene/zimy), sa inkubujú ďalšie vzorky pôdy, ale pri nižšej teplote (napr. $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

1.9.1.2. Obsah vlhkosti

V prípade testov transformácie v aeróbných podmienkach sa obsah pôdnej vlhkosti⁽²⁾ nastaví a zachová na pF medzi 2,0 a 2,5 (3). Obsah pôdnej vlhkosti sa vyjadruje ako hmotnosť vody na hmotnosť suchej pôdy a pravidelne sa kontroluje (napr. v 2-týždňových intervaloch) vážením v inkubačných bankách a straty vody sa doplnia pridaním vody (pokiaľ možno sterilnej filtrovanej vody z vodovodu). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa predchádzalo a minimalizovali straty testovanej látky a/alebo produktov transformácie vyparovaním a/alebo fotodegradáciou (ak sa vyskytuje) počas pridávania vlhkosti.

Pri testoch transformácie v anaeróbných podmienkach a podmienkach ryžových polí sa pôda saturuje zaplavením.

⁽¹⁾ Z výsledkov posledného výskumu vyplýva, že vzorky z miernych oblastí sa tiež môžu skladovať pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ viac ako tri mesiace (28) (29) bez významných strát mikrobiálnej aktivity.

⁽²⁾ Pôda nemá byť ani príliš mokrá, ani príliš suchá, aby sa zachovalo primerané prevzdušenie a výživa pôdnej mikroflóry. Odporúčané vlhkosti pôdy pre optimálny mikrobiálny rast sú v rozsahu 40 % – 60 % kapacity zadržiavania vody (WHC) a od 0,1 bar – 0,33 bar (6). Posledný uvedený rozsah zodpovedá rozsahu pF 2,0 – 2,5. Typické obsahy vlhkosti rôznych typov pôdy sú uvedené v dodatku 2.

1.9.1.3. *Aeróbne inkubačné podmienky*

V prietokových systémoch sa aeróbne podmienky zabezpečujú nekontinuálnym premývaním alebo kontinuálnou ventiláciou zvlhčeným vzduchom. V bankách biometrického typu sa vzduch zabezpečuje difúziou.

1.9.1.4. *Sterilné aeróbne podmienky*

Aby sa získali informácie o dôležitosti abiotickej transformácie testovanej látky vzorky, vzorky pôdy sa môžu sterilizovať [sterilizačné metódy pozri v odkazoch (16) a (29)], ošetriť sterilnou testovanou látkou (napr. pridaním roztoku cez sterilný filter) a prevzdušniť zvlhčeným sterilným vzduchom, ako je uvedené v oddiele 1.9.1.3. V prípade ryžových pôd sa pôda a voda sterilizujú a inkubácia sa uskutoční, ako je uvedené v oddiele 1.9.1.6.

1.9.1.5. *Anaeróbne inkubačné podmienky*

Na zistenie a zachovanie anaeróbných podmienok sa pôda, ošetrená testovanou látkou a inkubovaná za aeróbných podmienok 30 dní alebo jeden polčas, alebo DT⁵⁰ (podľa toho, ktoré je kratšie), potom zaleje vodou (1 cm – 3 cm vrstva vody) a do inkubačného systému sa vženie inertný plyn (napr. dusík alebo argón) ⁽¹⁾. Testovací systém musí umožňovať merania, ako napr. pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál, a zapojenie zariadenia na zachytávanie prchavých produktov. Systém biometrického typu musí byť uzatvorený, aby nevnikol vzduch difúziou.

1.9.1.6. *Inkubačné podmienky ryžových polí*

Na štúdiu transformácie v ryžových pôdach sa pôda zaplaví 1 cm – 5 cm vrstvou vody a testovaná látka sa aplikuje do vodnej fázy (9). Odporúča sa hĺbka pôdy aspoň 5 cm. Systém sa prevzdušňuje vzduchom ako za aeróbných podmienok. Sleduje sa a zaznamená pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál vodnej vrstvy. Pred začatím transformačných štúdií je potrebná doba preinkubácie aspoň dva týždne (pozri oddiel 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Trvanie testu*

Štúdie miery a cesty by nemali byť zvyčajne dlhšie ako 120 dní ⁽²⁾ [(3) (6) (8)], pretože potom sa dá očakávať pokles pôdnej mikrobiálnej aktivity s časom v neprirodzenom laboratórnom systéme izolovanom od prírodných revitalizačných procesov. Ak je potrebné charakterizovať rozklad testovanej látky a tvorbu a rozklad hlavných produktov transformácie, štúdie môžu pokračovať dlhšie obdobia (napr. 6 alebo 12 mesiacov) (8). Dlhšie inkubačné doby sa zdôvodnia v správach z testov a doložia sa k nim údaje z meraní biomasy počas týchto dôb a na ich konci.

1.9.2. **Vykonanie testu**

Približne 50 g až 200 g pôdy (vzťahuje sa na suchú hmotnosť) sa umiestni do každej inkubačnej banky (pozri obrázky 1 a 2 v dodatku 3) a pôda sa ošetrí testovanou látkou podľa jednej z metód uvedených v oddiele 1.8.2. Ak sa na aplikáciu testovanej látky používajú organické rozpúšťadlá, odstránia sa z pôdy odparením. Potom sa pôda dôkladne premieša tyčinkou a/alebo pretrepaním banky. Ak sa štúdia uskutočňuje v podmienkach ryžových polí, po aplikácii testovanej látky sa pôda a voda dôkladne premiešajú. Malé alikvótne časti (napr. 1 g) ošetrovaných pôd sa analyzujú na testovanú látku, aby sa overilo rovnomerné rozdelenie. Alternatívna metóda je uvedená ďalej.

Miera ošetrovania by mala zodpovedať najvyššej aplikačnej dávke výrobku na ochranu rastlín, odporúčanej v návode na použitie, a rovnomernému zabudovaniu v zodpovedajúcej hĺbke v teréne [napr. vrchná 10 cm vrstva ⁽³⁾ pôdy]. Napríklad pre chemikálie, ktoré sa aplikujú na listy alebo na pôdu bez zabudovania, zodpovedajúca hĺbka pre výpočet, koľko chemikálie sa má pridať do každej banky, je 2,5 cm. Pre chemikálie, ktoré sa zabudujú do pôdy, je zodpovedajúca hĺbka presne uvedená v návode na použitie. Pre bežné chemikálie by sa aplikačná dávka mala odhadnúť na základe najvýznamnejšej cesty prieniku; napríklad, ak je hlavná cesta

⁽¹⁾ Aeróbne podmienky prevládajú v povrchových pôdach a dokonca v podpovrchových pôdach, ako je uvedené vo výskumnom projekte, ktorý sponzoruje EÚ [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270 – 277, 17 – 21. August 1992, Sigtuna, Sweden]. Anaeróbne podmienky sa môžu vyskytnúť iba príležitostne počas zaplavenia pôd po dlhotrvajúcich dažďoch alebo v podmienkach ryžových polí na poliach s ryžou.

⁽²⁾ Aeróbne štúdie by sa mohli ukončiť pred uplynutím 120 dní za predpokladu, že sa zreteľne dosiahne konečná cesta transformácie a konečná mineralizácia v tom čase. Ukončenie testu je možné po 120 dňoch, alebo keď sa aspoň 90 % testovanej látky transformuje, ale iba ak sa vytvorí aspoň 5 % CO₂.

⁽³⁾ Výpočet počiatočnej koncentrácie v mieste s použitím tejto rovnice:

$$C_{\text{soil}} [\text{mg/kg}_{\text{soil}}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{soil}}/\text{m}^3]}$$

C_{soil} = počiatočná koncentrácia v pôde [mg/kg]

A = aplikačná dávka [kg/ha]; l = hrúbka pôdnej vrstvy poľa [m]; d = suchá objemová hmotnosť [kg/m³].

Správila aplikačná dávka 1 kg/ha vytvára koncentráciu 1 mg/kg v 10 cm vrstve (pri objemovej hmotnosti 1 g/cm³).

prieniku do pôdy cez splaškový kal, chemikálie sa dávkuje do kalu pri koncentrácii, ktorá zodpovedá očakávanej koncentrácii kalu, a množstvo kalu pridaného do pôdy by malo zodpovedať bežnej aplikácii kalu, používanej na poľnohospodárske pôdy. Ak táto koncentrácia nie je na identifikáciu hlavných produktov transformácie dostatočne vysoká, môže byť užitočná inkubácia samostatných vzoriek pôdy s vyššou mierou ošetrovania, ale je potrebné zamedziť prívelkej miere ošetrovania ovplyvňujúcej mikrobiálne funkcie pôdy (pozri oddiely 1.5 a 1.8.2).

Alternatívne sa môže väčšia dávka (t. j. 1 kg až 2 kg) pôdy ošetriť testovanou látkou, dôkladne premiešať vo vhodnom miešacom zariadení a potom preniesť v malých dávkach 50 g až 200 g do inkubačných baniek (napríklad s použitím dávkovačov vzoriek). Malé alikvótne časti (napr. 1 g) ošetrenej pôdy sa analyzujú na testovanú látku, aby sa overilo rovnomerné rozdelenie. Uprednostňuje sa takýto postup, pretože umožňuje rovnomernejšie rozdelenie testovanej látky do pôdy.

Aj neošetrené vzorky pôdy sa inkubujú za rovnakých podmienok (aeróbne) ako vzorky ošetrenej testovanou látkou. Tieto vzorky sa používajú na merania biomasy v priebehu štúdií a na ich konci.

Ak sa testovaná látka aplikuje do pôdy rozpustená v organickom(-ých) rozpúšťadle(-ách), vzorky pôdy ošetrenej rovnakým množstvom rozpúšťadla(-iel) sa inkubujú za rovnakých podmienok (aeróbne) ako vzorky ošetrenej testovanou látkou. Tieto vzorky sa používajú na stanovenia biomasy na začiatku štúdií, počas nich a na ich konci, na overenie účinkov rozpúšťadla(-iel) na mikrobiálnu biomasu.

Banky obsahujúce ošetrenú pôdu sa buď pripoja na prietokový systém opísaný na obrázku 1, alebo uzavrú absorpčnou kolónou znázornenou na obrázku 2 (pozri dodatok 3).

1.9.3. Odber vzoriek a meranie

V príslušných časových intervaloch sa odoberú paralelné inkubačné banky a vzorky pôdy sa extrahujú s príslušnými rozpúšťadlami rôznej polarizácie a analyzujú na testovanú látku a/alebo produkty transformácie. Vhodne zostavená štúdia zahŕňa dostatočný počet baniek tak, aby sa mohli odobrať dve banky pri každom odbere. Odoberajú sa aj absorpčné roztoky alebo tuhé absorpčné materiály v rôznych časových intervaloch (7-dňové intervaly v priebehu prvého mesiaca a po jednom mesiaci 17-dňové intervaly) počas inkubácie každej vzorky pôdy a na jej konci a analyzujú sa na prchavé produkty. Okrem vzorky pôdy odobratej priamo po aplikácii (vzorka z nultého dňa) je potrebné naplánovať aspoň 5 ďalších termínov odberu. Časové intervaly sa zvolia tak, aby sa dala stanoviť schéma rozkladu testovanej látky a schéma tvorby a rozkladu produktov transformácie (napr. 0, 1, 3, 7 dní; 2, 3 týždne; 1, 2, 3 mesiacov atď.).

Ak sa použije testovaná látka, označená ^{14}C , neextrahovateľná rádioaktivita sa kvantifikuje spaľovaním a vypočíta sa hmotnostná bilancia pre každý interval odberu.

V prípade anaeróbnej inkubácie a inkubácie v podmienkach ryžových pólí sa pôdna a vodná fáza analyzujú spolu pre testovanú látku a produkty transformácie alebo sa pred extrakciou a analýzou oddelia pomocou filtrácie alebo centrifugácie.

1.9.4. Nepovinné testy

Aeróbne, nesterilné štúdie pri ďalších teplotách a vlhkostiach pôdy môžu byť užitočné na posúdenie vplyvu teploty a vlhkosti pôdy na mieru transformácie testovanej látky a/alebo jej produktov transformácie v pôde.

Ďalšiu charakterizáciu neextrahovateľnej rádioaktivity možno skúsiť napríklad superkritickou fluidnou extrakciou.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Množstvá testovanej látky, produktov transformácie, prchavých látok (iba v percentách) a neextrahovateľných látok sa vyjadria v percentách aplikovanej počiatočnej koncentrácie a v prípade potreby ako mg/kg pôdy (vo vzťahu k suchej hmotnosti pôdy) pre každý interval odberu. Hmotnostná bilancia sa uvedie v percentách aplikovanej počiatočnej koncentrácie pre každý interval odberu. Grafické znázornenie koncentrácií testovanej látky v závislosti od času umožní stanovenie jej polčasu transformácie alebo DT_{50} . Mali by sa identifikovať

hlavné produkty transformácie a ich koncentrácie by sa tiež mali vyniesť v závislosti od času na znázornenie ich miery tvorby a rozkladu. Hlavný produkt transformácie je každý produkt, ktorý predstavuje $\geq 10\%$ aplikovanej dávky kedykoľvek počas štúdie.

Zachytené prchavé látky poskytujú dôkazy o možnej prchavosti testovanej látky a jej produktov transformácie z pôdy.

Presnejšie stanovenia polčasov alebo hodnôt DT_{50} , prípadne hodnôt DT_{75} a DT_{90} , by sa mali získať s použitím výpočtov príslušného kinetického modelu. Polčas a hodnoty DT_{50} by sa mali zaznamenať spolu s opisom použitého modelu, kinetického rádu a determináčného koeficientu (r^2). Kinetika prvého rádu sa uprednostňuje, pokiaľ $r^2 < 0,7$. V prípade potreby by sa výpočty mali použiť aj na hlavné produkty transformácie. Príklady príslušných modelov sú uvedené v odkazoch (31) až (35).

Ak sa štúdie miery transformácie vykonávajú pri rôznych teplotách, miera transformácie sa uvedie ako funkcia teploty v rámci experimentálneho rozsahu teploty s použitím Arrheniovoho vzťahu vo forme:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ alebo } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

kde $\ln A$ je regresná konštanta zo zadržania a $\ln B$ je regresná konštanta nábehu, prípadne najlepšieho smeru uvoľneného z lineárnej regresie $\ln k$ proti $1/T$, k je množstvová konštanta pri teplote T a T je teplota v kelvinoch. Je potrebné venovať pozornosť obmedzenému rozsahu teplôt, v ktorom platí Arrheniov vzťah v prípade, ak sa transformácia riadi mikrobiálnou aktivitou.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Aj keď sa štúdie uskutočňujú v neprirodzenom laboratórnom systéme, výsledky umožnia posúdiť mieru transformácie testovanej látky a tiež mieru tvorby a rozkladu produktov transformácie v podmienkach v teréne (36) (37).

Štúdia cesty transformácie testovanej látky poskytuje informácie o spôsobe, akým sa aplikovaná látka v pôde štrukturálne mení chemickými a mikrobiálnymi reakciami.

3. PODÁVANIE SPRÁV

SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať:

Testovaná látka:

- všeobecný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec [uvádzajúci pozíciu označenia(-í), ak sa použije rádioaktívne označený materiál] a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri oddiel 1.5),
- čistota (nečistoty) testovanej látky,
- rádiochemická čistota označenej chemikálie a špecifická aktivita (v prípade potreby).

Referenčné látky:

- chemický názov a štruktúra referenčných látok použitých na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktu transformácie.

Testované pôdy:

- údaje o mieste odberu,

- dátum a postup odberu vzoriek pôdy,
- vlastnosti pôd, ako napr. pH, obsah organického uhlíka, textúra (koľko percent piesku, koľko percent bahna, koľko percent ílu), kationová výmenná kapacita, objemová hmotnosť, charakteristika retencie vody a mikrobiálna biomasa,
- dĺžka skladovania pôdy a podmienky skladovania (ak sa skladuje).

Testovacie podmienky:

- dátumy uskutočnenia štúdií,
- množstvo použitej testovanej látky,
- použité rozpúšťadlá a metóda aplikácie pre testovanú látku,
- hmotnosť ošetrenej pôdy na začiatku testu a v každom intervale odberu na analýzu,
- opis použitého inkubačného systému,
- miera prietoku vzduchu (iba pre prietokové systémy),
- teplota experimentálnej zostavy,
- obsah pôdnej vlhkosti počas inkubácie,
- mikrobiálna biomasa na začiatku, v priebehu a na konci aeróbných štúdií,
- pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál na začiatku, v priebehu a na konci anaeróbných a štúdií v podmienkach ryžových polí,
- extrakčná(-é) metóda(-y),
- metódy kvantifikácie a identifikácie testovanej látky a hlavné produkty transformácie v pôde a absorpčné materiály,
- počet paralelných vzoriek a počet kontrol.

Výsledky:

- výsledok stanovenia mikrobiálnej aktivity,
- opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,
- miera regenerácie percentuálne hodnoty pre platnú štúdiu sú uvedené v oddiele 1.7.1),
- tabuľky s výsledkami vyjadrenými v percentách aplikovanej počiatočnej dávky a v prípade potreby ako mg/kg pôdy (vzťahuje sa na suchú hmotnosť),
- hmotnostná bilancia v priebehu štúdií a na ich konci,
- charakterizácia neextrahovateľnej (viazanej) rádioaktivity alebo rezíduí v pôde,
- kvantifikácia uvoľneného CO₂ a iných prchavých látok,

- grafické znázornenie pôdnych koncentrácií proti času pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie,
- polčas alebo DT_{50} , DT_{75} a DT_{90} pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie, vrátane hraníc spoľahlivosti,
- posúdenie miery abiotickej degradácie v sterilných podmienkach,
- vyhodnotenie kinetiky transformácie pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie,
- v prípade potreby údaje o cestách transformácie,
- diskusia a interpretácia výsledkov,
- nespracované údaje (t. j. chromatogramy vzoriek, vzorové výpočty miery transformácie a prostriedky použité na identifikáciu produktov transformácie).

4. ODKAZY

- (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) Európska únia (EÚ) (1995). Smernica Komisie 95/36/ES zo 14. júla 1995, ktorou sa mení a dopĺňa smernica Rady 91/414/EHS o umiestnení prípravkov na ochranu rastlín na trh. Príloha II časť A a príloha III časť A: Osud a správanie sa účinnej látky v životnom prostredí.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil–Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18 – 20 January 1995.
- (11) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123 – 157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

- (13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. *Pure Appl. Chem.* 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) Príloha V k smernici 67/548/EHS.
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85 – 114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
- (19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., 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.
- (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 biotransformation 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., Sjö Dahl-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.

-
- (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 D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032 – 1041.
- (37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83 – 122.

DODATOK 1

TLAK VODY, KAPACITA POĽA (KP) A KAPACITA ZADRŽIAVANIA VODY (KZV) ⁽¹⁾

Výška vodného stĺpca [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Poznámky
10 ⁷	7	10 ⁴	suchá pôda
1,6 × 10 ⁴	4,2	16	bod vädnutia
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 × 10 ²	2,8	0,6	
3,3 × 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	
10 ²	2	0,1	rozsah
60	1,8	0,06	kapacity poľa ^(d)
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	KVZ (aproximácia)
1	0	0,001	vodou nasýtená pôda

^(a) pF = logaritmus cm vodného stĺpca.

^(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

^(c) Zodpovedá približnému obsahu vody 10 % v piesku, 35 % v hline a 45 % v íle.

^(d) Kapacita poľa nie je konštantná, ale mení sa s typom pôdy medzi pF 1,5 a 2,5.

Tlak vody sa meria v cm vodného stĺpca alebo v baroch. Kvôli veľkému rozsahu sacieho tlaku sa vyjadruje jednoducho ako hodnota pF, ktorá je zodpovedá logaritmu cm vodného stĺpca.

Kapacita poľa sa definuje ako množstvo vody, ktoré sa môže v prírodnej pôde zachovať proti gravitácii 2 dni po dlhšom období dažďov alebo po dostatočnom zavlažovaní. Stanovuje sa v nenarušenej pôde *in situ* v teréne. Meranie sa teda nepoužíva na narušené laboratórne vzorky pôdy. Stanovené hodnoty KP v narušených pôdach môžu vykazovať veľké systematické odchýlky.

Kapacita zadržiavania vody (KZV) sa stanovuje v laboratóriu s nenarušenou a narušenou pôdou nasýtením stĺpca pôdy vodou prostredníctvom kapilárnej vzĺnavosti. Je to osobitne dôležité pre narušené pôdy a môže byť až o 30 % väčšia ako kapacita poľa (1). Je tiež jednoduchšie experimentálne stanoviť spoľahlivé hodnoty KP.

Poznámky

⁽¹⁾ Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

DODATOK 2

OBSAH PÔDNEJ VLHKOSTI (g vody na 100 g suchej pôdy) RÔZNYCH TYPOV PÔDY Z RÔZNYCH KRAJÍN

Typ pôdy	Krajina	Pôdna vlhkosť pri		
		KZV ⁽¹⁾	pF = 1,8	pF = 2,5
Piesok	Nemecko	28,7	8,8	3,9
Hlinitý piesok	Nemecko	50,4	17,9	12,1
Hlinitý piesok	Švajčiarsko	44,0	35,3	9,2
Prachovitá hlina	Švajčiarsko	72,8	56,6	28,4
Ílovitá hlina	Brazília	69,7	38,4	27,3
Ílovitá hlina	Japonsko	74,4	57,8	31,4
Piesčitá hlina	Japonsko	82,4	59,2	36,0
Prachovitá hlina	USA	47,2	33,2	18,8
Piesčitá hlina	USA	40,4	25,2	13,3

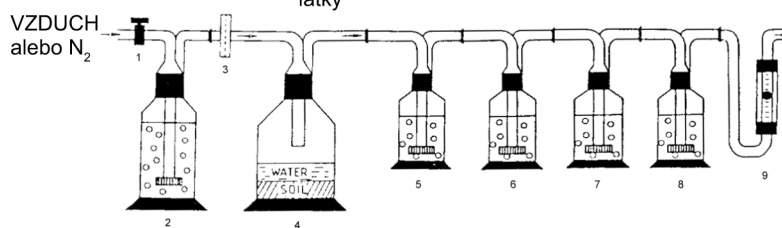
⁽¹⁾ Kapacita zadržiavania vody.

DODATOK 3

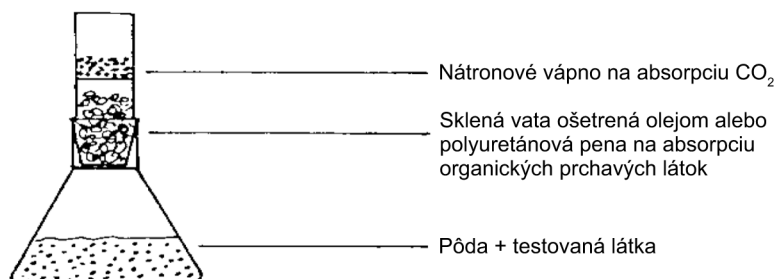
Obrázok 1

Príklad prietokového prístroja na štúdium transformácie chemikálií v pôde ⁽¹⁾ ⁽²⁾

1: ihlový ventil	4: banka pôdneho metabolizmu (zaliata vodou iba v prípade anaeróbných podmienok a podmienok ryžových poli)	6: lapač kyselinou sírovou na alkalické prchavé látky
2: plynová premývacia fľaša obsahujúca vodu		7, 8: lapač hydroxidom sodným na CO ₂ a iné kyslé prchavé látky
3: ultramembrána (iba sterilné podmienky), veľkosť pórov 0,2 μm	5: lapač etylén-glykolom na organické prchavé látky	9: prietokomer



Obrázok 2

Príklad banky biometrického typu na štúdium transformácie chemikálií v pôde ⁽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.

C.24. AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V SYSTÉMOCH VODA/SEDIMENT

1. METÓDA

Táto testovacia metóda zodpovedá OECD TG 308 (2002).

1.1. ÚVOD

Chemikálie sa môžu dostať do plytkých alebo hlbokých povrchových vôd takými cestami, ako je priama aplikácia, postrek, odtok, odvodnenie, zneškodňovanie odpadov, priemyselné, domáce alebo poľnohospodárske odpadové vody a atmosférické usadzovanie. Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu na hodnotenie aeróbnej a anaeróbnej transformácie organických chemikálií v systémoch voda/sediment. Táto testovacia metóda je založená na existujúcich usmerneniach (1) (2) (3) (4) (5) (6). Na OECD workshope o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v talianskom Belgirate v roku 1995 (7) sa konkrétne dohodlo množstvo a typ sedimentov používaných v tomto teste. Tiež sa vydali odporúčania týkajúce sa odberu, manipulácie a skladovania vzoriek sedimentov, ktoré sa zakladajú na pokynoch ISO (8). Takéto štúdie sa vyžadujú pre chemikálie, ktoré sa priamo aplikujú do vody alebo ktoré sa môžu dostať do vodného prostredia vyššie uvedenými cestami.

Podmienky v prírodných systémoch voda/sediment sú často aeróbne vo vrchnej vodnej fáze. Povrchová vrstva sedimentu môže byť buď aeróbna, alebo anaeróbna, zatiaľ čo hlbšie vrstvy sedimentu sú zvyčajne anaeróbne. Aby sa zahrnuli obe tieto možnosti, v tomto dokumente sa opisujú aeróbne aj anaeróbne testy. Aeróbny test simuluje aeróbny vodný stĺpec nad aeróbnou vrstvou sedimentu, ktorá je podvrstvená anaeróbnym gradientom. Anaeróbny test simuluje úplný anaeróbny systém voda-sediment. Ak z okolností vyplýva, že je potrebné značne sa odkloniť od týchto odporúčaní, napríklad použiť intaktné jadrá sedimentov alebo sedimenty, ktoré môžu byť vystavené pôsobeniu testovanej látky, sú na tento účel dostupné iné metódy (9).

1.2. DEFINÍCIE

V každom prípade sa použijú medzinárodné jednotky (SI).

Testovaná látka: každá látka, či východisková, alebo príslušné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré vzniknú z biotických a abiotických transformačných reakcií testovanej látky, vrátane CO₂ a viazaných rezíduí.

Viazané rezíduá: „Viazané rezíduá“ sú zlúčeniny v pôde, rastlinách alebo zvieratách, ktoré pretrvávajú po extrakcii v matrici vo forme východnej zlúčeniny alebo jej metabolitu(-ov). Extrakčná metóda nemusí podstatne meniť samotné zlúčeniny alebo štruktúru matrice. Charakter väzby sa čiastočne dá objasniť extrakčnými metódami, ktorými sa mení matrica, a zložitými analytickými technikami. Doposiaľ sa identifikovali týmto spôsobom napríklad kovalentné iónové a sorpčné väzby, ako aj zadržiavanie. Vo všeobecnosti vznik viazaných rezíduí významne znižuje biologickú prístupnosť a biologickú dostupnosť (10) [upravené z IUPAC 1984 (11)].

Aeróbna transformácia: (oxidačná): reakcie, ktoré sa vyskytujú v prítomnosti molekulárneho kyslíka (12).

Anaeróbna transformácia: (redukčná): reakcie, ktoré sa vyskytujú za neprítomnosti molekulárneho kyslíka (12).

Prírodné vody: sú povrchové vody získané z nádrží, riek, potokov atď.

Sediment: je zmes minerálnych a organických chemických zložiek, pričom organické chemické zložky obsahujú zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a s vysokými molekulovými hmotnosťami. Ukladá sa prírodnou vodou a tvorí rozhranie s vodou.

Mineralizácia: je kompletná degradácia organickej zlúčeniny na CO₂, H₂O v aeróbných podmienkach a na CH₄, CO₂ a H₂O v anaeróbných podmienkach. V súvislosti s touto testovacou metódou, ak sa používa rádioaktívne označená zlúčenina, mineralizácia znamená rozsiahlu degradáciu molekuly, počas ktorej sa označený atóm uhlíka kvantitatívne oxiduje alebo redukuje za uvoľnenia príslušného množstva ¹⁴CO₂ alebo ¹⁴CH₄.

Polčas, $t_{0.5}$, je čas, za ktorý sa transformuje 50 % testovanej látky, ak sa transformácia dá opísať kinetikou prvého rádu; je nezávislý od koncentrácie.

DT₅₀ (Doba odbúrania 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %.

DT₇₅ (Doba odbúrania 75): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 75 %.

DT₉₀ (Doba odbúrania 90): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 90 %.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky by sa mali používať na identifikáciu a kvantifikáciu produktov transformácie spektroskopickými a chromatografickými metódami.

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery transformácie sa môže použiť neoznačená alebo izotopom označená testovaná látka, aj keď sa uprednostňuje označený materiál. Označený materiál sa vyžaduje pri skúmaní ciest transformácie a pri stanovení hmotnostnej bilancie. Odporúča sa označenie pomocou ^{14}C , ale môže použiť aj označenie inými izotopmi, ako napr. ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Značka sa umiestni pokiaľ možno v najstabilnejšej(-ích) časti(-iach) molekuly ⁽¹⁾. Chemická a/alebo rádiochemická čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred uskutočnením testuje potrebné, aby boli k dispozícii tieto informácie:

- a) rozpustnosť vo vode (metóda A. 6);
- b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;
- c) tlak pár (metóda A.4) a Henryho konštanta;
- d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda (metóda A. 8);
- e) adsorpčný koeficient (K_d , K_f alebo K_{oc} , podľa potreby) (metóda C. 18);
- f) hydrolýza (metóda C.7);
- g) disociačná konštanta (pK_a) [usmernenie OECD 112] (13);
- h) chemická štruktúra testovanej látky a pozícia izotopového označenia, v prípade potreby.

Poznámka: Zaznamená sa teplota, pri ktorej sa robili tieto merania.

Iné užitočné informácie môžu obsahovať údaje o toxicite testovanej látky pre mikroorganizmy, údaje o rýchlej a/alebo potenciálnej biologickej rozložiteľnosti a údaje o aeróbnej a anaeróbnej transformácii v pôde.

Je potrebné mať k dispozícii analytické metódy (vrátane extrakčných a purifikačných metód) na identifikáciu a kvantifikáciu testovanej látky a jej produktov transformácie vo vode a v sedimente (pozri oddiel 1.7.2).

⁽¹⁾ Napríklad, ak látka obsahuje jeden kruh, označenie tohto kruhu je potrebné; ak testovaná látka obsahuje dva alebo viac kruhov, samostatné štúdie môžu byť potrebné na hodnotenie osudu každého označeného kruhu a na získanie príslušných informácií o tvorbe produktov transformácie.

1.5. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Metóda uvedená v tomto teste využíva systém aeróbných a anaeróbných vodných sedimentov (pozri dodatok 1), ktorý umožňuje:

- meranie miery transformácie testovanej látky v systéme voda-sediment,
- meranie miery transformácie testovanej látky v sedimente,
- meranie miery mineralizácie testovanej látky a/alebo jej produktov transformácie (ak sa použije testovaná látka označená ^{14}C),
- identifikáciu a kvantifikáciu produktov transformácie vo vodnej fáze a fáze sedimentu vrátane hmotnostnej bilancie (ak sa použije označená testovaná látka),
- meranie distribúcie testovanej látky a jej produktov transformácie medzi dvoma fázami počas inkubačnej doby v tme (aby sa zabránilo, napríklad, rozmnoženiu rias) pri stálej teplote. Polčasy, hodnoty DT_{50} , DT_{75} a DT_{90} sa stanovujú, ak to umožňujú údaje, ale nesmú sa extrapolovať veľmi dlho od doby experimentu (pozri oddiel 1.2).

Aspoň dva sedimenty a ich pridružené vody sú potrebné pre aeróbne a anaeróbne štúdie (7). Môžu sa však vyskytnúť prípady, keď je potrebné použiť viac ako dva vodné sedimenty, napríklad v prípade chemikálie, ktorá sa môže nachádzať v sladkých a/alebo morských vodách.

1.6. POUŽITELNOSŤ TESTU

Metóda je všeobecne použiteľná na všetky chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je k dispozícii analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na mierne prchavé, neprchavé, vo vode rozpustné alebo vo vode zle rozpustné zlúčeniny. Test sa nepoužíva na chemikálie, ktoré sú veľmi prchavé z vody (napr. fumiganty, organické rozpúšťadlá), a teda sa pri experimentálnych podmienkach testu nemôžu uchovať vo vode.

Metóda sa doteraz používala na skúmanie transformácie chemikálií v sladkých vodách a sedimentoch, ale v zásade sa dá použiť aj na systémy ústí riek a morské systémy. Nie je vhodná na simulovanie podmienok v tečúcich vodách (napr. rieky) alebo podmienok otvoreného mora.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. Regenerácia

Extrakcia a analýza minimálne dvoch paralelných vzoriek vody a sedimentu ihneď po pridaní testovanej látky poskytuje prvý dôkaz reprodukovateľnosti analytickej metódy a rovnomerného rozdelenia testovanej látky pri aplikácii. Regenerácie v neskorších stupňoch experimentov sú dané príslušnými hmotnostnými bilanciami (ak sa použije označený materiál). Regenerácie by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % pre označené chemikálie (6) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie.

1.7.2. Reprodukovateľnosť a citlivosť analytickej metódy

Reprodukovateľnosť analytickej metódy (okrem počiatočnej účinnosti extrakcie) na kvantifikovanie testovanej látky a produktov transformácie sa môže overiť paralelnou analýzou rovnakého extraktu vzoriek vody alebo sedimentu, ktorý sa inkuboval dostatočne dlho, aby vznikli produkty transformácie.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie má byť aspoň 0,01 mg/kg vo vode alebo sedimente (ako testovaná látka) alebo 1 % počiatočnej dávky, aplikovanej do testovaného systému, podľa toho ktorá hodnota je nižšia. Je potrebné stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

1.7.3. Presnosť údajov o transformácii

Regresná analýza koncentrácií testovanej látky v závislosti od času poskytuje príslušné informácie o presnosti transformačnej krivky a umožní výpočet hraníc spoľahlivosti pre polčasy (ak platí kinetika pseudo prvého rádu) alebo hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} .

1.8. OPIS METÓDY**1.8.1. Testovaný systém a aparatura**

Štúdiá by sa mala vykonať v sklenených nádobách (t. j. fľaše, centrifugačné kvety), pokiaľ z predbežných informácií (napr. rozdeľovací koeficient n-oktanol-voda, sorpčné údaje atď.) nevyplýva, že testovaná látka môže prilnúť na sklo, v takomto prípade sa môže uvažovať o použití alternatívneho materiálu, napr. teflónu). Ak je známe, že testovaná látka prilne na sklo, môže sa tento problém vyriešiť pomocou jednej alebo viacerých z týchto metód:

- stanoviť hmotnosť testovanej látky a produktov transformácie zachytenej na sklo,
- zabezpečiť, aby sa umyli rozpúšťadlom všetky sklenené pomôcky na konci testu,
- použiť zložené výrobky (pozri tiež oddiel 1.9.2),
- použiť väčšie množstvo pomocných rozpúšťadiel na pridávanie testovanej látky do systému; ak sa pomocné rozpúšťadlá používajú, musí to byť pomocné rozpúšťadlo, ktoré nespôsobí solvolýzu testovanej látky.

Príklady typickej pokusnej aparatury, t. j. plynový prietokový systém a systém biometrického typu, sú znázornené v dodatku 2 a 3 (14). Ďalšie užitočné inkubačné systémy sú uvedené v odkaze (15). Konštrukcia pokusnej aparatury by mala umožniť výmenu vzduchu alebo dusíka a zachytenie prchavých produktov. Rozmery aparatury musia byť také, aby boli v súlade s požiadavkami testu (pozri oddiel 1.9.1). Prevzdušnenie sa zabezpečí buď jemným prebublávaním, alebo prepúšťaním vzduchu alebo dusíka nad povrchom vody. V druhom prípade pre lepšiu distribúciu kyslíka alebo dusíka vo vode sa môže odporúčať jemné miešanie vody zvrchu. Vzduch zbavený CO_2 by sa nemal používať, lebo môže spôsobiť zvýšenie pH vody. V každom prípade narušenie sedimentu nie je žiadateľné a, pokiaľ možno, treba mu zabrániť. Mierne prchavé látky by sa mali testovať v systéme biometrického typu jemným premiešaním povrchu vody. Môžu sa použiť aj uzavreté nádoby s plynnou fázou tvorenou atmosférickým vzduchom alebo dusíkom a internými nádobkami na zachytávanie prchavých produktov (16). Je potrebná pravidelná výmena plynnej fázy v aeróbnom teste, aby sa kompenzovala spotreba kyslíka biomasou.

Vhodné zachytávače na zachytávanie prchavých produktov transformácie obsahujú okrem iného roztoky hydroxidu draselného alebo hydroxidu sodného v koncentrácii 1 mol/dm³ pre oxid uhličitý⁽¹⁾ a etylenglykol, etanolamín alebo 2 % parafín v xyléne pre organické zlúčeniny. Prchavé látky, ktoré sa tvoria za anaeróbnych podmienok, ako napr. metán, sa môžu zachytávať, napríklad molekulovými sitami. Takéto prchavé látky sa môžu spaľovať, napríklad na CO_2 prepúšťaním plynu cez kremennú trubicu naplnenú CuO pri teplote 900 °C a zachytávaním vzniknutého CO_2 v absorberi s alkalickou látkou (17).

Je potrebné laboratórne zariadenie na chemickú analýzu testovanej látky a produktov transformácie [(t. j. plynová kvapalinová chromatografia (GLC), vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC), chromatografia na tenkej vrstve (TLC), hmotnostná spektroskopia (MS), plynová chromatografia – hmotnostná spektroskopia (GC-MS), kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria (LC-MS), jadrová magnetická rezonancia (NMR) atď.], vrátane detekčných systémov pre rádioaktívne označené a neoznačené chemikálie, podľa potreby. Ak sa používa rádioaktívne označený materiál, bude potrebný aj kvapalný scintilačný počítač a oxidačné činidlo na spaľovanie (na spaľovanie vzoriek sedimentu na analýzu rádioaktivity).

V prípade potreby je potrebné ďalšie bežné laboratórne zariadenie na fyzikálno-chemické a biologické stanovenia (pozri tabuľku v oddiele 1.8.2.2), sklenené nádoby, chemikálie a reagensy.

1.8.2. Výber a počet vodných sedimentov

Miesta odberu sa zvolia v súlade s cieľom testu v danej situácii. Pri výbere miest odberu sa musia posúdiť predchádzajúce možné vstupy z poľnohospodárstva, priemyslu alebo domácností do spádovej oblasti a horných tokov. Sedimenty sa nepoužijú, ak boli kontaminované testovanou látkou alebo jej štruktúrnymi analógmi počas predchádzajúcich 4 rokov.

⁽¹⁾ Keďže tieto alkalické absorpčné roztoky tiež absorbujú oxid uhličitý zo vzduchu pri prevzdušňovaní, ktorý sa tvorí respiráciou pri aeróbnych pokusoch, musia sa v pravidelných intervaloch vymieňať, aby sa zabránilo ich saturácii, a tým strate ich absorpčnej kapacity.

1.8.2.1. Výber sedimentu

Na aeróbne štúdie sa zvyčajne používajú dva sedimenty (7). Vybraté dva sedimenty by sa mali odlišovať v obsahu organického uhlíka a textúrou. Jeden sediment by mal mať vysoký obsah organického uhlíka (2,5 % – 7,5 %) a jemnú textúru, druhý sediment by mal mať nízky obsah organického uhlíka (0,5 % – 2,5 %) a hrubú textúru. Rozdiel medzi obsahom organického uhlíka by mal byť zvyčajne aspoň 2 %. „Jemná textúra“ je definovaná ako obsah [íl + bahno] ⁽¹⁾ > 50 % a „hrubá textúra“ je definovaná ako obsah [íl + bahno] < 50 %. Rozdiel v obsahu [íl + bahno] pre dva sedimenty by mal byť zvyčajne aspoň 20 %. V prípadoch keď sa chemikálie môžu dostať aj do morských vôd, aspoň jeden z týchto systémov voda-sediment by mal pochádzať z mora.

Pre striktnu anaeróbnu štúdiu sa dva sedimenty (vrátane ich pridružených vôd) odoberú z anaeróbných zón povrchových vodných telies (7). S obidvoma fázami sediment aj voda sa manipuluje opatrne a prepravujú sa takisto opatrne bez prítomnosti kyslíka.

Ďalšie parametre môžu byť dôležité pri výbere sedimentov a je ich potrebné posudzovať podľa jednotlivých prípadov. Napríklad rozsah pH sedimentov by mohol byť dôležitý pri testovaní chemikálií, v prípade ktorých transformácia a/alebo sorpcia môže závisieť od pH. Závislosť sorpcie od pH môže vyjadrovať pK_a testovanej látky.

1.8.2.2. Charakterizácia vzoriek voda-sediment

Kľúčové parametre, ktoré sa musia merať a uviesť v správe (s odkazom na použitú metódu) pre vodu aj sediment, a štádium testu, v ktorom sa tieto parametre majú stanoviť, sú zosumarizované v ďalej uvedenej tabuľke. Informácie o metódach na stanovenie týchto parametrov sú uvedené odkazoch (18) (19) (20) (21).

Podľa okolností je potrebné stanoviť a uviesť v správe aj ďalšie parametre [napr. pre sladkú vodu: častice, zásaditosť, tvrdosť, konduktivitu, NO_3/PO_4 (pomer a jednotlivé hodnoty); pre sedimenty: kationovú výmennú kapacitu, kapacitu zadržiavania vody, uhličitany, celkový dusík a fosfor; a pre morské systémy: soľnosť]. Analýza sedimentov a vody na nitrát, sulfát, biologicky dostupné železo a prípadne iné akceptory elektrónov môže byť tiež užitočná pri posudzovaní redoxných podmienok najmä vo vzťahu k anaeróbnej transformácii.

Stanovenie parametrov na charakterizáciu vzoriek voda-sediment (7) (22) (23)

Parameter	Štádium postupu testu					
	odber vzoriek v teréne	manipulácia	začiatok aklimatizácie	začiatok testu	priebeh testu	koniec testu

Voda

Pôvod/zdroj	x					
Teplota	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC (celková koncentrácia organického kyslíka)			x	x		x
koncentrácia O_2 (*)	x		x	x	x	x
Redox potenciál (*)			x	x	x	x

(¹) [íl + bahno] je minerálna frakcia sedimentu s veľkosťou častíc < 50 µm.

Parameter	Štádium postupu testu					
	odber vzoriek v teréne	manipulácia	začiatok aklimatizácie	začiatok testu	priebeh testu	koniec testu
Sediment						
Pôvod/zdroj	x					
Hĺbka vrstvy	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribúcia veľkosti častíc		x				
TOC (celková koncentrácia organického kyslíka)		x	x	x		x
Mikrobiálna biomasa (**)		x		x		x
Redox potenciál (*)	pozorovanie (farba/vôňa)		x	x	x	x

(*) Z posledných výsledkov výskumu vyplýva, že merania koncentrácií kyslíka vo vode a redox potenciálov nemá mechanistickú ani prognostickú hodnotu, pokiaľ ide o rast a vývoj mikrobiálnych populácií v povrchových vodách (24) (25). Stanovenie biochemickej spotreby kyslíka (BSK, pri odbere vzoriek v teréne, na začiatku a konci testu) a koncentrácií mikro/makro živín Ca, Mg a Mn (na začiatku a konci testu) vo vode a meranie celkového N a celkového P v sedimentoch (pri odbere vzoriek v teréne a na konci testu) môžu byť lepšími nástrojmi na vyjadrenie a posúdenie miery a ciest aeróbnej biotransformácie.

(**) Metóda rýchlosti mikrobiálnej respirácie (26), fumigačná metóda (27) alebo stanovenie počtu mikroorganizmov (napr. baktérie, aktinomycéty, plesne a celkové kolónie) pre aeróbne štúdie; miera metanogenézy pre anaeróbne štúdie.

1.8.3. Odber, manipulácia a skladovanie

1.8.3.1. Odber

Odber vzoriek sedimentu by sa mal robiť podľa návrhu pokynov ISO pre odber vzoriek spodného sedimentu (8). Vzorky sedimentu by sa mali odobrať z celkovej vrchnej vrstvy 5 cm až 10 cm sedimentu. Prídružené vody by sa mali odobrať z rovnakého miesta alebo lokality a v rovnaký čas ako sediment. Pre anaeróbnu štúdiu by sa mali odobrať vzorky sedimentu a prídruženej vody a dopraviť za neprítomnosti kyslíka (28) (pozri oddiel 1.8.2.1). Niektoré zariadenia na odber vzoriek sú uvedené v odkazoch (8) (23).

1.8.3.2. Manipulácia

Sediment sa oddelí od vody filtráciou a tento sediment sa za mokra preoseje na site s otvormi 2 mm s použitím nadbytku vody z lokality a voda z lokality sa potom odstráni. Potom sa známe množstvá sedimentov a vody zmiešajú v požadovanom pomere (pozri oddiel 1.9.1) v inkubačných bankách a pripraví sa na aklimatizačné obdobie (pozri oddiel 1.8.4). V prípade anaeróbnej štúdie sa všetky kroky pri manipulácii musia uskutočňovať za neprítomnosti kyslíka (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. Uchovávanie

Dôrazne sa odporúča použiť čerstvo odobraté vzorky sedimentu a vody, ale ak je potrebné skladovanie, sediment a voda sa preoseje, ako je uvedené vyššie, a skladujú sa spolu zaliat vodou (6 cm – 10 cm vodná vrstva), v tme, pri $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ (⁴) maximálne 4 týždne (7) (8) (23). Vzorky na použitie v aeróbných štúdiách sa skladujú za voľného prístupu vzduchu (napr. v otvorených nádobách), zatiaľ čo vzorky na použitie v anaeróbných štúdiách za neprítomnosti kyslíka. Počas prepravy a skladovania nesmie sediment ani voda zamrznúť a sediment tiež nesmie vyschnúť.

1.8.4. Príprava vzoriek sedimentu/vody na test

Pred pridaním testovanej látky by sa mala uskutočniť aklimatizácia každej vzorky sedimentu/vody, ktorá sa umiestni do inkubačnej nádoby, ktorá sa má použiť v základnom teste, a aklimatizácia sa uskutoční za presne rovnakých podmienok ako inkubácia v teste (pozri oddiel 1.9.1). Doba aklimatizácie je čas potrebný na dosiahnutie primeranej stability systému vyjadrenej hodnotou pH, koncentráciou kyslíka vo vode, redox potenciálom sedimentu a vody a makroskopickou separáciou fáz. Doba aklimatizácie by mala zvyčajne trvať medzi jedným a dvoma týždňami a nemala by presiahnuť štyri týždne. Výsledky stanovení uskutočnených

počas tohto obdobia by sa mali zaznamenať.

1.9. VYKONANIE TESTU

1.9.1. Testovacie podmienky

Test by sa mal uskutočniť v inkubačnom zariadení (pozri oddiel 1.8.1) s pomerom objemu voda/sediment medzi 3:1 a 4:1 a vrstvou sedimentu 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm) ⁽¹⁾. Odporúča sa minimálne množstvo 50 g sedimentu (suchá hmotnosť) na inkubačnú nádobu.

Test by sa mal uskutočniť v tme pri stálej teplote v rozmedzí 10 °C až 30 °C. Teplota (20 °C $\pm$ 2 °C) je primeraná. V prípade potreby sa môže v jednotlivých prípadoch dodatočne uvažovať o nižšej teplote (napr. 10 °C) v závislosti od informácií, ktoré sa na základe testu požadujú. Inkubačnú teplotu je potrebné sledovať a zaznamenávať.

1.9.2. Spracovanie a aplikácia testovanej látky

Používa sa jedna testovacia koncentrácia chemikálie ⁽²⁾. Pre chemikálie na ochranu rastlín, ktoré sa priamo aplikujú do vodných telies, maximálna dávka uvedená na označení je maximálna aplikačná dávka, ktorá sa vypočíta vo vzťahu na povrch vody v testovacej nádobe. Vo všetkých ostatných prípadoch by koncentrácia, ktorá sa má použiť, mala vychádzať z výpočtov environmentálnych emisií. Je potrebné venovať pozornosť na zabezpečenie toho, aby sa na charakterizáciu cesty transformácie a tvorby a rozkladu produktov transformácie použila primeraná koncentrácia testovanej látky. Môže byť potrebné použiť vyššie dávky (napr. 10-násobné) v situáciách, keď sa koncentrácie testovanej látky približujú k detekčným limitom na začiatku štúdie a/alebo sa hlavné produkty transformácie nedajú jasne stanoviť, keď ich podiel tvorí 10 % aplikačnej dávky testovanej látky. Ak sa však použijú vyššie testovacie koncentrácie, nemali by mať významný nepriaznivý účinok na mikrobiálnu aktivitu systému voda-sediment. Aby sa dosiahla konštantná koncentrácia testovanej látky v nádobách rôznych rozmerov, môže byť potrebné zvážiť prispôbenie na množstvo použitého materiálu na základe hĺbky vodného stĺpca v nádobe vo vzťahu k hĺbke vody v teréne (predpokladá sa, že bude 100 cm, ale môžu sa použiť iné hĺbky). Príklady výpočtu pozri v dodatku 4.

V ideálnom prípade by sa mala testovaná látka aplikovať ako vodný roztok do vodnej fázy testovaného systému. Ak je to nevyhnuté, povoľuje sa použiť nízke množstvá vodou zmiešateľných rozpúšťadiel (ako napr. acetón, etanol) na aplikáciu a distribúciu testovanej látky, ale nemali by presiahnuť 1 obj. % a nemali by mať nepriaznivé účinky na mikrobiálnu aktivitu testovaného systému. Pri príprave vodného roztoku testovanej látky je potrebné dávať pozor – na zabezpečenie úplnej homogenity môže byť potrebné použiť stĺpcové usporiadanie generátora a premiešanie. Po pridaní vodného roztoku do testovaného systému sa odporúča jemné premiešanie vodnej fázy tak, aby sa čo najmenej narušil sediment.

Použitie zložených prípravkov sa bežne neodporúča, pretože zložky prípravku môžu ovplyvniť distribúciu testovanej látky a/alebo produktov transformácie medzi vodnou fázou a fázou sedimentu. Použitie zloženého materiálu však môže byť vhodnou alternatívou, napríklad v prípade vo vode ťažko rozpustných testovaných látok.

Počet inkubačných nádob závisí od počtu odberov (pozri oddiel 1.9.3). Je potrebné použiť dostatočný počet testovaných systémov tak, aby sa na každý odber mohli použiť dva systémy. Ak sa používajú kontrolné jednotky každého systému voda/sediment, nemali by sa ošetrovať testovanou látkou. Kontrolné jednotky sa môžu použiť na stanovenie mikrobiálnej biomasy sedimentu a celkového organického uhlíka vody a sedimentu na konci štúdie. Dve kontrolné jednotky (t. j. jedna kontrolná jednotka každého vodného sedimentu) sa môže použiť na sledovanie požadovaných parametrov v sedimente a vode počas doby aklimatizácie (pozri tabuľku

⁽¹⁾ Posledné štúdie ukázali, že skladovanie pri 4 °C môže viesť k poklesu obsahu organického uhlíka sedimentu, ktorý môže mať prípadne za následok zníženie mikrobiálnej aktivity (34).

⁽²⁾ Test s druhou koncentráciou môže byť užitočný pre chemikálie, ktoré sa dostanú do povrchových vôd rôznymi cestami vstupu, výsledkom čoho sú značne rozdielne koncentrácie, pokiaľ sa nižšia koncentrácia dá analyzovať s dostatočnou presnosťou.

v oddiele 1.8.2.2). Dve ďalšie kontrolné jednotky sa musia použiť v prípade, keď sa testovaná látka aplikuje s použitím rozpúšťadla na stanovenie nepriaznivých účinkov na mikrobiálnu aktivitu testovaného systému.

1.9.3. Trvanie testu a odber vzoriek

Trvanie experimentu by zvyčajne nemalo byť dlhšie ako 100 dní (6) a malo by pokračovať až do stanovenia cesty degradácie a modelu distribúcie voda/sediment, alebo kým sa transformáciou rozloží a/alebo vyprchá 90 % testovanej látky. Malo by sa vykonať aspoň šesť odberov (vrátane času nula) s nepovinnou predbežnou štúdiou (pozri oddiel 1.9.4), ktorá sa použije na stanovenie vhodného režimu odberov vzoriek a trvania testu, pokiaľ nebudú k dispozícii dostačujúce údaje o testovanej látke z predchádzajúcich štúdií. Pre hydrofóbne testované látky môžu byť potrebné ďalšie odbery v priebehu počiatočného štádia štúdie, aby sa stanovila miera distribúcie medzi vodnou fázou a fázou sedimentu.

V dobe príslušných odberov sa všetky inkubačné nádoby (paralelne) odoberú na analýzu. Sediment a voda nad ním sa analyzujú samostatne ⁽¹⁾. Povrchová voda by sa mala opatrne odstrániť tak, aby sa čo najmenej narušil sediment. Extrakcia a charakterizácia testovanej látky a produkty transformácie by sa mali uskutočniť podľa príslušných analytických postupov. Je potrebné venovať pozornosť, aby sa odstránil materiál, ktorý sa môže naadsorbovať na inkubačnú nádobu alebo na rúrky, ktoré slúžia na prepojenie pri zachytávaní prchavých látok.

1.9.4. Nepovinný predbežný test

Ak sa trvanie a režim odberov vzoriek nedá určiť z iných príslušných štúdií o testovanej látke, môže sa usúdiť, že je vhodné vykonať nepovinný predbežný test, ktorý by sa uskutočnil za rovnakých testovacích podmienok, aké sú navrhnuté pre konečnú štúdiu. Príslušné experimentálne podmienky a výsledky z predbežného testu, ak sa uskutoční, by sa mali stručne zaznamenávať.

1.9.5. Merania a analýza

Koncentrácia testovanej látky a produktov transformácie pri každom odbere vo vode a sedimente by sa mala stanoviť a zaznamenať (ako koncentrácia a ako percentuálny podiel použitého množstva). Vo všeobecnosti by sa mali identifikovať produkty transformácie stanovené pri ≥ 10 % použitej rádioaktivity v celom systéme voda-sediment pri ktoromkoľvek odbere, pokiaľ neexistuje iný riadne odôvodnený postup. Produkty transformácie, pre ktoré sa koncentrácie trvale zvyšujú počas štúdie, by sa taktiež mali posúdiť na identifikáciu, aj keď ich koncentrácie nepresahujú limity uvedené vyššie, lebo to môže byť dôkazom perzistencie. Toto je potrebné posúdiť na základe jednotlivých prípadov s odôvodneniami, ktoré sa uvedú v správe.

Výsledky zo systémov na zachytávanie plynov/prchavých látok (CO_2 a iné, t. j. prchavé organické látky) by sa mali zaznamenať pri každom odbere. Mala by sa zaznamenať miera mineralizácie. Neextrahovateľné (viazané) rezíduá v sedimente sa zaznamenajú pri každom odbere.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Celková hmotnostná bilancia alebo regenerácia (pozri oddiel 1.7.1) pridanej rádioaktivity sa vypočíta pri každom odbere. Výsledky sa zaznamenajú ako percentuálna hodnota pridanej rádioaktivity. Distribúcia rádioaktivity medzi vodou a sedimentom sa zaznamenáva ako koncentrácie a percentuálne hodnoty pri každom odbere.

Polčas, DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} testovanej látky sa vypočítajú spolu s ich hranicami spoľahlivosti (pozri oddiel 1.7.3). Informácie o miere rozptylu testovanej látky vo vode a sedimente sa získajú na základe použitia príslušných vyhodnocovacích nástrojov. K nim môže patriť použitie kinetiky pseudo prvého rádu, empirické techniky (konštrukcia krivky bod po bode), ktoré používajú grafické alebo numerické riešenia a komplexnejšie vyhodnotenia s použitím napríklad jednoduchých alebo niekoľkonásobných kazetových modelov. Ďalšie informácie je možné získať z odkazov (35) (36) (37).

Všetky prístupy majú svoje silné a slabé stránky a odlišujú sa v komplexnosti. Predpoklad kinetiky prvého rádu môže byť prílišným zjednodušením procesov degradácie a distribúcie, ale ak je možné, poskytuje hodnotu (rýchlostnú konštantu alebo polčas), ktorá je ľahko zrozumiteľná a má zmysel pre simulačné modelovanie a výpočty očakávaných environmentálnych koncentrácií. Výsledkom empirických prístupov alebo lineárnych

⁽¹⁾ V prípadoch, keď môže ľahko dôjsť k rýchlej reoxidácii anaeróbnych produktov transformácie, treba zachovať anaeróbne podmienky počas odberu vzoriek a analýzy.

transformácií môže byť lepšie prispôsobenie kriviek údajom, a preto umožňujú lepšie stanovenie polčasov, hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} . Použitie odvodených konštánt je však obmedzené. Kazetové modely môžu vytvoriť množstvo užitočných konštánt, ktoré majú význam pri hodnotení rizika, ktoré opisuje mieru degradácie v rôznych kazetách a distribúciu chemikálie. Používajú sa na stanovenie rýchlostných konštánt na tvorbu a degradáciu hlavných produktov transformácie. V každom prípade sa zvolená metóda musí zdôvodniť a experimentátor demonštrovať graficky a/alebo štatisticky správnosť prispôbenia.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. **SPRÁVA O TESTE**

Správa musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

- všeobecný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec [uvádzajúci pozíciu označenia(-í), ak sa použije rádioaktívne označený materiál] a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,
- čistota (nečistoty) testovanej látky,
- rádiochemická čistota označenej chemikálie a molárna aktivita (v prípade potreby).

Referenčné látky:

- chemický názov a štruktúra referenčných látok použitých na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie.

Testované sedimenty a vody:

- umiestnenie a opis miesta (miest) odberu vzoriek vodného sedimentu vrátane, ak je to možné, predchádzajúcej kontaminácie,
- všetky informácie týkajúce sa odberu, skladovania (ak sa uskutočnilo) a aklimatizácie systémov voda-sediment,
- charakteristiky vzoriek voda-sediment, ako sú uvedené v tabuľke v oddiele 1.8.2.2.

Testovacie podmienky:

- použitý systém testovania (napr. prietokový, biometrický, spôsob ventilácie, metóda miešania, objem vody, hmotnosť sedimentu, výška vodnej vrstvy a vrstvy sedimentu, rozmer testovacích nádob atď.),
- aplikácia testovanej látky na testovaný systém: použitá testovaná koncentrácia, počet paralelných a kontrolných vzoriek, spôsob aplikácie testovanej látky (napr. prípadného použitia rozpúšťadla) atď.,
- inkubačná teplota,
- počet odberov,
- extrakčné metódy a účinnosti, ako aj analytické metódy a detekčné limity,
- metódy na charakterizáciu/identifikáciu produktov transformácie,
- odchýlky od protokolu testu alebo testovacích podmienok počas štúdie.

Výsledky:

- číselné hodnoty nespracovaných údajov reprezentatívnych analýz (všetky nespracované údaje sa musia uchovávať v SLP archíve),
- opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,
- miera regenerácie (percentuálne hodnoty pre platnú štúdiu sú uvedené v oddiele 1.7.1),
- tabuľky s výsledkami vyjadrené ako % aplikovanej dávky a v mg/kg vo vode, sedimente a celkovom systéme (iba %) pre testovanú látku a v prípade potreby pre produkty transformácie a neextrahovateľnú rádioaktivitu,
- hmotnostná bilancia v priebehu a na konci štúdií,
- grafické znázornenie transformácie vo vodných frakciách a frakciách sedimentu a v celkovom systéme (vrátane mineralizácie),
- miera mineralizácie,
- polčas, hodnoty DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie vrátane hraníc spoľahlivosti vo vode, sedimente a celkovom systéme,
- vyhodnotenie kinetiky transformácie testovanej látky a v prípade potreby hlavných produktov transformácie,
- údaje o cestách transformácie, v prípade potreby,
- diskusia k výsledkom.

4. ODKAZY

- (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. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18 – 20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945 – 956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 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.
- (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. *Chemosphere* 27, 1499 – 1509.
- (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*, 1349 – 1354.

DODATOK 1

USMERNENIE K AERÓBNYM A ANAERÓBNYM TESTOVANÝM SYSTÉMOM

Aeróbný testovaný systém

Aeróbný testovaný systém opísaný v tejto testovacej metóde pozostáva z aeróbnej vodnej vrstvy (zvyčajné koncentrácie kyslíka v rozsahu od 7 mg/l do 10 mg/l) a vrstvy sedimentu, aeróbnej na povrchu a anaeróbnej pod povrchom [zvyčajné priemerné redox potenciály (E_h) v anaeróbnej zóne sedimentu v rozsahu od -80 do -190 mV]. Nad povrchom vody v každej inkubačnej jednotke sa preženie zvlhčený vzduch, aby sa vo vrchnej časti zabezpečil dostatok kyslíka.

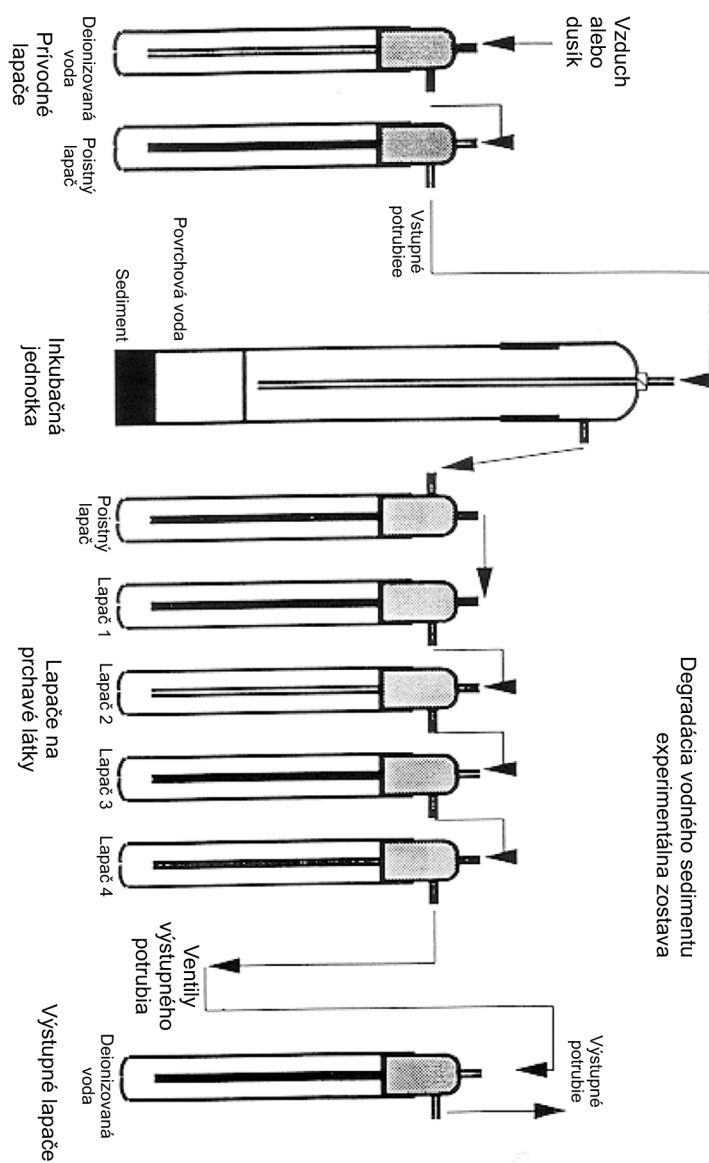
Anaeróbný testovaný systém

Pre anaeróbný testovaný systém je postup testu v podstate rovnaký, ako je uvedené pre aeróbný systém, s tou výnimkou, že zvlhčený dusík sa preženie nad povrchom vody v každej inkubačnej jednotke, aby sa vo vrchnej časti zachoval dostatok dusíka. Sediment a voda sa pokladajú za anaeróbne, keď je redox potenciál (E_h) nižší ako -100 mV.

V anaeróbnom teste vyhodnotenie mineralizácie zahŕňa meranie uvoľneného oxidu uhličitého a metánu.

DODATOK 2

PRÍKLAD PLYNOVÉHO PRIETOKOVÉHO PRÍSTROJA



Bezpečnostný lapač, prázdny

Lapač 1:

etylénglykol na zachytenie organických látok

Lapač 2:

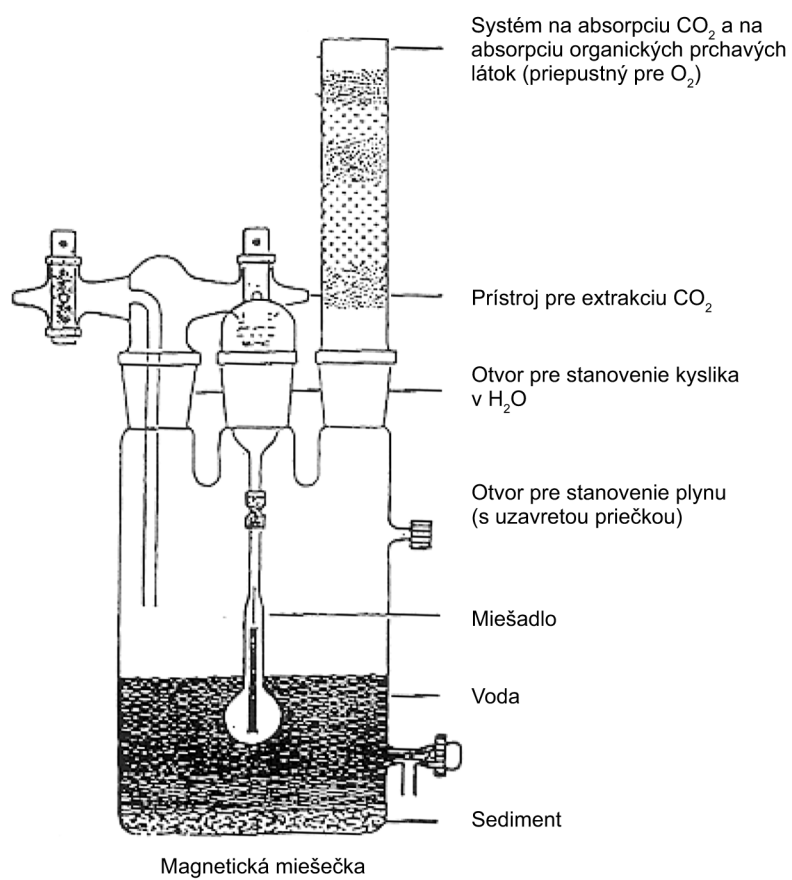
kyselina sírová 0,1 M na zachytenie alkalických prchavých látok

Lapač 3 a 4:

hydroxid sodný 2 M na zachytenie CO₂ a iných kyslých prchavých látok

DODATOK 3

PRÍKLAD BIOMETRICKÉHO PRÍSTROJA



DODATOK 4

PRÍKLAD VÝPOČTU PRE APLIKAČNÚ DÁVKU V TESTOVACÍCH NÁDOBÁCH

Vnútorňý priemer valca:	= 8 cm
Výška vodného stĺpca bez sedimentu:	= 12 cm
Povrch: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm ²
Aplikačná dávka: 500 g testovanej látky/ha zodpovedá 5 µg/cm ²	
Celkove µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Vzťah množstva k výške vodného stĺpca 100 cm:	
$12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 µg
Objem vodného stĺpca: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrácia vo vode: $30,18 \div 603$	= 0,050 µg/ml alebo 50 µg/l
