

Budapest,
2003. szeptember 1.,
hétfő

102. szám
II. kötet

Ára: 8120,- Ft

TARTALOMJEGYZÉK

54/2003. (IX. 1.)
ESZCSM—KvVM—BM e. r.

A veszélyes anyagok és a veszélyes készítmények tulajdonságainak vizsgálati módszereiről és a vizsgálatok eredményeinek értékeléséről

II. rész JOGSZABÁLYOK

A Kormány tagjainak rendeletei

Az egészségügyi, szociális és családügyi miniszter, a környezetvédelmi és vízügyi miniszter, valamint a belügyminiszter
54/2003. (IX. 1.) ESZCSM—KvVM—BM
együttes rendelete

a veszélyes anyagok és a veszélyes készítmények tulajdonságainak vizsgálati módszereiről és a vizsgálatok eredményeinek értékeléséről

A kémiai biztonságról szóló 2000. évi XXV. törvény 34. §-a (4) bekezdésének c) pontjában kapott felhatalmazás alapján a következőket rendeljük el:

1. §

(1) Az anyagok és a készítmények fizikai, fizikai-kémiai és kémiai tulajdonságait, valamint mérgező (toxikológiai) és környezetkárosító (ökotoxikológiai) tulajdonságait az

e rendelet *mellékletében* megadott módszerek szerint kell meghatározni.

(2) Az e rendelet szerinti módszerek alkalmazása alapján nyert eredmények értékelését a 44/2000. (II. 27.) EüM rendelet 1—4., valamint 10. számú mellékletei alapján kell elvégezni.

2. §

(1) Ez a rendelet a kihirdetését követő 60. napon lép hatályba.

(2) Ez a rendelet a Magyar Köztársaság és az Európai Községek és azok tagállamai közötti társulás létesítéséről szóló, Brüsszelben, 1991. december 16-án aláírt Európai Megállapodás tárgykörében, a megállapodást kihirdető 1994. évi I. törvény 3. §-ával összhangban összeegyeztethető szabályozást tartalmaz a Tanácsnak a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK irányelve — legutóbb a Bizottság 2001/59/EK irányelvvel módosított — V. mellékletével.

Dr. Csehák Judit s. k.,
egészségügyi, szociális
és családügyi miniszter

Dr. Persányi Miklós s. k.,
környezetvédelmi és vízügyi
miniszter

Pál Tibor s. k.,
belügyminisztériumi politikai államtitkár

Melléklet az 54/2003. (IX. 1.) ESZCSM–KvVM–BM együttes rendelethez

BEVEZETÉS

A mellékletben foglalt rendelkezések meghatározzák a fizikai-kémiai, toxikológiai és ökotoxikológiai vizsgálati módszereket. A módszerek az illetékes nemzetközi testületek (főként az OECD) által elismert és ajánlott eljárásokon alapulnak.

Ha ilyen módszerek nem állnak rendelkezésre, akkor a nemzeti szabványok vagy tudományos konszenzuson alapuló módszerek irányadóak.

Ha a mellékletben meghatározott módszerek nem alkalmasak egy bizonyos tulajdonság vizsgálatához, a bejelentőnek meg kell indokolnia a felhasznált alternatív módszert.

Az állatokon a vizsgálatokat úgy kell végezni, hogy azok összhangban legyenek a nemzeti szabályozással, és figyelembe kell venni a humán elveit, valamint az állatjólét terén elért nemzetközi fejlődést.

Az egyenértékű vizsgálati módszerek közül azt kell választani, amelyik a legkevesebb állat felhasználásával jár.

Megjegyzés: az egyes fizikai-kémiai tulajdonságokhoz tartozó módszerek leírásánál az ábrák és táblázatok számozása mindig újratezdődik!

„A” RÉSZ

MÓDSZEREK A FIZIKAI-KÉMIAI TULAJDONSÁGOK MEGHATÁROZÁSÁHOZ

TARTALOMJEGYZÉK

- A.1. Olvadás/fagyáspont
- A.2. Forráspont
- A.3. Relatív sűrűség
- A.4. Gőznyomás
- A.5. Felületi feszültség
- A.6. Oldhatóság vízben
- A.8. Megoszlási hányados
- A.9. Lobbanáspont
- A.10. Gyúlékonyság (szilárd anyagok)
- A.11. Gyúlékonyság (gázok)
- A.12. Gyúlékonyság (érintkezés vízzel)
- A.13. Szilárd anyagok és folyadékok öngyulladásra való képessége
- A.14. Robbanási tulajdonságok
- A.15. Öngyulladásra való hőmérséklet (folyadékok és gázok)
- A.16. Szilárd anyagok relatív öngyulladásra való hőmérséklete
- A.17. Oxidáló tulajdonságok (szilárd anyagok)
- A.18. Számátlagos molekulatömeg és polimerek molekulatömeg eloszlása
- A.19. Polimerek kis molekulatömeg tartalma
- A.20. Polimerek oldódási/extrakciós tulajdonságai vízben

A.1. OLVADÁS/FAGYÁSPONT

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az OECD Vizsgálati Útmutató Test Guideline-on alapul (1). Az alapelveket irodalmi hivatkozások adják meg (2, 3).

1.1. Bevezetés

Az anyagok olvadáspont meghatározásához leírt módszereknél és eszközöknél nincsenek megszorítások az anyagok tisztasági fokát illetően.

A módszer kiválasztása a vizsgálni kívánt anyag természetétől függ. Következésképpen az, hogy az anyag könnyen, nehezen vagy egyáltalán porítható-e, korlátozó tényező.

Néhány anyagnál a fagyás vagy a megszilárdulás meghatározása alkalmasabb és az ilyen meghatározásokhoz a szabványokat szintén belefoglalták ebbe a módszerbe.

Ha – az anyag különleges tulajdonságai miatt – a fenti paraméterek egyike sem mérhető megfelelően, a folyáspont lehet az alkalmas paraméter.

1.2. Fogalom meghatározások és mértékegységek

Az olvadáspontot úgy definiálják, hogy az a hőmérséklet, amelyen a fázisátmenet a szilárból a folyékony halmazállapot felé atmoszférikus nyomáson megy végbe és ez a hőmérséklet ideális esetben a fagyáspontnak felel meg.

Míthogy a számos anyag halmazállapot változása meghatározott hőmérséklet tartományban megy végbe, gyakran olvadáspont tartományt adnak meg.

Az egységek átszámítása ($K \rightarrow ^\circ C$)

$$t = T - 273,15$$

t: Celsius hőmérséklet, Celsius fok ($^\circ C$)

T: termodinamikai hőmérséklet, Kelvin (K)

1.3. Referencia anyagok

Referencia anyagok használata nem minden esetben szükséges új anyag vizsgálatánál.

A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyag az irodalomjegyzékből megtalálható (4).

1.4. A vizsgálati módszer elve

A szilárból a folyékonyba, illetve a folyékonyból a szilárdba végbemenő halmazállapot-változás hőmérsékletét (hőmérséklet-tartomány) határozzák meg. A gyakorlatban a tesztanyag mintájának atmoszférikus nyomásnál való hevítésekor/hűtéskor az olvadás/fagyás kezdetének és az olvadás/fagyás befejeződésének hőmérsékletét határozzák meg. A módszerek öt típusát írják le: kapilláris módszer, fűtőasztalos módszerek, fagyáspont-meghatározások, a termikus analízis módszerei, a folyáspont-meghatározások (amint azt a köölajokkal kidolgozták). Bizonyos esetekben a olvadáspont mérése helyett alkalmasabb a fagyáspont mérése.

1.4.1. Kapilláris módszer

1.4.1.1. Olvadáspontot mérő eszközök folyadékfűrdővel

Finomra örölt anyag kis mennyiségét kapilláris csöbe helyezik el és azt szorosan lezárják. A csövet melegítik a hőmérővel együtt és a hőmérséklet-emelkedést úgy állítják be, hogy az olvadás tényleges idején 1 K/perc értéknél kisebb legyen. Az olvadás kezdő és végső hőmérsékletét állapítják meg.

1.4.1.2. Olvadáspontot mérő fémblokkos eszközök

A módszert az 1.4.1.1. pontban leírtak szerint végzik azzal a különbséggel, hogy a kapilláris csövet és a hőmérőt egy fűtött fémblokkban helyezik el és a megfigyeléseket a blokk nyílásain át lehet végezni.

1.4.1.3. Fotocellás meghatározás

A kapilláris csöben lévő mintát automatikusan hevítik egy fémhengerben. Fénysugarat irányítanak az anyagon keresztül a hengeren lévő nyíláson át a pontosan kalibrált fotocellához. A legtöbb anyag optikai tulajdonságai az opálostól az átlátszóig változnak a hevítés során. A fotocellát elérő fény intenzitása növekszik és megszüntető jeleket ad a digitális kijelzőhöz, amely a hevítő kamrában elhelyezett platina ellenállás-hőmérőről olvassa le a hőmérsékletet. Ez a módszer néhány erősen színes anyag vizsgálatánál nem alkalmazható.

1.4.2. Fűtőasztalok

1.4.2.1. Kofler-fűtőasztal

A Kofler-fűtőasztal két, eltérő hővezető képességű fémdarabot tartalmaz, amelyet elektromosan fűtenek. A fémdarabokat úgy méretezték, hogy a hőmérséklet-grádiens majdnem lineáris a hosszuk mentén. A fűtőasztal hőmérséklete 283 K-tól 573 K-ig változhat. Speciális hőmérséklet-leolvasó készüléke van, amely egy görgőn mutatóval, skálával van ellátva. Az olvadáspont meghatározására az anyagot vékony rétegben helyezik el közvetlenül a

fűtőasztal felületén. Néhány másodpercen belül éles választóvonal alakul ki a folyadék és a szilárd fázis között. A választóvonalnál a hőmérséklet úgy olvasható le, hogy a mutatót beállítják a vonalra.

1.4.2.2. Olvadásvizsgáló mikroszkóp

Többféle mikroszkópos fűtőasztal használatos igen kis mennyiségű anyagok olvadáspont meghatározásához. A legtöbb fűtőasztalnál a hőmérsékletet érzékeny termoelemmel mérik, de néha higanyos hőmérőt használnak. A tipikus mikroszkópos fűtőasztalos olvadáspont mérő készüléknek olyan fűtőkamrája van, amely fémlapot tartalmaz, amelyre a mintát tárgylemezen helyezik el. A fémlap középpontjában nyílás található, ez lehetővé teszi a fény bejutását a mikroszkóp megvilágító tükréről. Használat közben a kamrát üveglap zárja le, hogy kizárja a levegőt a mintatérből.

A minta fűtését reosztáttal szabályozzák. A nagyon pontos mérésekhez optikailag anizotrop anyagoknál polarizált fény használható.

1.4.2.3. Meniszkusz módszer

Ezt a módszert speciálisan a poliamidoknál használják.

Vizuálisan határozzák meg azt a hőmérsékletet, amelynél a fűtőasztal és a fedőlemez között lévő szilikonolaj meniszkusza elmozdul.

1.4.3. A fagyáspontot meghatározó módszer

A mintát speciális kémcsőben helyezik a fagyáspontot meghatározó készülékbe. A mintát óvatosan és folyamatosan keverik hűtés közben és alkalmas időközökben mérik a hőmérsékletet. Amikor a hőmérséklet állandó marad néhány leolvasás folyamán, ezt a hőmérsékletet (a hőmérő hibájára korrigálva) úgy jegyzik fel, mint fagyáspontot.

A túlhűtést el kell kerülni az egyensúly fenntartásával a szilárd és a folyékony fázis között.

1.4.4. Termikus analízis

1.4.4.1. Differenciál termo-analízis (DTA)

Ez a technika regisztrálja a tesztanyag és a referencia anyag hőmérséklet különbségeit a hőmérséklet függvényeként, miközben a tesztanyagot és a referencia anyagot ugyanannál az ellenőrzött hőmérsékleti programnál vizsgálják. Amikor a mintában az entalpia változásával járó átalakulás végbemegy, azt a hőmérsékleti görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

1.4.4.2. Differenciál scanning-kalorimetria (DSC)

Ez a technika a tesztanyag és a referencia anyag energia bevitelének különbségét regisztrálja a hőmérséklet függvényében, miközben a tesztanyagot és a referencia anyagot ugyanazzal az ellenőrzött hőmérsékleti programmal vizsgálják. A vizsgált energia az az energia, amely ahhoz szükséges, hogy a tesztanyag és a referencia anyag között a hőmérséklet különbsége zéró legyen. Amikor a mintában az entalpia változásával járó átalakulás végbemegy, azt a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (olvadás) vagy exoterm (fagyás) eltérés jelzi.

1.4.5. Folyáspont

Ezt a módszert a kőolajok vizsgálatához fejlesztették ki és a módszer alacsony olvadáspontú olajszerű anyagok vizsgálatára alkalmas. Előzetes melegítés után a mintát jellemző sebességgel lehűtik és vizsgálják az áramlási karakterisztikát 3 K-s intervallumokban. A legalacsonyabb hőmérsékletet, amelynél az anyag mozgását megfigyelték, tekintik az anyag folyáspontjának.

1.5. Minőségi kritériumok

Az olvadás/fagyáspont tartomány meghatározásához használt módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát a következő táblázat sorolja fel:

A módszerek alkalmazhatósága

A) Kapilláris módszerek

Mérési módszer	Porítható anyagok	Nehezen porítható anyagok	Hőmérsékleti tartomány	Becsült pontosság ⁽¹⁾	Meglévő szabvány
Forráspontot mérő eszközök folyadékfürdővel	igen	Csak néhány anyagra	273–573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Forráspontot mérő eszközök fémblokkal	igen	Csak néhány anyagra	293–>573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fotocellás meghatározás	igen	több anyagra alkalmas eszközzel	253–573 K	± 0,5K	

⁽¹⁾ Függ a készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától

B) Fűtőasztalok és fagyásvizsgáló módszerek

Mérési módszer	Porítható anyagok	Nehezen porítható anyagok	Hőmérsékleti tartomány	Becsült pontosság ⁽¹⁾	Meglévő szabvány
Kofler-fűtőasztal	igen	nem	283 – > 573 K	± 1,0 K	ANSI ASTM D 3451-76
Olvadást vizsgáló mikroszkóp	igen	Csak néhány anyagra	273 – > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniszkusz módszer	nem	Specifikusan a poliamidokra	293 – > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Fagyási hőmérséklet-mérő módszerek	igen	igen	223 – 573 K	± 0,5 K	pl. BS 4695

⁽¹⁾ Független a készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától

C) Termikus analízis

Mérési módszer	Porítható anyagok	Nehezen porítható anyagok	Hőmérsékleti tartomány	Becsült pontosság ⁽¹⁾	Meglévő szabvány
Differenciál termoanalízis	igen	igen	173–1273 K	600 K-ig ± 0,5 K 1273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Differenciál-scanning kalorimetria	igen	igen	173–1273 K	600 K-ig ± 0,5 K 1273 K-ig ± 2,0 K	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Független a készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától

D) Folyáspont

Mérési módszer	Porítható anyagok	Nehezen porítható anyagok	Hőmérsékleti tartomány	Becsült pontosság ⁽¹⁾	Meglévő szabvány
Folyáspont	kőolajokra és olajszerű anyagokra	kőolajokra és olajszerű anyagokra	223–323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

⁽¹⁾ Független a készülék típusától és az anyag tisztaságának fokától

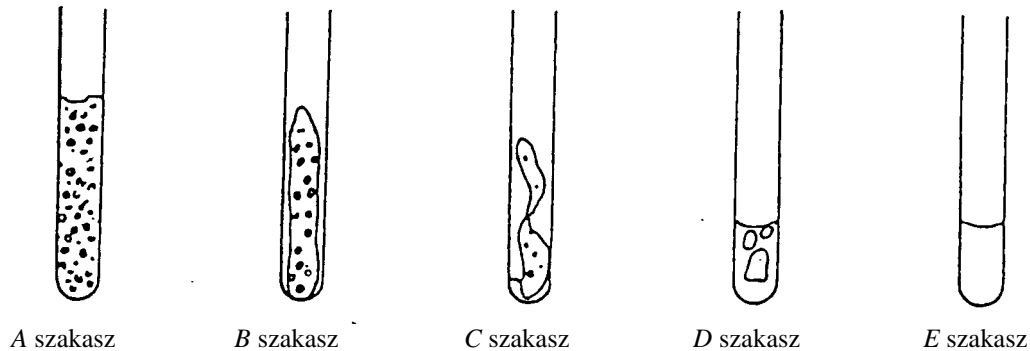
1.6. A módszerek leírása

Majdnem minden vizsgálati módszert nemzetközi és nemzeti szabványokban írnak le (lásd az 1. Függelékben).

1.6.1. Kapilláris csöves módszer

Amikor a kapilláris hőmérsékletét lassan emelik, a finoman porított anyagok rendszerint mutatják az olvadásnak az 1. ábrán bemutatott szakaszait.

1. ábra

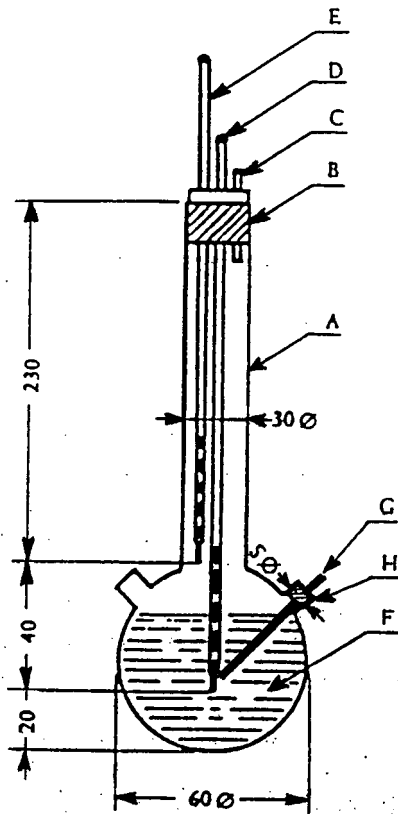


- A szakasz (az olvadás kezdete): finom cseppecskék tapadnak egyenletesen a kapilláris belső falához.
 B szakasz: térköz jelenik meg a minta és a belső fal között az olvadásnak tulajdonítható zsugorodás miatt.
 C szakasz: a zsugorodott minta kezd összeesni lefelé és elfolyósodni.
 D szakasz: teljes meniszkusz képződik a felszínen, de a minta értékelhető mennyisége szilárd marad.
 E szakasz (az olvadás befejező része): nincsenek szilárd szemcsék.

1.6.1.1. Olvadáspontot mérő folyadékfürdős készülék

A 2. ábra mutatja be a szabványosított (JIS K 0064), üvegből készült olvadáspontot mérő készüléket; valamennyi méret mm-ben van megadva.

2. ábra



- A: Mérőedény
 B: A mérőedény dugasza
 C: Szelelőnyílás
 D: Hőmérő
 E: Segédhőmérő
 F: Folyadékfürdő
 G: Üvegapilláris (hossza 80–100 mm, belső átmérője $1,0 \pm 0,2$ mm, falvastagsága 0,2–0,3 mm)
 H: A mérőedény oldalcsöve

Folyadékfürdő: alkalmas folyadékot kell kiválasztani; a választás függ a meghatározni kívánt olvadásponttól, például folyékony paraffin 473 K-nál, szilikonolaj 573 K-nál nem magasabb olvadáspontok meghatározásához használható. Az 523 K feletti olvadáspontok meghatározásához három tömegrész kénsavból és két tömegrész kálium-szulfátból álló keverék alkalmazható. E keverék használatakor a megfelelő óvrendszabályokat be kell tartani.

Hőmérő: csak olyan hőmérők használhatók, amelyek megfelelnek a következő vagy azokkal egyenértékű szabványoknak:

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

Eljárás

Mozsárban finomra őrlött száraz anyagot egyik végén leforrasztott kapillárisba helyezik úgy, hogy a töltési magasság mintegy 3 mm szoros tömörítés után. Az egyenlően tömörített minta eléréséhez a kapillárisokat kb. 700 mm magasból egy üvegcsőn át ejtik le függőlegesen egy óraiüvegre.

A megtöltött kapillárisokat úgy helyezik a fürdőbe, hogy a hőmérő higanygömbjének középső része a kapillárisal ott érintkezzen, ahol a minta található. A kapillárist rendszerint akkor helyezik a készülékbe, amikor a hőmérséklet mintegy 10 K-kal van az olvadási hőmérséklet alatt.

A folyadékfürdőt úgy melegítik, hogy a hőmérséklet emelkedése kb. 3 K/perc legyen. A folyadékot keverni kell. A várt olvadáspontnál mintegy 10 K-nel alacsonyabb hőmérsékletnél a hőmérséklet emelkedésének mértékét maximálisan 1 K/perc értékre kell beállítani.

Számítás – az olvadáspont kiszámítása a következő:

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

ahol

T = korrigált olvadáspont K-ben

T_D = a D hőmérőn leolvasott érték K-ben

T_E = az E hőmérőn leolvasott érték K-ben

n = a D hőmérő higanyoszlopán a fokbeosztások száma a folyadékfürdőből kiemelkedő részen.

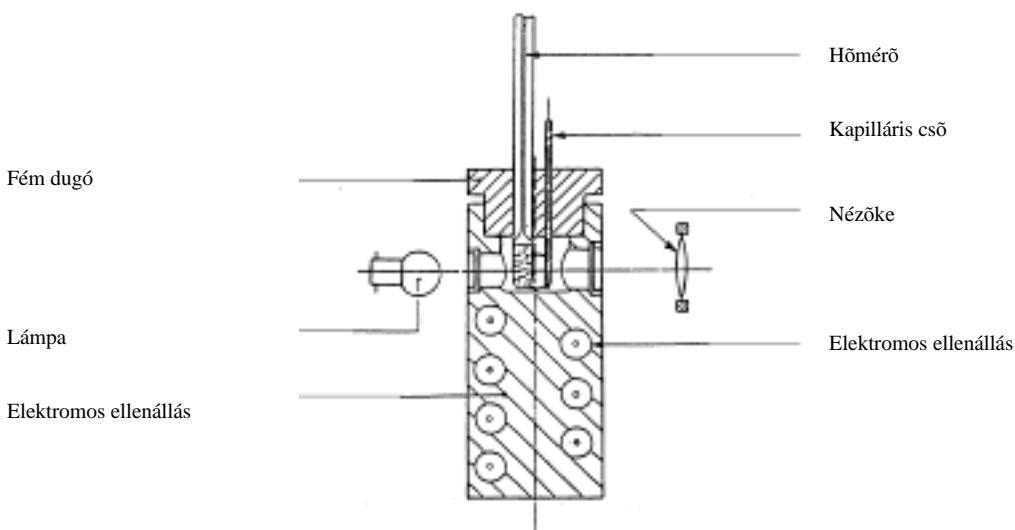
1.6.1.2. Fémblokkos olvadáspont-mérő

A készülék részei:

- hengeres fémblokk felső részén kamrát képező üreggel (lásd a 3. ábrát),
- fémdugasz egy vagy több nyílással, amelyek lehetővé teszik, hogy csöveket vezethessenek a fémblokkba,
- fűtőrendszer a fémblokk részére, amely például a blokkhoz csatolt elektromos ellenállás szolgáltat,
- reosztát a bemenő teljesítmény szabályozásához, ha elektromos fűtést alkalmaznak,
- négy, hőálló üvegből készült ablak a kamra oldalfalain derékszögű átlók végpontjában elhelyezve; az egyik ablak elé egy nézőkét szereltek fel a kapilláris megfigyelésére. A másik három ablakot az elkerített rész lámpákkal való világítására használják,
- hőálló üvegből készült, egyik végén zárt kapilláris (lásd az 1.6.1.1. pontban).

Hőmérő: lásd az 1.6.1.1. pontban említett szabványokat. Összehasonlítható pontosságú termoelektromos mérőeszközök szintén alkalmazhatók.

3. ábra



1.6.1.3. Fotocellás meghatározás

Készülék és eljárás

A készülék fémkamrából és automatizált fűtőrendszerből áll. Három kapillárist töltenek meg az 1.6.1.1. pontban leírtak szerint és helyeznek el a fűtött térben.

Többféle lineáris hőmérséklet-emelkedés érhető el a készülék kalibrálása céljára és az alkalmas hőmérséklet-emelkedést elektromosan állítják be az előre kiválasztott állandó és lineáris értékre. A regisztrálók a tényleges kemence-hőmérsékletet és a kapillárisokban lévő anyag hőmérsékletét mutatják.

1.6.2. Fűtőasztalok

1.6.2.1. Kofler-fűtőasztal

Lásd a Függelékét.

1.6.2.2. Olvadásvizsgáló mikroszkóp

Lásd a Függelékét.

1.6.2.3. Meniszkusz módszer (poliamidok)

Lásd a Függelékét.

A fűtés sebességének az olvadáspont hőmérsékletén kevesebbnek kell lennie 1 K/perc értéknél.

1.6.3. A fagyáspont meghatározásának módszerei

Lásd a Függelékét.

1.6.4. Termikus analízis

1.6.4.1. Differenciál termoanalízis

Lásd a Függelékét.

1.6.4.2. Differenciál scanning kalorimetria

Lásd a Függelékét.

1.6.5. A folyáspont meghatározása

Lásd a Függelékét.

2. ADATOK

A hőmérő korrigálása néhány esetben szükséges.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az alkalmazott módszer,
- az anyag pontos specifikációja (azonosítás, szennyeződések) és előzetes tisztítási foka, ha van
- a pontosság becslése.

Azt az átlagértéket kell olvadáspontként közölni, amely legalább két olyan mérésből származik, amely a becsült pontossági tartományban van (lásd a táblázatokat).

Ha a különbség az olvadás kezdeti és végső szakaszának hőmérséklete a módszer pontosságának határai között van, akkor a végső szakaszban kapott értéket kell az olvadáspontnak tekinteni, egyébként mind a két hőmérsékletet közölni kell.

Ha az anyag elbomlik vagy szublimál az olvadáspont elérése előtt, akkor azt a hőmérsékletet kell közölni, amelynél a hatás megfigyelhető.

A jelentésbe bele kell foglalni az összes lényeges információt és megjegyzést az eredmények értelmezéséhez, különösen az anyag szennyeződéseiről és fizikai állapotáról.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

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

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

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

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

FÜGGELÉK

További technikai információt a következő szabványok nyújtanak példaképpen:

*Kapilláris módszerek**1.1. Olvadáspont mérés folyadékfürdővel*

ASTM E 324-69 Standard test method for relative initial and final melting points and 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 Kapillarverfahren

JIS K 00-64 Testing methods for melting point of chemical products

1.2. Olvadási hőmérsékletet mérő fémblokk

DIN 53736 Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen

ISO 1218 (E) Plastics – polyamides – determination of 'melting point'

*Fûtőasztalok**2.1. Kofler-fûtőasztal*

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

2.2. Olvadásvizsgáló mikroszkóp

DIN 53736 Visuelle Bestimmung der Schmelztemperaturen von teilkristallinen Kunststoffen

2.3. Meniszkusz módszer (poliamidokhoz)

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

A fagyáspont meghatározó módszerek

BS 4633 Method for the determination of crystallizing point

BS 4695 Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve)

DIN 51421 Bestimmung des Grefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

ISO 2207 Cires de pétrole: détermination de la température de figeage

NT F 60-114 Point de fuion des paraffines

DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungpunktes von Fettsäuren

NF T 20-051 Méthode de détermination du point de crystallisation (point de congélation)

ISO 1392 Method for the determination of the freezing point

*4. Termikus analízis**4.1. Differenciál termoanalízis*

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Differenciál scanning-kalorimetria

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe

5. A folyáspont meghatározása

NBN 52014 Echantillonage et analyse des produits de pétrole: Point de trouble et point d'écurement limite – Monsterneming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloei-punt

ASTM D 97-66 Standard test method for pour point of petroleum oils

ISO 3016 Petroleum oils – Determination of pour point.

A.2. FORRÁSPONT

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az OECD Test Guideline-on alapul (1). Az alapelveket az irodalmi hivatkozások adják meg (2, 3).

1.1. Bevezetés

Az itt leírt módszerek és eszközök folyadékokra és alacsony olvadáspontú anyagokra alkalmazhatók azzal a feltétellel, hogy ezekkel nem következnek be kémiai reakciók (pl. autooxidáció, molekulán belüli átrendeződés, bomlás, stb.) a forrási hőmérsékleten. A módszerek tiszta és szennyezett folyadékoknál használhatók.

Szükséges hangsúlyozni a fotocellás meghatározás és a termikus analízis módszerének használatát, minthogy ezek a módszerek lehetővé teszik az olvadás, valamint a forráspontok meghatározását is, továbbá ezek a mérések automatizáltan végezhetőek.

A „dinamikus módszer” előnye az, hogy alkalmazható a gőznyomás meghatározásához is és nem szükséges a forráspontot a normál nyomásra korrigálni (101,325 kPa), minthogy normál nyomást be lehet állítani manosztát segítségével a mérés során.

Megjegyzések:

A forráspont meghatározásánál a szennyeződések befolyása nagymértékben függ a szennyeződés természetétől. Ha illékony szennyeződések vannak a mintában, amelyek befolyásolhatják az eredményeket, az anyag még tisztítható lehet.

1.2. Fogalom meghatározások és mértékegységek

A forráspontot úgy definiálják, mint azt a hőmérsékletet, amelynél a folyadék gőznyomása 101,325 kPa.

Ha a forráspontot nem normál atmoszférikus nyomáson mérik, akkor a gőznyomás hőmérséklet-függését a Clausius–Clapeyron egyenlet írja le:

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

ahol

p = az anyag gőznyomása Pascal-ban

ΔH_v = az anyag párolgáshője J mol⁻¹-ben

R = az egyetemes moláris gázállandó = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹-ben

T = termodinamikai hőmérséklet K-ben

A forráspontot a mérés idején mért légköri nyomás figyelembevételével adják meg.

Átszámítások:

Nyomás (mértékegységek: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(a 'bar' még megengedett, de nem ajánlott)

133 Pa = 1 Hgmm = 1 Torr

(a Hgmm és Torr mértékegységek nem megengedettek)

1 atm = standard atmoszféra = 101 325 Pa

(az atm mértékegység nem megengedett)

Hőmérséklet (mértékegység: K)

t = T – 273,15

t: Celsius hőmérséklet, Celsius fok (°C)

T: termodinamikai hőmérséklet, Kelvin (K)

1.3. Referencia anyagok

Új anyagok vizsgálatánál referencia anyagok használata nem minden esetben szükséges.

A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

Néhány kalibrációs anyag felsorolása a Függelékben megtalálható.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A forráspont (forrásponttartomány) meghatározásához öt módszer alapul a forráspont mérésén, két más módszer pedig a termikus analízisre épül.

1.4.1. Meghatározás ebuliométerrel

Az ebuliométereket eredetileg a molekula tömegnek a forráspont emelkedése által történő meghatározására fejlesztették ki, de alkalmas a forráspont pontos mérésére is. Az ASTM D 1120-72 nagyon egyszerű készüléket ismertet (lásd a Függelékben). A készülékben a folyadékot egyensúlyi körülmények között hevítik forrásig atmoszférikus nyomáson.

1.4.2. Dinamikus módszer

Ezzel a módszerrel a gőz kondenzációs hőmérsékletét mérik alkalmas hőmérővel a refluxban, miközben a folyadék forr. Ennél a módszernél a nyomás változtatható.

1.4.3. Desztillációs módszer a forráspont meghatározására

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

1.4.4. Siwoloboff-módszer

A mintát mintacsőben hevítik, amelyet a melegítő fürdő folyadékába merítenek. Az alján összeolvasztott, alsó részén légbuborékot tartalmazó kapillárist mártanak a mintacsőbe.

1.4.5. Fotocellás meghatározás

A Siwoloboff-elv szerint automatikus fotoelektromos mérést végeznek a felszálló buborékok felhasználásával.

1.4.6. Differenciál termoanalízis (DTA)

Ez a technika a hőmérsékleti különbségeket regisztrálja az anyag és a referencia anyag között a hőmérséklet függvényében, miközben a tesztanyagot és a referencia anyagot ugyanazzal az ellenőrzött hőmérsékleti programmal vizsgálják. Amikor a mintában az entalpia változásával járó átalakulás végbemegy, azt a hőmérsékleti görbe alapvonalától való endoterm eltérés (forrás) jelzi.

1.4.7. Differenciál scanning-kalorimetria (DSC)

Ez a technika a tesztanyag és a referencia anyag energia-inputjának különbségét regisztrálja a hőmérséklet függvényében, miközben a tesztanyagot és a referencia anyagot ugyanazzal az ellenőrzött hőmérsékleti programmal vizsgálják. A vizsgált energia az az energia, amely ahhoz szükséges, hogy a tesztanyag és a referencia anyag között a hőmérséklet különbsége zéró legyen. Amikor a mintában az entalpia változásával járó átalakulás végbemegy, azt a hőáramlási görbe alapvonalától való endoterm (forrás) eltérés jelzi.

1.5. Minőségi kritériumok

A forráspont/forráspont tartomány meghatározásához használt módszerek alkalmazhatóságát és pontosságát az 1. táblázat sorolja fel.

1. táblázat: A módszerek összehasonlítása

Mérési módszer	Becsült pontosság	Meglévő szabvány
Ebulliométer	$\pm 1,4$ K (373 K-ig) ⁽¹⁾⁽²⁾ $\pm 2,5$ K (600 K-ig) ⁽¹⁾⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dinamikus módszer	$\pm 0,5$ K (600 K-ig) ⁽²⁾	
Desztillációs eljárás (forrási tartomány)	$\pm 0,5$ K (600 K-ig)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboff-módszer	± 2 K (600 K-ig) ⁽²⁾	
Fotocellás meghatározás	$\pm 0,3$ K (373 K-nél) ⁽²⁾	
Differenciál termoanalízis	$\pm 0,5$ K (600 K-ig) $\pm 2,0$ K (1273 K-ig)	ASTM E 537-76
Differenciál scanning-kalorimetria	$\pm 0,5$ K (600 K-ig) $\pm 2,0$ K (1273 K-ig)	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Ez a pontosság csak olyan egyszerű készülékekre érvényes, amelyet például az ASTM D 1120-72 ír le; a pontosság bonyolultabb ebulliométerekkel növelhető.

⁽²⁾ Csak tiszta anyagokra érvényes. A módszer más körülmények között való felhasználását meg kell indokolni.

1.6. A módszerek leírása

Az egyes vizsgálati módszereket nemzetközi és nemzeti szabványokban írnak le (lásd a Függelékben).

1.6.1. Ebuliométer

Lásd a Függelékben.

1.6.2. Dinamikus módszer.

Lásd az A.4. vizsgálati módszert a gőznyomás meghatározásához. A 101,325 kPa nyomásnál megfigyelt forráspontot adja meg.

1.6.3. Desztillációs módszer (forrási tartomány)

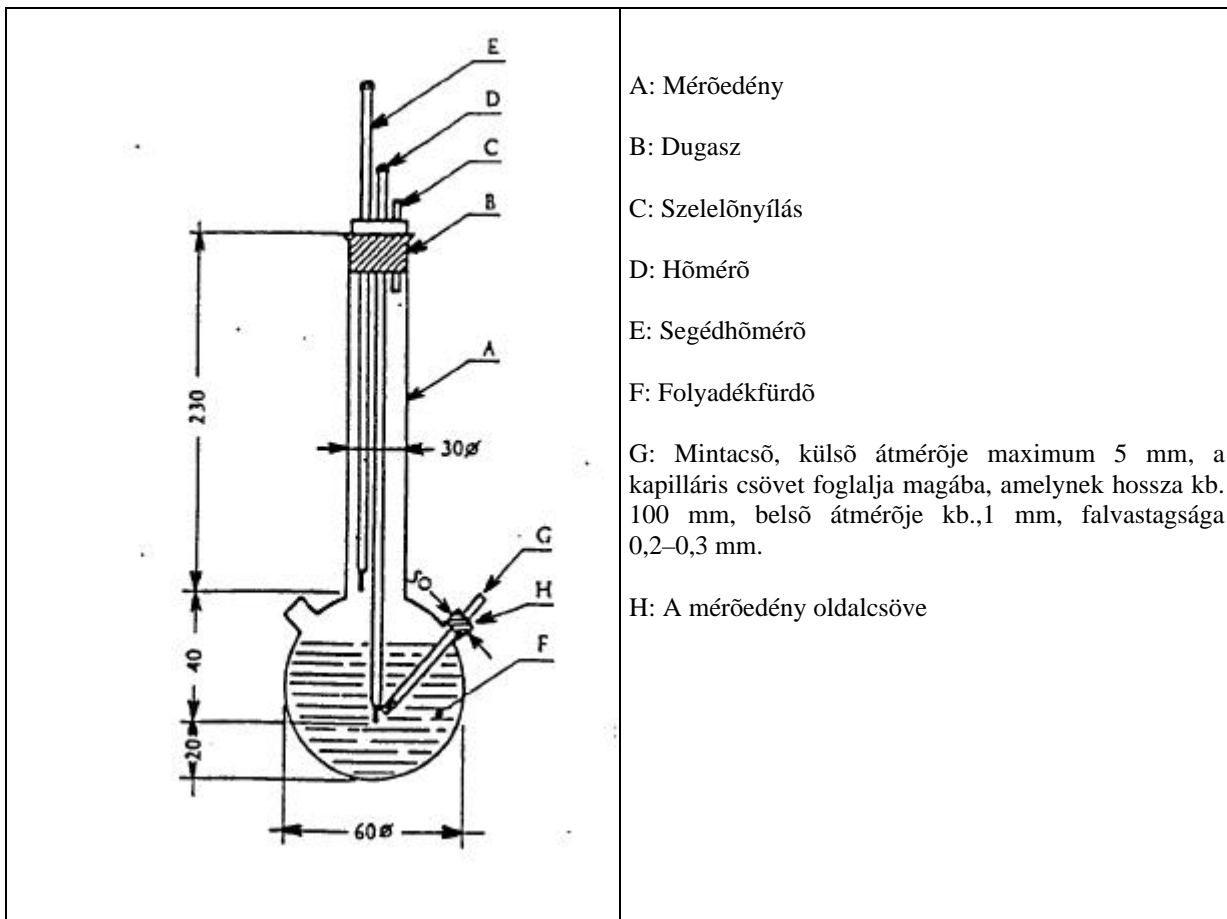
Lásd a Függelékben.

1.6.4. Siwoloboff-módszer

A mintát olvadáspontot meghatározó készülékben melegítik kb. 5 mm átmérőjű mintacsőben (1. ábra).

Az 1. ábra bemutatja a szabványosított (JIS K 0064) olvadás és forráspont készlektípust (üvegből készült; minden méret milliméterben van megadva).

1. ábra



A: Mérőedény

B: Dugasz

C: Szelelőnyílás

D: Hőmérő

E: Segédhőmérő

F: Folyadékfürdő

G: Mintacső, külső átmérője maximum 5 mm, a kapilláris csövet foglalja magába, amelynek hossza kb. 100 mm, belső átmérője kb.,1 mm, falvastagsága 0,2–0,3 mm.

H: A mérőedény oldalcsöve

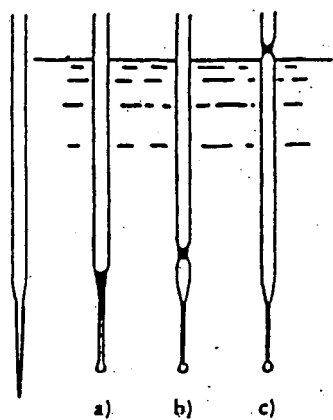
A kapillárist (forrási kapilláris), amely kb. 1 cm-rel az alsó vége felett van összeforrasztva, helyezik be a mintacsőbe. A tesztanyagot azon szintig adagolják, hogy a kapilláris leforrasztott szakasza a folyadék felszíne alatt legyen. A forrási kapillárist tartalmazó mintacsövet vagy a hőmérőhöz erősítik gumipánttal vagy oldalról rögzítik (lásd a 2. ábrát).

2. ábra



A Siwoloboff-elv

3. ábra



A módosított elv

A fűrdőfolyadékot a forráspont szerint kell megválasztani. 573 K hőmérsékletig szilikonolaj használható. Folyékony paraffin csak 473 K-ig alkalmazható. A folyadékfűrdő melegítését először úgy kell beállítani, hogy a hőmérséklet emelkedése 3 K/perc legyen. A fűrdőt keverni kell. Mintegy 10 K-nel a várt forráspont alatt a melegítést úgy csökkentik, hogy a hőmérséklet emelkedése 1 K/perc értéknél kisebb legyen. A forráspont közelében buborékok szállnak fel gyorsan a forrási kapillárisból.

A forráspont az a hőmérséklet, amelyen hirtelen hűlésre a buborékok lánc megáll és a folyadék hirtelen emelkedni kezd a kapillárisban. Az ennek megfelelő hőmérő-leolvasás az anyag forráspontja.

A módosított elv szerint (3. ábra) a forráspontot olvadáspontmérő kapillárisban határozzák meg. Ezt kinyújtják egy bizonyos ponton mintegy két cm hosszúságban (a) és a mintából kis mennyiséget szívnak fel. A finom kapilláris nyitott végét olvasztással zárják le úgy, hogy egy kis légbuborék van a végén. Amikor az olvadáspont mérő készüléket fűtik (b), a légbuborék térfogata megnő. A forráspont annak a hőmérsékletnek felel meg, amelyenél az anyagból álló „dugó” eléri a folyadékfűrdő felszínének szintjét (c).

1.6.5. Fotocellás meghatározás

A mintát kapillárisban melegítik fűtött fémblokkon belül.

Fénynyalábot irányítanak a blokkba alkalmas nyíláson át az anyagon keresztül a pontosan kalibrált fotocellára.

A minta hőmérsékletének emelkedése idején légbuborékok szállnak fel egyenként a forrási kapillárisból. Amikor a forráspont bekövetkezik, a légbuborékok száma jelentősen megnő. Ez változást idéz elő a fény intenzitásában, amelyet a fotocella érzékel és stopjelet ad le a kijelzőhöz, amely a blokkban lévő platina ellenállás-hőmérő hőmérsékletét jelzi.

Ez a módszer különösen hasznos, minthogy lehetővé teszi a meghatározásokat a szobahőmérséklet alatti hőmérsékleten 253,15 K-ig ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a készülék bármilyen megváltoztatása nélkül, a készüléket csupán hűtőfűrdőbe kell elhelyezni.

1.6.6. Termikus analízis

1.6.6.1. Differenciál termoanalízis

Lásd a Függelékét.

1.6.6.2. Differenciál scanning-kalorimetria

Lásd a Függelékét.

2. ADATOK

A normál nyomástól való csekély eltérés esetén (max. ± 5 kPa) a forráspontokat normalizálják T_n -re a következő egyenlettel Sydney és Young szerint:

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

ahol :

$$\Delta p = 101,325 - p$$

p= nyomásérték kPa-ban

f_T = a forráspont változásának mértéke a nyomással K/kPa-ban

T = mért forrási hőmérséklet K-ben

T_n = a normál nyomásra korrigált forráspont K-ben

A hőmérsékleti korrekciós faktorokat, a f_T -t és a megközelítésükhöz az egyenleteket a már említett nemzetközi és nemzeti szabványok sok anyagra tartalmazzák.

Például a DIN 53171 módszer közli a következő durva korrekciókat az oldószerekre, ideértve a festékekben lévőket is:

2. táblázat: Hőmérséklet-korrekciós faktorok (f_i)

Hőmérséklet – T (K)	Korrekciós faktor – f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az alkalmazott módszer,
- az anyag pontos specifikációja (azonosítás, szennyeződések) és előzetes tisztítási foka, ha van
- a pontosság becslése.

Azt az átlagértéket kell forráspontként megadni, amely legalább két olyan mérésből származik, amely a becsült pontossági tartományban van (lásd az 1. táblázatot).

A mért forráspontokat és átlagaikat, valamint azt a nyomásértéke(ke)t kell kPa-ban megadni, amelynél a mérést végezték. A nyomásnak minél közelebbnek kell lenni a normál atmoszférikus nyomáshoz.

A jelentésbe bele kell foglalni az összes olyan információt és megjegyzést, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire és fizikai állapotára.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 103, Decision of th Council C(81) 30 final.
- (2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental Thermodynamics, Butterworth, London 1975, vol. II.
- (3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I. Part I, Chapter VIII.

FÜGGELÉK

További technikai információt a következő szabványok nyújtanak példaképpen:

1. Ebuliométer

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

2. Desztillációs eljárások (forrási tartomány)

ISO/R 918 Test Method for Distillation (Distillation Yield and Distillation Range)

BS 4349/68 Method for determination of distillation of petroleum products

BS 4591/71 Method for determination of distillation characteristics

DIN 53171 Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverlaufes

NF T 20-608 Distillation: détermination de rendement et de l'intervalle de distillation

3. Differenciál termoanalízis és differenciál scanning-kalorimetria

ASTM E 537-76 Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis

ASTM E 473-85 Standard definitions of terms relating to thermal analysis

ASTM E 472-86 Standard practice for reporting thermoanalytical data

DIN 51005 Thermische Analyse, Begriffe

A.3. RELATÍV SŰRŰSÉG

1. MÓDSZER

A leírt módszerek az OECD Test Guideline-on alapulnak (1). Az alapelveket szakirodalmi hivatkozások adják meg (2, 3).

1.1. Bevezetés

A relatív sűrűség meghatározásához leírt módszerek szilárd és folyékony anyagokra alkalmazhatók; nincsenek megszorítások az anyagok tisztasági fokát illetően. A különböző felhasznált módszereket az 1. táblázat sorolja fel.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

A szilárd vagy folyékony anyagok relatív sűrűsége – D_4^{20} – arányszám a vizsgált anyag 20 °C-on meghatározott tömegének és térfogatának hányadosa, valamint az azonos térfogatú víz 4 °C-on mért tömege között. A relatív sűrűségnek nincs dimenziója.

A sűrűség – ρ – az anyag tömegének – m – és térfogatának – v – hányadosa.

A sűrűséget – ρ – SI-egységekben, kg/m³-ben adják meg.

1.3. Referencia anyagok

Új anyagok vizsgálatánál referencia anyagok alkalmazása nem minden esetben szükséges. A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A módszerek elve

A módszerek négy osztálya használatos.

1.4.1. A felhajtóerőn alapuló módszerek

1.4.1.1. Hidrométer (folyékony anyagokhoz)

A sűrűség elégségesen pontos és gyors meghatározása úszó hidrométerekkel érhető el, amelyek lehetővé teszik azt, hogy a folyadék sűrűségére következtessenek a merülési mélységből a fokokra osztott skála leolvasása alapján.

1.4.1.2. Hidrosztatikus mérleg (folyékony és szilárd anyagokhoz)

A tesztminta sűrűségének a meghatározásához a levegőben és alkalmas folyadékban (pl. víz) mért tömegének a különbsége használható.

Szilárd anyagoknál a mért sűrűség csak az adott mintát reprezentálja. Folyadékok a sűrűségének meghatározásához az ismert térfogatú tömeget először levegőben, aztán a folyadékban mérjük.

1.4.1.3. Merülő test módszere (folyékony anyagokhoz) (4)

A módszerben a folyadék sűrűségét egy testnek a test folyadékba való bemelegítése előtti és utáni tömegéből határozzák meg.

1.4.2. Piknométeres módszerek

Szilárd és folyékony anyagoknál különféle formájú és ismert térfogatú piknométerek használhatók. A sűrűséget a megtöltött és az üres piknométer tömegkülönbségéből és a piknométer ismert térfogatából számítják.

1.4.3. Levegő-összehasonlítású piknométer (szilárd anyagokhoz)

A szilárd anyagok bármely formájának sűrűsége szobahőmérsékleten gáz-összehasonlítású piknométerrel mérhető. Az anyag térfogatát levegőben vagy inert gázban mérik, különféle térfogatra kalibrálható hengerben. A sűrűség számításához tömegmérést végeznek a térfogatmérés befejezése után.

1.4.4. Oszcillációs denzitométer (5), (6), (7)

A folyadékok sűrűsége oszcillációs denzitométerrel mérhető. U-cső alakúra szerkesztettek mechanikus oszcillátort olyan rezonancia-frekvenciára, amely függ a tömegétől. A minta behelyezésekor az oszcillátor rezonancia-frekvenciája megváltozik. A készüléket két, ismert sűrűségű folyékony anyaggal kell kalibrálni. Ezeket az anyagokat úgy célszerű kiválasztani, hogy sűrűségük a mérendő tartományban legyen.

1.5. Minőségi kritériumok

A relatív sűrűség meghatározásánál különféle módszerek alkalmazhatóságát a táblázat sorolja fel.

1.6. A módszerek leírása

A szabványokat példaként adják meg, ezek további technikai információkkal szolgálnak és a Függelékben található.

A vizsgálatot 20 °C-on, legalább két méréssel kell végezni.

2. ADATOK

Lásd a szabványokat.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az alkalmazott módszer,
- az anyag pontos specifikációja (azonosítás, szennyeződések) és előzetes tisztítási foka, ha van.

A relatív sűrűséget – D_4^{20} – úgy kell megadni, ahogyan az 1.2. pont definiálja a tesztanyag fizikai állapota szerint.

A jelentésbe bele kell foglalni az összes olyan információt és megjegyzést, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire és fizikai állapotára.

1. táblázat: A módszerek alkalmazhatósága

Mérési módszer	Sűrűség		Maximális lehetséges dinamikus viszkozitás	Meglévő szabványok
	szilárd anyag	folyadék		
1.4.1.1. Areométer		igen	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2. Hidrosztatikus mérleg (a) szilárd anyagok (b) folyadékok	igen	igen	5 Pa s	ISO 1183 (A) ISO 901 és 758
1.4.1.3. Merülő test módszere		igen	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2. Piknométer (a) szilárd anyagok (b) folyadékok	igen	igen	500 Pa s	ISO 3507 ISO 1183 (B) NF T 20-053 ISO 758
1.4.3. Levegő-összehasonlításos módszer	igen			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4. Oszcillációs denzitométer		igen	5 Pa s	

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, Decision of th 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 IV.
- (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.

FÜGGELÉK

További technikai információt a következő szabványok nyújtanak példaképpen:

1. A felhajtóerőn alapuló módszerek

1.1. Hidrométer

DIN 12790, ISO 387 Hydrometer; general instructions

DIN 12791 Part I: Density hydrometers; construction adjustment and use

Part II: Density hydrometers; standardized sizes, designation

Part III: Use and test

ISO 649-2 Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose

NF T 20-050 Chemical products for industrial use – Determination of density of liquids – Aerometric method

DIN 12793 Laboratory glassware: range find hydrometers

1.2. Hidrosztatikus egyensúly

Szilárd anyagokhoz

ISO 1183 Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-049 Chemical products for industrial use – Determination of density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method

ASTM-D 792 Specific gravity and density of plastics by displacement

DIN 53479 Testing of plastics and elastomers; determination of density

Folyékony anyagokhoz

ISO 901 ISO 758

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

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

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

BS 4714 Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Merített test módszer

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

Piknométeres módszerek

2.1. Folyékony anyagokhoz

ISO 3507 Pycnometers

ISO 758 Liquid chemical product; determination of density at 20 °C

DIN 12797 Gay-Lussac pycnometer (nem illékony és nem erősen viszkózus folyadékokhoz)

DIN 12798 Lipkin pycnometer ($100 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ -nél kisebb kinematikus viszkozitású folyadékokhoz 15 °C-on)

DIN 12800 Sprengel pycnometer (olyan folyadékokhoz, amelyekre a DIN 12798 érvényes)

DIN 12801 Reischauer pycnometer ($100 \times 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ -nél kisebb kinematikus viszkozitású folyadékokhoz (20 °C-on), főleg szénhidrogénekhez és vizes oldatokhoz, valamint olyan folyadékokhoz, amelyek gőznyomása magasabb, kb. 1 bar 90 °C-nál)

DIN 12806 Hubbard pycnometer (valamennyi típusú viszkózus folyadékhoz, amelyeknek nem túl magas a gőznyomása, főként festékekhez, lakkokhoz és bitumenhez)

DIN 12807 Bingham pycnometer (olyan folyadékokhoz, amelyekre a DIN 12801 érvényes)

DIN 12808 Jaulmes pycnometer (főleg etanol-víz elegyhez)

DIN 12809 Pycnometers with ground in thermometer and capillary side tube (nem erősen viszkózus folyadékokhoz)

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 (fokbeosztásos kétkapilláris piknométeres módszer)

BS 5903 Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method

NF T 20-053 Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method

2.2. Szilárd anyagokhoz

ISO 1183 Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics

NF T 20-053 Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pycnometric method

DIN 19683 Determination of density of soils

3. Levegő összehasonlítású piknométer

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

DIN 53243 Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

A.4. GŐZNYOMÁS

1. MÓDSZER

A leírt módszerek többsége az OECD Test Guideline-on alapul (1). Az alapelveket az irodalmi hivatkozások adják meg (2, 3).

1.1. Bevezetés

A vizsgálathoz hasznos az előzetes információ az anyag szerkezetéről, olvadás és forráspontjáról.

Nincs egyetlen olyan mérési eljárás sem, amely alkalmazható lenne a gőznyomások teljes tartományában, ezért több módszer ajánlható a gőznyomás mérésére a Táblázatból $< 10^{-4}$ -tól 10^5 Pa-ig.

A szennyeződések rendszerint befolyásolják a gőznyomást és ennek mértéke nagymértékben függ a szennyeződés fajtájától.

Ha illékony szennyeződések vannak a mintában, amelyek befolyásolhatják az eredményeket, az anyagot tisztítani kell. Az is alkalmas lehet, hogy közlik a technikai tisztaságú anyag gőznyomását.

Néhány itt leírt módszerben fémalkatrészeket tartalmazó készüléket használnak, ezt a korrozív anyagok vizsgálata során figyelembe kell venni.

1.2. Fogalom meghatározások és mértékegységek

Az anyag gőznyomását a szilárd vagy folyékony anyag feletti telítettségi nyomásként definálják. Termodinamikai egyensúly esetén a tiszta anyag gőznyomása csak a hőmérséklet függvénye.

A nyomás SI-egységeként a Pascalt (Pa) kell használni.

A korábban használatos egységek – a konverziós faktorokkal együtt – a következők:

1 Torr (= 1 Hgmm)	= $1,333 \times 10^2$ Pa
1 atmoszféra	= $1,013 \times 10^5$ Pa
1 bar	= 10^5 Pa

A hőmérséklet SI-egysége a kelvin (K)

Az egyetemes gázállandó, $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

A gőznyomásnak a hőmérséklettől való függését a Clausius-Clapeyron egyenlet írja le:

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

ahol

P = az anyag gőznyomása Pa-ban

ΔH_v = az anyag párolgáshője J mol^{-1} -ban

R = az egyetemes gázállandó $\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ -ban

T = a termodinamikai hőmérséklet K-ban

1.3. Referencia anyagok

Új anyagok vizsgálatánál referencia anyagok alkalmazása nem minden esetben szükséges. A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy lehetővé tegyék az összehasonlítást a más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A vizsgálati módszerek elve

A gőznyomás meghatározásához hét módszer javasolt, amelyek különféle gőznyomás tartományban alkalmazhatók. A gőznyomást minden egyes módszernél különböző hőmérsékleteken határozzák meg. Egy meghatározott hőmérsékleti tartományban a tiszta anyag gőznyomásának logaritmus a hőmérséklet lineáris inverz függvénye.

1.4.1. Dinamikus módszer

A dinamikus módszerben a forráspont az, amelyet specifikus nyomásértéknél mérnek.

Ajánlott mérési tartomány: 10^3 – 10^5 Pa

A módszer normál forráspont meghatározásához is ajánlott és erre a célra 600 K-ig használatos.

1.4.2. Statikus módszer

A statikus eljárásban a termodinamikai egyensúlynál a gőznyomást zárt rendszerben állapítják meg meghatározott hőmérsékleten. Ez a módszer egy- és többkomponensű szilárd anyagokhoz és folyadékokhoz egyaránt alkalmas.

Ajánlott mérési tartomány: 10 – 10^5 Pa

Megfelelő óvatossággal a módszer 1 – 10 Pa-os tartományban is használható.

1.4.3. Izoteniszkóp

A standardizált módszer szintén statikus eljárás, de rendszerint nem alkalmas többkomponensű rendszerekhez. További információ az ASTM method D-2879-86-ban áll rendelkezésre.

Ajánlott mérési tartomány: 100 – 10^5 Pa

1.4.4. Effúziós módszer – gőznyomás-mérleg

A cellából időegység alatt egy ismert méretű nyíláson távozó anyag mennyiségét határozzák meg vákuumban úgy, hogy az anyag visszatérése a cellába elhanyagolható (pl. a mérést érzékeny mérlegen impulzust generálva a gözlkéssel vagy a tömegvesztés mérésével végzik).

Ajánlott mérési tartomány: 10^{-3} – 1 Pa

1.4.5. Effúziós módszer – a tömegvesztés vagy a felfogott gőz mérése

A módszer annak a tesztanyag tömegnek a becslésén alapul, amely az időegység alatt áramlik ki a Knudsen-cellából gőz formájában egy mikro-nyíláson át az ultra-vákuum körülményei között. A kiáramló gőz tömegét megkaphatják úgy, hogy a cella tömegvesztését határozzák meg, vagy a gőzt alacsony hőmérsékleten kondenzálják és elpárolgott anyag mennyiségét kromatográfiai módszerrel határozzák meg. A gőznyomást a Herty-Knudsen féle összefüggés alkalmazásával számítják ki.

Ajánlott mérési tartomány: 10^{-3} – 1 Pa

1.4.6. Gázszaturációs módszer

Inert vivőgáz árama halad át az anyagon, és ilyen módon a gáz telítődik az anyag gőzével. Az ismert mennyiségű vivőgáz által átvitt anyag mennyisége mérhető megfelelő csapdában való gyűjtéssel vagy in-train analitikai technika alkalmazásával.

Ajánlott mérési tartomány: 10^{-4} – 1 Pa

Megfelelő óvatossággal a módszer 1 – 10 Pa-os tartományban is használható.

1.4.7. Pörgő rotoros eljárás

Egy pörgő rotor eszközben a tényleges mérőelem egy kisméretű acélgolyó, amelyet mágneses tér függeszt fel és nagy sebességgel forog. A gőznyomás az acélgolyó nyomásfüggő lassulásából vezethető le.

Ajánlott mérési tartomány: 10^{-4} – $0,5$ Pa

1.5. Minőségi kritériumok

A gőznyomást meghatározó különféle módszereket hasonlítva össze a következő táblázat az alkalmazhatóság, ismételhetőség, reprodukálhatóság, mérési tartomány, illetve a meglévő szabványok szerint.

Minőségi kritériumok

Mérési módszer	Anyag		Becsült ismételhetőség ⁽¹⁾	Becsült reprodukálhatóság ⁽¹⁾	Ajánlott tartomány	Meglévő szabvány
	szilárd	folyékony				
1.4.1. Dinamikus módszer	alacsony olvadási hőmérsékletű	igen	max. 25% 1–5%	max. 25% 1–5%	10 ³ Pa – 2 x 10 ³ Pa 10 ³ Pa – 10 ⁵ Pa	– –
1.4.2. Statikus módszer	igen	igen	5–10%	5–10%	10 Pa – 10 ⁵ Pa ⁽²⁾	NFT 20-048 (5)
1.4.3. Izoteniszkóp	igen	igen	5–10%	5–10%	10 ² Pa – 10 ⁵ Pa	ASTM-D 2879-86
1.4.4. Effúziós módszer – göznyomás-mérleg	igen	igen	5–20%	max. 50%	10 ⁻³ Pa – 1 Pa	NFT 20-047 (6)
1.4.5. Effúziós módszer súlyvesztéses	igen	igen	10–30%	–	10 ⁻³ Pa – 1 Pa	–
1.4.6. Gázszaturáció módszere	igen	igen	10–30%	max. 50%	10 ⁻⁴ Pa – 1 Pa ⁽²⁾	–
1.4.7. Pörgő rotoros módszer	igen	igen	10–20%	–	10 ⁻⁴ Pa – 0,5 Pa	–

⁽¹⁾ Az anyag tisztaságától függően.

⁽²⁾ Ezek a módszerek 1–10 Pa között is használhatók kellő óvatossággal.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Dinamikus mérés

1.6.1.1. Készülék

A mérőkészülék részei szokványos esetben a következők: az üvegből vagy fémből készült forraló edény, amelyhez hűtő csatlakozik (1. ábra), a hőmérsékletmérő eszköz, továbbá a nyomás mérésére és szabályozására szolgáló eszköz. A rajzon látható tipikus mérőkészülék hőálló üvegből készült és öt részből áll.

A nagy, részben kettősfalú cső köpenyből, hűtőből, hűtőedényből és bemeneti nyílásból áll.

A Cottrell-szivattyús üveghengert a cső forraló szakaszában szerelték fel, a felszínét durva üvegreszeléssel vonták be azért, hogy elkerüljék a túlhevülést a forrási folyamatban.

A hőmérsékletet megfelelő hőmérséklet-érzékelővel mérik (pl. ellenállás-hőmérő, termoelem), amely a mérés pontján merül a készülékbe (5. jelzésű az 1. ábrán) egy alkalmas bemeneten át.

A nyomásszabályozó és mérő eszközhöz meg kell teremteni a szükséges csatlakozásokat.

A gömblombik, amely térfogat-kiegyenlítőként működik, egy kapillárison keresztül csatlakozik a mérőkészülékhez.

A forraló edényt a fűtőelemmel melegítik (pl. fűtőrúd), amelyet az üvegekészülék alá helyeznek. A fűtőáramot termoelemmel állítják be, illetve szabályozzák.

A szükséges vákuumot 10² Pa és kb. 10⁵ Pa között vákuumszivattyúval állítják elő.

A levegő vagy nitrogén méréséhez megfelelő szelepet kell használni a nyomás szabályozására (mérési tartomány: 10²–10⁵ Pa) és a légcserére.

A nyomást manométerrel mérik.

1.6.1.2. A mérési eljárás

A göznyomást a minta forráspontjának meghatározásával mérik meghatározott nyomásértékek mellett, nagyjából 10³ és 10⁵ Pa között. Az állandó hőmérséklet az állandó nyomás mellett azt jelzi, hogy a forráspontot már elérték. Habzó anyagok mérésére ez a módszer nem használható.

Az anyagot tiszta, száraz mintaedényben helyezik el. Nehézségek adódhatnak a nem por állagú szilárd anyagokkal, de ezeket néha a hűtőköpeny melegítésével megoldják. Az edény megtöltése után a készüléket a pereménél

lezárlják és az anyagot gázmentesítik. A legalacsonyabb kívánt nyomást azután beállítják és a fűtést bekapcsolják. Egyidejűleg a hőmérséklet-érzékelőt a regisztrálóhoz csatlakoztatják.

Az egyensúly akkor áll be, amikor konstans forráspontot mérnek konstans nyomáson.

Különös figyelmet kell fordítani a túlhevülés elkerülésére forralás közben, továbbá, hogy teljes kondenzáció jöjjön létre a hűtőn. Amikor meghatározzák egy alacsony olvadáspontú szilárd anyag gőznyomását, ügyelni kell arra, hogy a hűtő eldugulását elkerüljék.

Az egyensúlyi pont regisztrálása után magasabb nyomást állítanak be. Az eljárást ilyen módon folytatják 10^5 Pa eléréséig (kb. 5–10 mérési pont összesen). Ellenőrzésképpen az egyensúlyi pontokon a mérést meg kell ismételni csökkenő nyomásértékeknél.

1.6.2. Statikus mérés

1.6.2.1. Készülék

A készülék a minta hőmérsékletének a szabályozására és a hőmérséklet mérésére mintatartót, fűtő- és hűtőrendszert tartalmaz. A készülék magába foglalja a nyomás mérésére és beállítására szolgáló eszközt is. Az elveket a 2a és 2b ábrák illusztrálják.

A mintakamra (2a ábra) egyik oldalán megfelelő vákuumszeleppel van összekötve. Egy U-cső tartalmazza az alkalmas manométer-folyadékot és ez csatlakozik a mintakamra másik oldalához. Az U-cső egyik vége ágazik el a vákuumszivattyú, a nitrogénpalack, a ventilációs szelep és a manométer felé.

Egy kijelzős nyomásmérő is használható az U-cső helyett (2b ábra).

A minta hőmérsékletének a szabályozására a szelepes mintaedényt, az U-csövet vagy a nyomásmérőt az állandó hőmérsékletű ($\pm 0,2$ K) fürdőbe helyezik el. A hőmérséklet mérését a mintaedény külső falán vagy magában az edényben végzik.

A készülék evakuálásához felszálló hűtőcsapdával ellátott vákuumszivattyút használnak.

A 2a módszerben anyag gőznyomását indirekt módon, zéró-indikátor alkalmazásával mérik. Az eljárás azt a tényt veszi figyelembe, hogy az U-csőben lévő folyadék sűrűsége változik a hőmérséklet jelentős változásával.

Zéró-indikátorként az U-csőbe alkalmas folyadékok a szilikonok és a ftalátok; az alkalmasság függ a nyomástartománytól és a tesztanyag kémiai viselkedésétől. A tesztanyagnak nem szabad feloldódnia vagy reagálnia az U-cső folyadékával.

A manométerbe higanyt használnak a normál légnyomástól a 10^2 Pa-ig terjedő tartományban, viszont a szilikon-folyadékok és a ftalátok használhatók a 10^2 Pa alatti tartományban 10 Pa-ig. Fűthető membrán manométerek még 10^{-1} Pa alatti tartományban is alkalmazhatók. Létezik más nyomásmérő is, amit lehet 10^2 Pa alatti tartományban használni.

1.6.2.2. Mérési eljárás

A mérés előtt a 2. ábrán bemutatott készülék valamennyi részegységét meg kell tisztítani és alaposan meg kell szárítani.

A 2a módszerrel a kiválasztott folyadékot az U-csőbe töltik, amelyet a leolvasás előtt magasabb hőmérsékleten gáztalanítani kell.

A tesztanyagot a készülékbe helyezik, amelyet aztán lezárnak és a hőmérsékletét elégségesen csökkentik a gáztalanításhoz. A hőmérsékletnek elég alacsonynak kell lennie, hogy biztosítani lehessen a gázmentesítést, de nem szabad, hogy – főleg a sok elemből álló rendszerben – az összetétel megváltozzék. Szükség esetén az egyensúly beállítását keveréssel lehet gyorsítani.

A mintát ezután igen erősen hűtik, pl. folyékony nitrogénnel (ügyelni kell közben a levegő vagy a szivattyúfolyadék, illetve a levegő kondenzációjának elkerülésére) vagy etanol és száraz jég elegyével. Az alacsony hőmérsékleten végzett mérésekhez olyan hőmérsékletszabályozott fürdőt kell használni, amely egy ultra-kriomattal van összekapcsolva.

A mintaedény feletti szelep nyitásával szívást alkalmaznak több percen keresztül a levegő eltávolítására. A szelepet ezután zárják és a minta hőmérséklete a kívánt legalacsonyabb szintre süllyed. Ha szükséges, a gáztalanítást többször meg kell ismételni.

Ha a mintát melegítik, a gőznyomás megnő. Ez megváltoztatja az egyensúlyt az U-csőben lévő folyadékban. Hogy ezt kompenzálják, nitrogént vagy levegőt engednek be a készülékbe egy szelepen át, amíg a nyomásjelző folyadék ismét zérót nem mutat. Az ehhez megkívánt nyomás szobahőmérsékleten precíziós manométeren olvasható le. Ez a nyomás felel meg az anyag gőznyomásának az adott mérési hőmérsékleten.

A 2b módszer hasonló, de a gőznyomást közvetlenül olvassák le.

A gőznyomás hőmérséklettől való függését alkalmas kis intervallumokban határozzák meg (közelítőleg 5–10 mérési pont összesen) a kívánt maximumig. Az alacsony hőmérsékleti leolvasásokat ellenőrzésképpen meg kell ismételni.

Ha az ismételt leolvasásokból kapott értékek nem esnek egybe azzal a görbével, amelyet a hőmérséklet növelésekor kaptak, akkor ez a következők egyikének tulajdonítható:

1. A minta még mindig tartalmaz levegőt (pl. magas viszkozitású anyagok) vagy alacsony forráspontú anyago(ka)t, amely(ek) felszabadul(nak) a melegítés folyamán és ezek eltávolíthatók szívással a következő túlhűtésig.
2. A hűtési hőmérséklet nem elég alacsony. Ebben az esetben hűtőanyagként folyékony nitrogént használnak.
3. Az anyag kémiai változáson megy keresztül a vizsgált hőmérsékleti tartományban (pl. bomlás, polimerizáció).

1.6.3. Izoteniszkóp

A módszer teljes leírása a 7. irodalmi hivatkozásban található meg.

A mérőeszköz elvét a 3. ábra mutatja be.

Hasonlóan az 1.6.2. pontban leírt statikus módszerhez, az izoteniszkóp is alkalmas szilárd vagy folyékony anyagok vizsgálatához.

Folyadékoknál az anyag maga a segédmanométer folyadék. Azt a folyadékmennyiséget helyezik el, amely elegendő a gömb és a manométer szakasz rövid szárának feltöltéséhez. Az izoteniszkópot vákuumrendszerrel kötik össze, légtelenítik, majd nitrogénnel töltik fel. A maradék oxigén eltávolítására a légtelenítést és a rendszer tisztítását kétszer megisméltik. A feltöltött izoteniszkópot vízszintes helyzetbe helyezik úgy, hogy a minta vékony rétegben terjedjen a mintagömbben és a manométer-szakaszban (U-rész). A rendszer nyomását 133 Pa-ra csökkentik és a mintát óvatosan melegítik, amíg éppen forr (az oldott megkötött gázok eltávolítása). Az izoteniszkópot ezután úgy helyezik el, hogy a minta visszatérjen a gömbbe és a manométer rövid szárába és mind a két rész teljen meg a folyadékkal. A nyomást a gáztalanításhoz fenntartják; a mintagömb kihúzott végét kis lánggal melegítik addig, amíg a minta felszabadult gőze eléggé kiterjed ahhoz, hogy elmozdítsa a mintarészt a gömb felső részéből, valamint a manométerkart az izoteniszkóp manométer-szekciójában és gőzzel telt, nitrogénmentes tér jön létre.

Az izoteniszkópot aztán állandó hőmérsékletű fürdőbe helyezik és a nitrogén nyomását úgy állítják be, hogy a nyomás a minta nyomásával egyenlő legyen. A nyomás egyensúlyát az izoteniszkóp manométer-szakasza jelzi. Egyensúly esetén a nitrogén göznyomása egyenlő az anyag göznyomásával.

Szilárd anyagoknál – a nyomás- és hőmérséklet-tartománytól függően – az 1.6.2.1. pontban felsorolt manométer-folyadékokat használják. A gáztalanított manométer-folyadékot az izoteniszkóp hosszú karjának kiöblösödésébe töltik. Aztán a vizsgálni kívánt szilárd anyagot a gömbbe helyezik és magasabb hőmérsékleten gáztalanítják. Azután az izoteniszkópot megdöntik úgy, hogy a manométer folyadék az U-csőbe áramolhasson. A göznyomás mérése a hőmérséklet függvényeként az 1.6.2. pont szerint megy végbe.

1.6.4. Effúziós módszer: göznyomásmérés mérleggel

1.6.4.1. Készülék

A szakirodalom (1) különféle típusú készülékeket ismertet. Az itt leírt készülék illusztrálja az általános elvet (4. ábra). Az ábra bemutatja a készülék fő komponenseit, ezek a következők: rozsdamentes acélból vagy üvegből készült vákuumtartály, vákuumot létrehozó és mérő eszköz, beépített készülék az egyensúlyi göznyomás mérésére. A beépített komponensek közé tartoznak a készülékben az alábbiak:

– Párolgató kemence peremmel és forgó bemenettel – Az elpárolgató hengeres edény rézből vagy kémiailag ellenálló, jó hővezető-képességű ötvözetből áll. Rézfalu üvegedényt is lehet használni. A kemence átmérője kb. 3–5 cm és 2–5 cm magas, és 1–3 különböző méretű nyílása van a gőzátáramlás változtatására. A kazánt az alatta elhelyezett lemeztől vagy kívülről spirállal fűtik. Hogy a hővesztés elkerüljék, a fűtőlap alacsony hővezető-képességű fémmel (pl. nikkel-ezüst vagy króm-nikkel acél) csatlakozik az alaplaphoz, pl. nikkel-ezüst cső kapcsolódik a forgó bemenethez, ha a kazánnak több nyílása van. Ez az elrendezés előnyös, mert így egy rézrúd behelyezhető, amely kívülről egy hűtőfürdőről a hűtést lehetővé teszi.

– A rézkazán fedelének három különböző átmérőjű nyílása van és az átmérők egymással 90°-ot zárnak be, különböző göznyomás-tartományok mérhetők a teljes mérési tartományon belül (a nyílások 0,30 és 4,50 mm közötti átmérőjűek). Az alacsony nyomásoknál nagy nyílásokat használnak, és viszont. A forgatással a kazán a kívánt nyitása vagy átmeneti helyzete beállítható az áramlásban (kazánnyílás – pajzs – mérlegserpenyő) és a molekulák áramlása szabaddá válik, vagy eltérő irányt vesz fel a kazán nyílásán keresztül a mérlegserpenyőre. Az anyag hőmérsékletének mérésére egy termoelemet vagy ellenállás-hőmérőt helyeznek el az alkalmas ponton.

– A pajzs felett van a mérlegserpenyő, amely igen érzékeny mikromérleghez tartozik. A mérlegserpenyő kb. 30 mm átmérőjű, készítéséhez az arannyal bevont alumínium a megfelelő anyag.

– A mérlegserpenyőt sárgarézről vagy rézből készült hengeres hűtőköpeny veszi körül. A mérleg típusától függően nyílásai vannak a mérlegkar és a védőlemez irányában, hogy a nyíláson át molekulák áramolhassanak és biztosítsák a gőz teljes lecsapódását a mérlegserpenyőre. A hőátadást is biztosítják, például olyan módon, hogy egy rézrudat csatlakoztatnak a hűtőköpenyhez. A rudat az alaplapon át vezetik és hőszigetelik króm-nikkel acélból készült csővel. A rúd egy folyékony nitrogénnel töltött Dewar-edénybe merül vagy a rúdon át folyékony nitrogént áramoltatnak. Ilyen módon a hűtődoboz kb. –120 C°-on tartható. A mérlegserpenyőt kizárólag sugárzással hűtik és a vizsgálat alatt (a hűtést közel egy órával kezdik meg a mérés kezdete előtt).

– A mérleget a hűtődoboz felett helyezik el. Alkalmos mérlegek például az igen érzékeny kétkarú elektronikus mikromérlegek (8) vagy a szintén igen érzékeny mozgótekerces berendezés (lásd: OECD Test Guideline 104, Edition 12.05.81).

– Az alaplapba vannak beépítve az elektromos csatlakozások a termoelemekhez (vagy az ellenállás-hőmérőkhöz) és a fűtőspirálokhoz.

– Az edényben a vákuumot parciális vákuumszivattyúval vagy nagyteljesítményű vákuumszivattyúval hozzák létre (a szükséges vákuum $1-2 \times 10^{-3}$ Pa, két órás szivattyúzással érik el). A nyomást alkalmas ionizációs manométerrel szabályozzák.

1.6.4.2. Mérési eljárás

Az edényt megtöltik a vizsgálati anyaggal és a fedelet lezárják. A pajzsot és a hűtődobozt a kemence fölé helyezik. A készüléket lezárják és a vákuumszivattyút bekapcsolják. A végső nyomásnak a mérés kezdete előtt kb. 10^{-4} Pa-nak kell lennie. A hűtődoboz hűtése 10^{-2} Pa-nál kezdődik.

Amikor a megkívánt vákuumot elérték, megkezdődik a kalibrációs sorozat a megkívánt legalacsonyabb hőmérsékleten. A megfelelő nyílást a fedélen beállítják, és a gőz átmegy a védőlemezen át a nyílások fölé és nekiütközik a hűtött mérlegserpenyőnek. A mérlegserpenyőnek elég nagyoknak kell lennie ahhoz, hogy a pajzsra átirányított teljes gőz áram nekiütközzék. A gőz áram impulzusmomentuma erőként hat a mérlegserpenyőre és a molekulák lecsapódnak a hideg felületeken.

Az impulzusmomentum és az egyidejű lecsapódás jelet hoz létre a regisztrálón. A jelek értékelése kétféle információt nyújt:

1. Az ismertett készülékben a gőznyomást direkt határozzák meg a mérlegserpenyőre ható impulzusmomentumból [nem szükséges a molekulatömeg ismerete (2)]. Bizonyos geometriai faktorokat – a kazán nyílásaival kapcsolatban és a molekuláris áramlás szögét illetően – figyelembe kell venni a leolvasások értékelésénél.
2. A kondenzátum tömege mérhető ugyanabban az időben és a párolgás mértéke kiszámítható ebből a molekulatömeg felhasználásával a Hertz-egyenlet szerint: (2).

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

ahol

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

M = molekulatömeg (g mol^{-1})

T = hőmérséklet (K)

R = egyetemes moláris gázállandó ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)

p = gőznyomás (Pa)

Miután a szükséges vákuumot elérték, a mérések sorozatát a megkívánt legalacsonyabb hőmérsékleten kezdik el. További mérésekhez a hőmérsékletet kis intervallumokban emelik, amíg a kívánt maximális hőmérsékletet eléri. A mintát ismét lehűtik és egy második gőznyomás görbe regisztrálható. Ha a második mérés nem erősíti meg az első mérés eredményeit, akkor lehetséges, hogy az anyag lebomlott a mért hőmérsékleti tartományban.

1.6.5. Effúziós módszer – a tömegvesztés mérésével

1.6.5.1. Készülék

Az effúziós készülék a következő fő részekből áll:

- termosztálható és légmentesíthető tartály, amelyben az effúziós cellát elhelyezik,
- nagy vákuumot előállító vákuumszivattyú (pl. diffúziós vákuumszivattyú vagy turbomolekuláris szivattyú),
- gőzcsapda – folyékony nitrogén vagy száraz jég felhasználásával.

Elektromosan fűtött, alumíniumból készült, négy, rozsdamentes acélból gyártott effúziós cellával ellátott vákuumtartályt mutat be példaként az 5. ábra. A kb. 0,3 mm vastag rozsdamentes acéllemeznek van 0,2-1,0 mm átmérőjű kifolyó – effúziós – nyílása és ez az effúziós cellához van szerelve csavarmentes fedéllel.

1.6.5.2. Mérési eljárás

A referencia- és a tesztanyagokat betöltik az egyes effúziós cellákba és nyílással ellátott fémlapra a csavarmentes fedéllel ráerősítik és az összes cellát megméri 0,1 mg pontossággal. A cellákat a termosztált készülékbe helyezik el, amelyet aztán légtelenítenek a kívánt nyomás $1/10$ -e alá. Meghatározott időközönként – 5 és 30 óra között – levegőt engednek be a készülékbe és az effúziós cellák tömegvesztését újraméréssel állapítják meg.

Azzal a céllal, hogy az eredményeket ne befolyásolják illékony szennyeződések, a cellákat meghatározott időközönként újra mérik annak ellenőrzésére, hogy a párolgási sebesség állandó-e a két mérés közötti időszakokban.

A gőznyomást az effúziós cellában a következő képlet adja meg:

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

ahol

p = gőznyomás (Pa)

m = t idő alatt a cellából távozó anyag tömege (kg)

t = idő (s)

A = a nyílás területe (m^2)

K = korrekciós faktor

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

T = hőmérséklet (K)

M = molekulatömeg ($g\ mol^{-1}$)

A K korrekciós faktor függ a hengeres nyílás hosszának a sugarához való arányától:

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

A fenti egyenlet felírható így:

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

ahol

$$E = \frac{1}{KA} \sqrt{2\delta R} \quad \text{és ez az effúziós cellaállandó}$$

Az effúziós cellaállandó E meghatározható az irodalmi hivatkozások segítségével (2, 9) a következő egyenlettel:

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

ahol

$p(r)$ = a referencia anyag gőznyomása (Pa)

$M(r)$ = a referencia anyag molekulatömege ($kg\ mol^{-1}$)

1.6.6. Gázsaturációs eljárás

1.6.6.1. Készülék

A vizsgálat elvégzésére használt és több elemből álló egyik tipikus készüléket a 6a ábra mutatja be és a következőképpen írható le (1):

Inert gáz

A vivőgáznak nem szabad kémiai reakcióba lépnie a vizsgálandó anyaggal. Nitrogén rendszerint elégséges erre a célra, de esetenként más gázok használata is szükségessé válhat (10). A felhasznált gáznak száraznak kell lennie (lásd a 6a ábrán a 4-es jelzést, az vonatkozik a relatív páratartalom érzékelőjére).

Áramlás ellenőrzése

Annak biztosítására, hogy a szaturátor oszlopon keresztül állandó és a kiválasztott áramlás legyen, megfelelő gázszabályozó rendszerre van szükség.

Gőzcsapdák

A gőzcsapdák az adott minta jellegzetességeitől és a választott analitikai módszertől függenek. A gőzt kvantitatíve és olyan formában kell összegyűjteni, ami a következőkben az analízist lehetővé teszi. Néhány tesztanyaghoz csapdának a hexánt vagy etilén-glikolt tartalmazó folyadékok a megfelelők. Másokhoz szilárd abszorbensek lehetnek alkalmasak.

A gőznyevelés és az azt követő analízis alternatívái az in-train analitikai technikák, mint például a kromatográfia, használhatók az ismert mennyiségű vivőgáz által szállított anyag kvantitatív meghatározására. Továbbá a minta tömegvesztése is mérhető.

Höcserélő

Különböző hőmérsékleteken végzett mérésekhez szükséges lehet a höcserélő használata.

Szaturátor oszlop

A tesztanyagot oldat formájában adagolják a megfelelő mennyiségű inert segédanyaghoz. A tesztanyaggal átitatott segédanyagot a szaturátor oszlopba helyezik, amely méreteiben is megfelel, továbbá a gázáramlásnak olyannak kell lennie, hogy a vivőgáz teljes szaturációja biztosítva legyen. A szaturátor oszlopot termosztálni kell. A szobahőmérséklet feletti méréseknél a szaturátor oszlop és a csapda közötti területet fűteni kell, hogy a tesztanyag lecsapódását meg lehessen előzni. Hogy csökkentsék a diffúzióval történő tömegtranszportot, kapillárist helyezhetnek a szaturátor oszlop után. (6b ábra).

1.6.6.2. Mérési eljárás

A szaturátor oszlop előkészítése

A vizsgálandó anyag illékony oldószeres oldatát az alkalmas mennyiségű segédanyaghoz tartalmazó oszlophoz adják. A szaturáció fenntartására a vizsgálat alatt elégséges mennyiséget kell adagolni. Az oldószer teljesen elpárolog a levegőben vagy a forgó párologtatóban és az alaposan elkevert anyagot adják a szaturátor oszlopba. A minta termosztálása után száraz nitrogén halad át a készüléken.

Mérés

A gőzcsapda vagy az in-train detektor összeköttetésbe kerül az oszlop elfolyási vezetékével, és az időt regisztrálják. Az áramlás sebességét a kísérlet kezdetén, illetve folyamán, buborékos mérőeszközt (vagy folyamatos tömeg-áramlásmérőt) használva, szabályos időközönként ellenőrizni kell.

A nyomást a szaturátor kimenetén kell mérni. Ez a következőképpen végezhető:

a) nyomásmérő beiktatásával a szaturátor és a csapdák közé (ez elégtelen is lehet, mert növeli a holt teret és az adszorpciós felületet),

vagy

b) azoknak a nyomáseséseknek a meghatározásával, amelyek az adott elnyelő rendszeren keresztül keletkeznek az áramlási sebesség függvényeként az egyes kísérletekben (az elégtelen is lehet folyékony csapdafolyadékok esetén).

A tesztanyag gyűjtéséhez megkívánt időt, amely szükséges a különféle analitikai módszerekhez, előzetes vizsgálatokkal vagy becsléssel határozzák meg. Az anyag további analízishez való gyűjtésének alternatívájaként in-train analitikai technikák (pl. kromatográfia) használhatók. Mielőtt kiszámítják a gőznyomást az adott hőmérsékleten, előzetes vizsgálatokkal meg kell határozni a maximális áramlási sebességet, amely telíti a vivőgázt az anyag gőzével. Ezt az biztosítja, hogy ha a vivőgáz elég lassan halad át a szaturátoron, hogy az kisebb sebesség ne adjon nagyobb számított gőznyomást.

A specifikus analitikai módszereket (pl. gázkromatográfia vagy gravimetria) a vizsgálandó anyag természete határozza meg. Az ismert mennyiségű vivőgáz által átvitt anyag mennyisége meghatározott.

1.6.6.3. A gőznyomás kiszámítása

A gőznyomást a gőzsűrűségből $\left(\frac{W}{V}\right)$ szárítják a következő egyenlet segítségével:

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

ahol

p = gőznyomás (Pa)

W = az elpárolgott tesztanyag tömege (g)

V = a szaturált gáz térfogata (m³)

R = egyetemes moláris gázállandó (J mol⁻¹ K⁻¹)

T = hőmérséklet (K)

M = molekulatömeg (g mol⁻¹)

A mért térfogatokat korrigálni kell az áramlásmérő és a termosztált szaturátor közötti nyomás- és hőmérséklet-különbségekre. Ha az áramlásmérő a csapdától lejjebb helyezkedik el, korrekciók lehetnek szükségesek a csapda valamennyi elpárolgott összetevőjének figyelembe vételével. (1)

1.6.7. Forgó rotoros eljárás (8, 11, 13)

1.6.7.1. Készülék

A pörgő rotor technika forgó rotoros viszkozitásmérőt (8. ábra) használva alkalmazható. A kísérleti összeállítást vázlatosan a 7. ábra mutatja be.

Tipikus esetben a mérőkészülék forgó rotor mérőfejből áll, amelyet termosztátban helyeznek el (0,1 °C-on belül szabályozva). A mintatartály szintén termosztált környezetben (0,01 °C-on belül szabályozva) van és az összeállítás valamennyi többi részét magasabb hőmérsékleten tartják, hogy a lecsapódást megelőzzék. Erős vákuum-szivattyúval kötik össze a rendszert vákuumszelepek segítségével.

A forgó rotoros mérőfej csőben lévő acélgolyóból (átmérője 4–5 mm) áll. A golyót mágneses tér tartja fent és stabilizálja, ezért általában permanens mágnesek és irányító tekercsek kombinációját használják.

A golyót forgómágnes terek segítségével pörgetik.

Az érzékelő tekercsek mérik a golyó mindig jelenlévő alacsony laterális mágnesességét, így lehetővé válik a pörgés sebességének mérése.

1.6.7.2. A mérési eljárás

Amikor a golyó eléri az adott forgási sebességet – $v(o)$ – (rendszerint 400 fordulat másodpercenként), a további energiaátadást megszüntetik és lassulás következik be, ami a gáz súrlódási hatásának tulajdonítható.

A forgási sebesség csökkenését az idő függvényében mérik. Minthogy a mágneses felfüggesztés okozta súrlódás elhanyagolható gázok okozta súrlódáshoz képest, a gáznyomás – p – így adható meg:

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

ahol

\bar{c} = a gázmolekulák átlagos sebessége

r = a golyó átmérője

p = a golyó tömegsűrűsége [mass density]

ρ = a tangenciális momentum transzfer koefficiense ($a = 1$ az ideális gömbfelületű golyóra)

t = idő

$v(t)$ = forgási sebesség t idő után

$v(o)$ = kezdeti forgási sebesség

Az egyenlet így is leírható:

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

ahol t_n , t_{n-1} az idő, amely szükséges N fordulat megtételéhez. Ezek az időintervallumok – t_n és t_{n-1} – egymás után következnek, $t_n > t_{n-1}$

A gázmolekula átlagos sebessége így adható meg:

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

ahol

T = hőmérséklet

R = egyetemes moláris gázállandó

M = moláris tömeg

2. ADATOK

A gőznyomást az ismertett módszerek bármelyikével kell meghatározni legalább két hőmérsékleten. Három vagy még több mérés előnyös a 0 °C és 50 °C közötti tartományban azzal a céllal, hogy ellenőrizzék a gőznyomásgörbe linearitását.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg az alábbi információkat kell magába foglalni:

- a felhasznált módszer,
- az anyag pontos specifikációja (azonosítás, szennyeződések, előzetes tisztítási fok, ha van),
- legalább két gőznyomás és hőmérsékleti érték, elsősorban a 0 °C és 50 °C közötti tartományban,
- az összes nyers adat,
- $\log p - 1/T$ görbe,
- becsült gőznyomás 20 °C-on vagy 25 °C-on.

Ha bizonyos változásokat (állapotváltozás, lebomlás) figyelnek meg, a következő információt kell hozzátenni:

- a változás jellege,
- a hőmérséklet, amelyen a változás atmoszférikus nyomáson következik be,
- gőznyomás 10 °C-kal vagy 20 °C-on a változás hőmérséklete alatt és 10 °C-kal vagy 20 °C-kal a változás hőmérséklete felett (hacsak nem a változás szilárd állapotból gázállapotba megy végbe).

A jelentésbe bele kell foglalni az összes olyan információt és megjegyzést, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire és fizikai állapotára.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- (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, Butterworth, 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) NT F 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) NT F 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, Vac. Sci. Technol. (A), 1985, vol. 3 (3), 1715.

1. Függelék

Becslési módszer

Bevezetés

A gőznyomás számított értékei használhatók

- annak eldöntésére, hogy melyik az alkalmas kísérleti módszer,
- becslés vagy határérték megadására olyan esetekben, amelyekben a kísérleti módszer nem alkalmazható technikai okokból (beleértve ha a gőznyomás igen alacsony),
- olyan esetek azonosítására, amelyekben a hiányzó kísérleti mérést indokolják, mert a gőznyomás valószínűleg kisebb 10^{-5} Pa-nál a környezeti hőmérsékleten.

Becslési módszer

A folyadékok és szilárd anyagok gőznyomását a módosított Watson korreláció szerint becsülik. (a)

A csak kísérleti adatok normál forrásponton értendők.

A módszert 10^5 Pa nyomástól 10^{-5} Pa nyomásig lehet alkalmazni. A módszerről részletes információt a „Handbook of Chemical Property Estimation Methods”-ban lehet kapni (b)

A számítási eljárás

A gőznyomást a következő egyenlettel számítják:

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

ahol

T = az adott hőmérséklet

T_b = normál forráspont

P_{vb} = a gőznyomás T hőmérsékleten

ΔH_{vb} = párolgáshő

ΔZ_b = nyomási faktor (becsült 0,97 nél)

m = empirikus faktor (függ az adott hőmérsékleten a fizikai állapottól)

Továbbá:

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

ahol

K_F empirikus faktor (az anyag polaritásától függ) számos anyag típusra a K_F faktorokat a (b) irodalom tartalmazza.

Igen gyakran a rendelkezésre álló adatoknál a forráspontot más redukált nyomásra adják meg. Ilyenkor a következő módon számolnak (b):

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

ahol T_1 a redukált P_1 nyomáson a forráspont

Jelentés

Ha ezt a módszert használják, minden részletre kiterjedő dokumentációt kell adni a számításról.

Irodalom

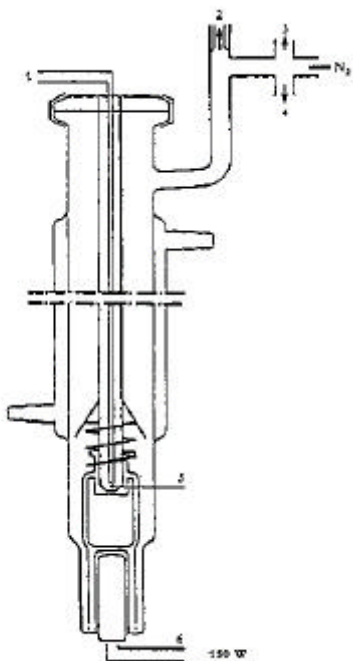
K.M. Watson, Ind. Eng. Chem; 1943, vol. 35, 398.

W.J. Lyman; W.F. Rehl, D.H. Rosenblatt. Handbook of Chemical Property Estimation Methods, Mc Graw-Hill, 1982

2. Függelék

1. ábra

Készülék a gőznyomás-görbe meghatározásához a dinamikus módszer szerint



1 = Termoelem

2 = Vákuum puffer térfogat

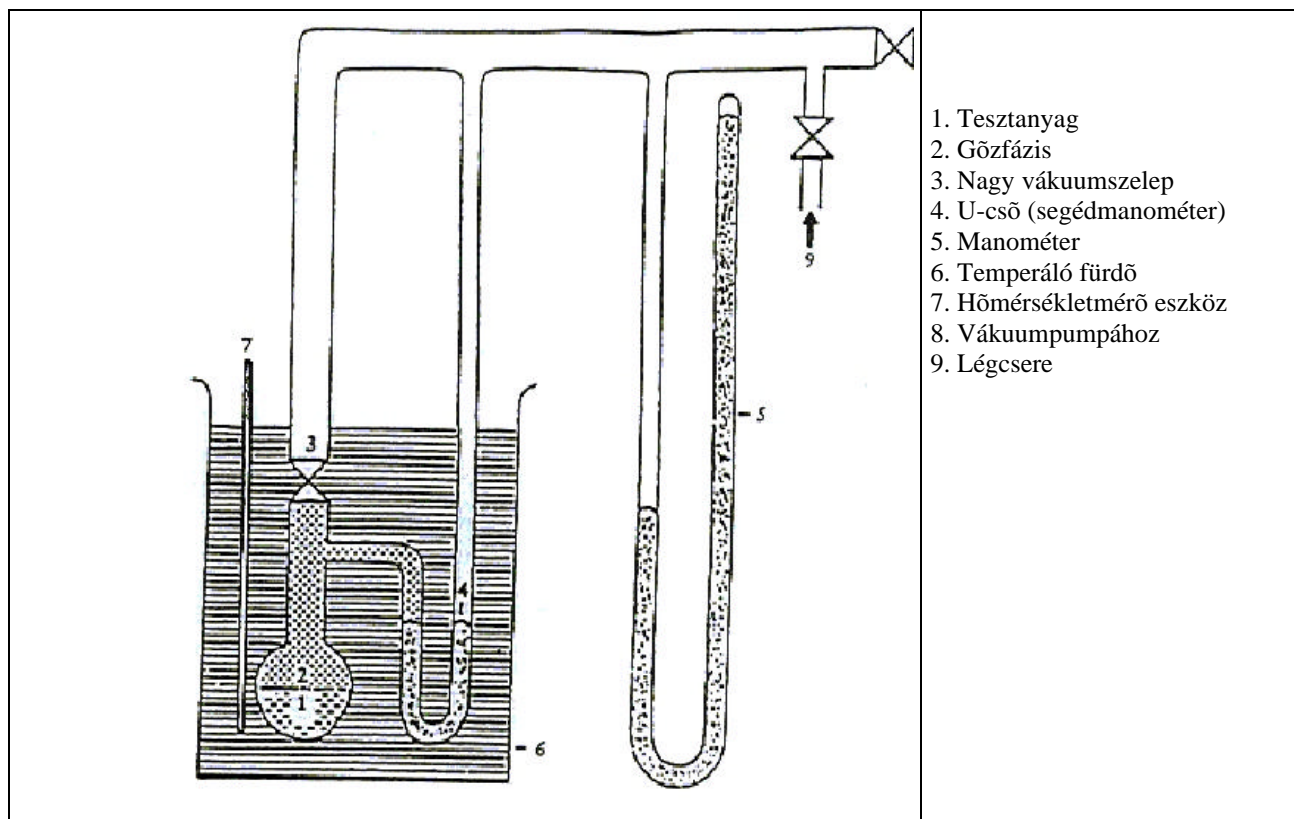
3 = Nyomásmérő

4 = Vákuum

5 = Mérési pont

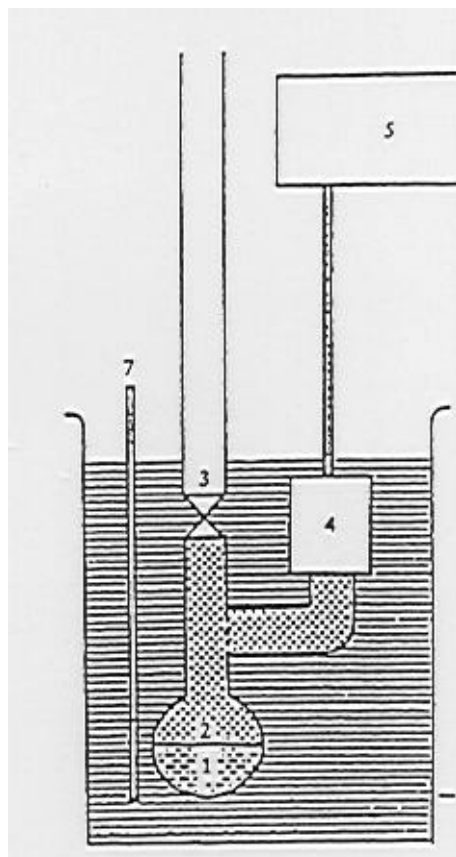
6 = Fűtőelem, kb. 150 W-os

2. ábra



2a ábra.

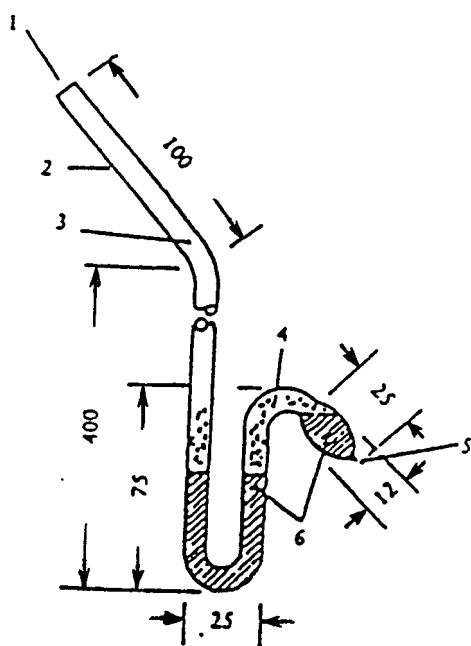
Mintakamra. Készülék a gőznyomás-görbe meghatározásához a statikus módszer szerint (U-csöves manométer használatával)



1. Tesztanyag
2. Gőzfázis
3. Nagy vákuumszelep
4. Nyomásmérő
5. Nyomásjelző
6. Temperáló fürdő
7. Hőmérsékletmérő eszköz

2b ábra

Készülék a gőznyomás-görbe meghatározásához a statikus módszer szerint (nyomásjelző használatával)

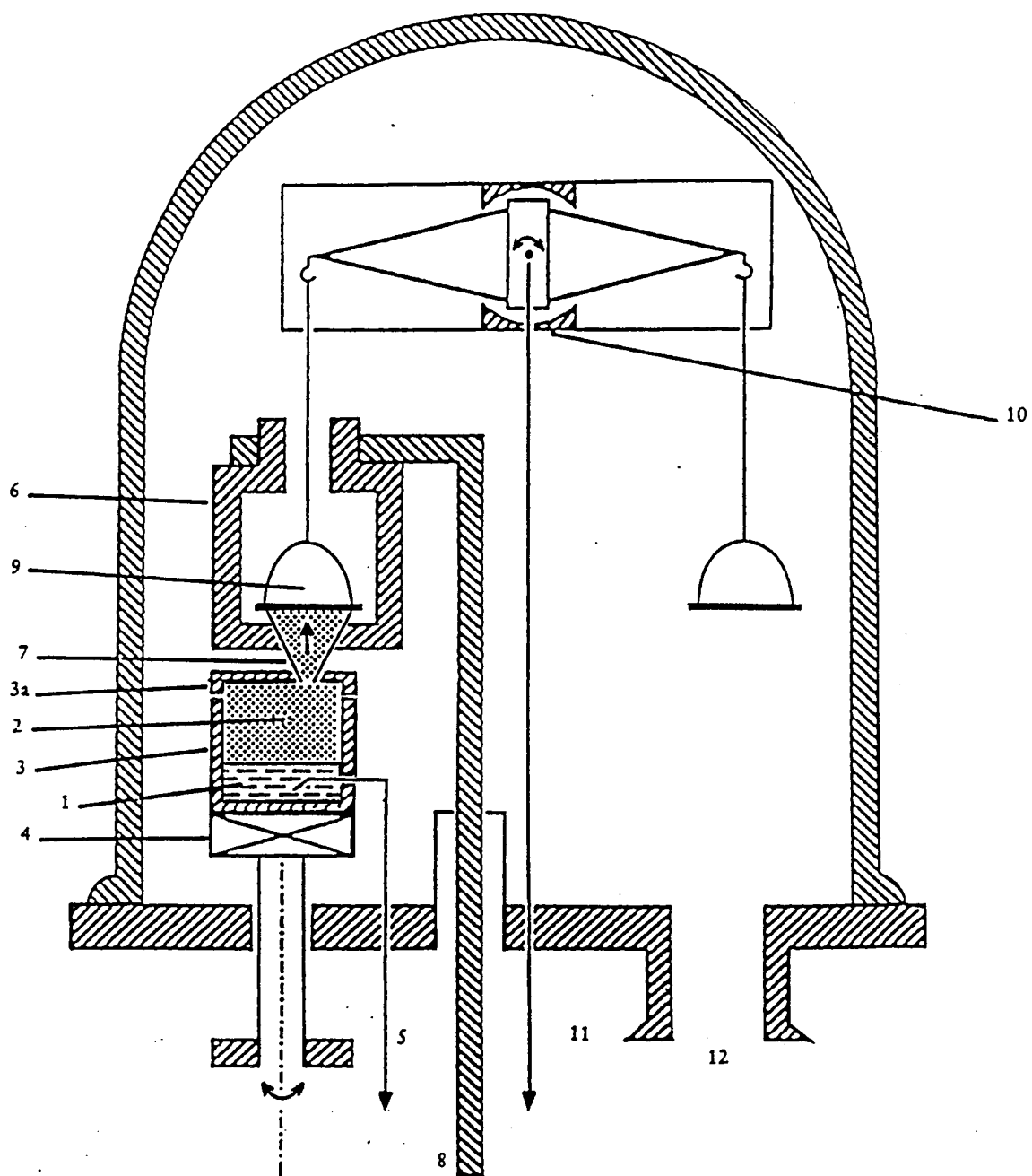


3. ábra

1. Nyomásirányító és mérő rendszer
2. 8 mm-es OD-cső
3. Száraz nitrogén nyomástartó rendszerben
4. Gőzminta
5. Kis csővég
6. Folyadékminta

Izoteniszkóp (lásd a 7. irodalmi hivatkozást)

4. ábra

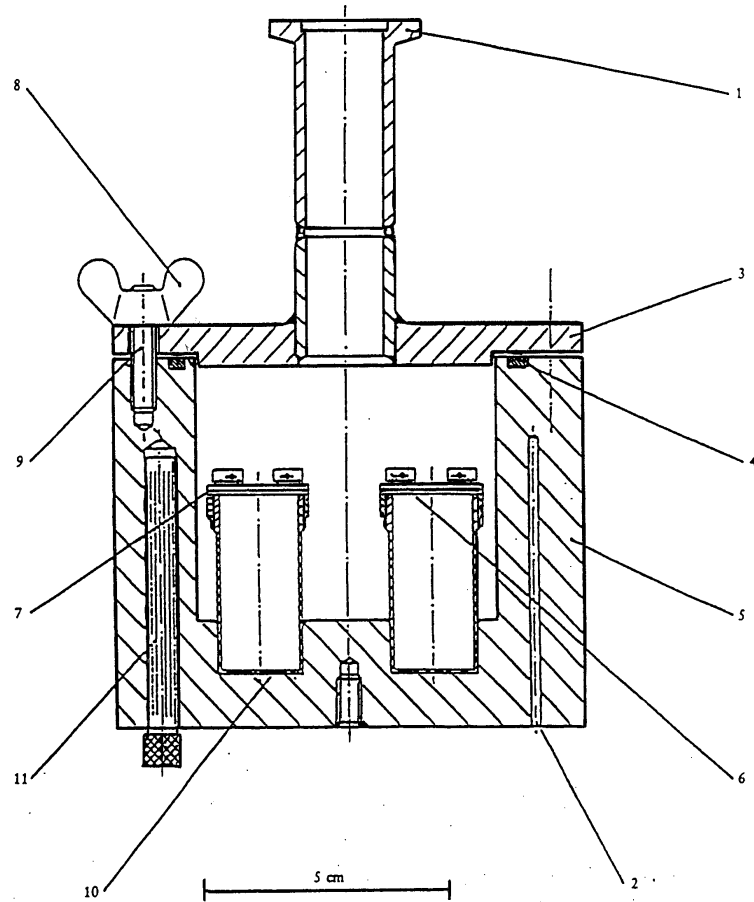


Készülék a gőznyomás-görbe meghatározásához a gőznyomás mérleges mérési módszerével

1. Tesztanyag
2. Gőzfázis a gőzárammal
3. Párolgató kazán forgó bemenettel
- 3a. Kazánfedél nyílással
4. A kazán fűtése (hűtése)
5. A minta hőmérsékletének mérése

6. Hűtődoboz
7. Védőlemez
8. Hűtődoboz tartója
9. Mérlegserpenyő
10. Mikromérleg
11. Regisztráló
12. Összeköttetés a vákuumpumpához

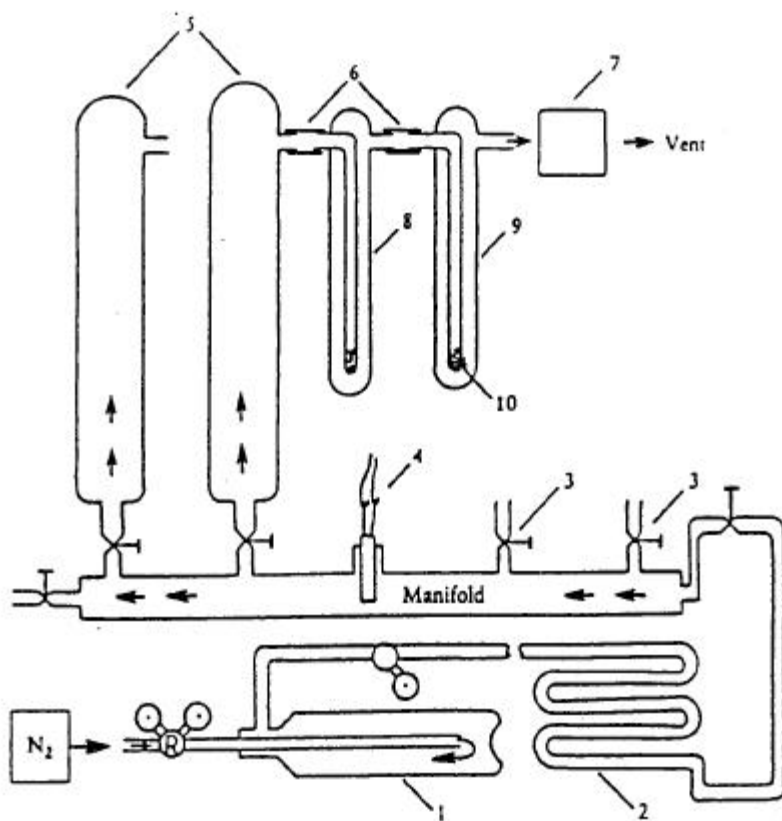
5. ábra



Példa az effúziós módszerhez használatos készülékre, amely alacsony gőznyomáson párologtat; az effúziós cella térfogata 8 cm^3

1. Összeköttetés a vákuummal
2. Üregek a platina ellenállás-hőmérő vagy hőmérsékletmérő vagy -irányító eszköz részére (2)
3. Fedél a vákuumtartályhoz
4. o-gyűrű
5. Alumínium vákuumtartály
6. Eszköz az effúziós cellák behelyezéséhez és eltávolításához
7. Csavarmentes fedél
8. Pillangócsavar (6)
9. Reteszek (6)
10. Rozsdamentes acél effúziós cellák
11. Fűtőrudak (6)

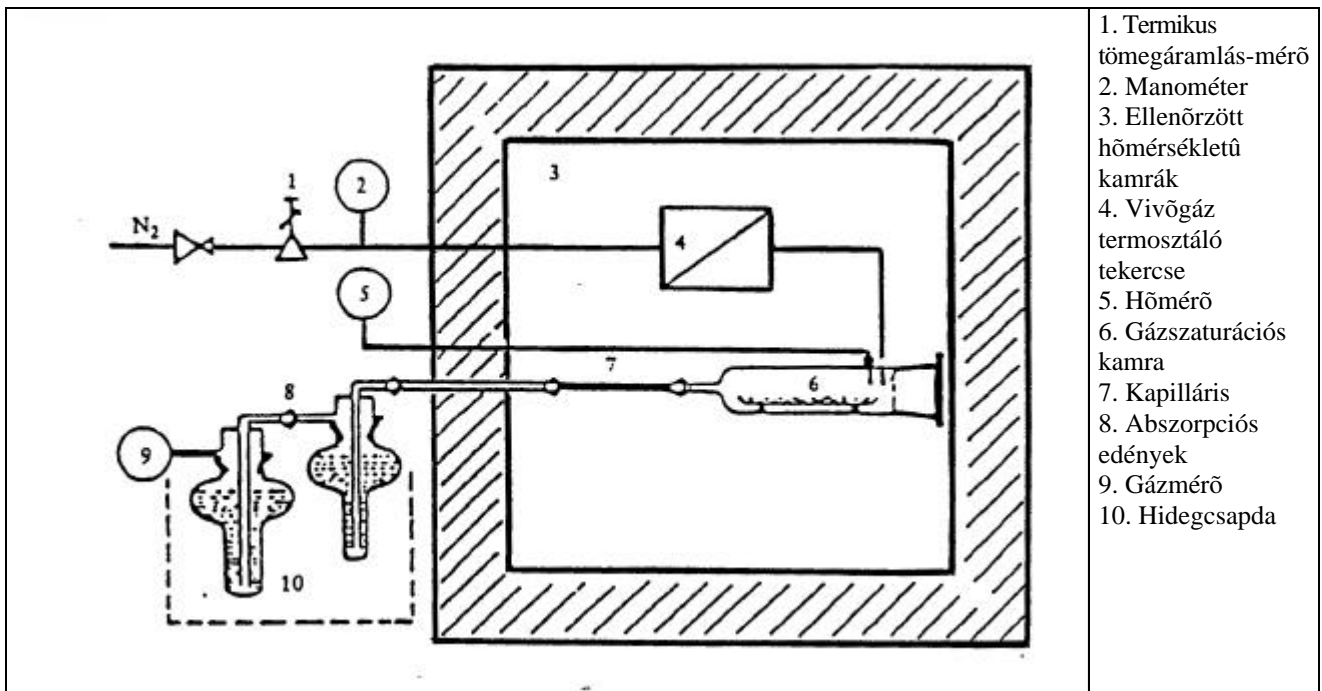
6a ábra



1. Áramlásszabályozó
2. Hőcserélő
3. Tűszelepek
4. Relatív páratartalom érzékelője
5. Szaturáló oszlopok
6. Politetrafluoretilénből (PTFE) készült csatlakozások
7. Áramlásmérő
8. Csapda (abszorber)
9. Olajcsapda
10. Fritteres elnyelő

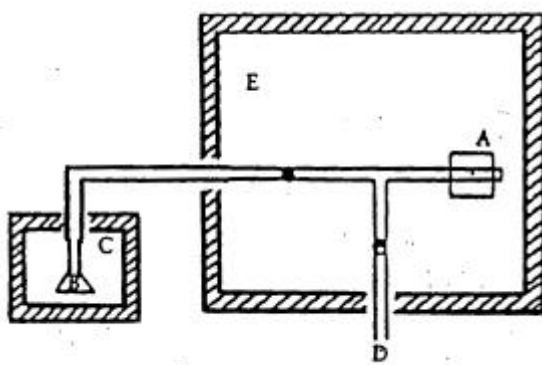
Példa az áramlási rendszerre a gőznyomás gázsaturációs módszerrel végbemenő meghatározásához

6b ábra



Példa olyan rendszerre, amely a gőznyomást gázsaturációs módszerrel határozza meg; a saturációs kamra után kapillárist helyeztek el

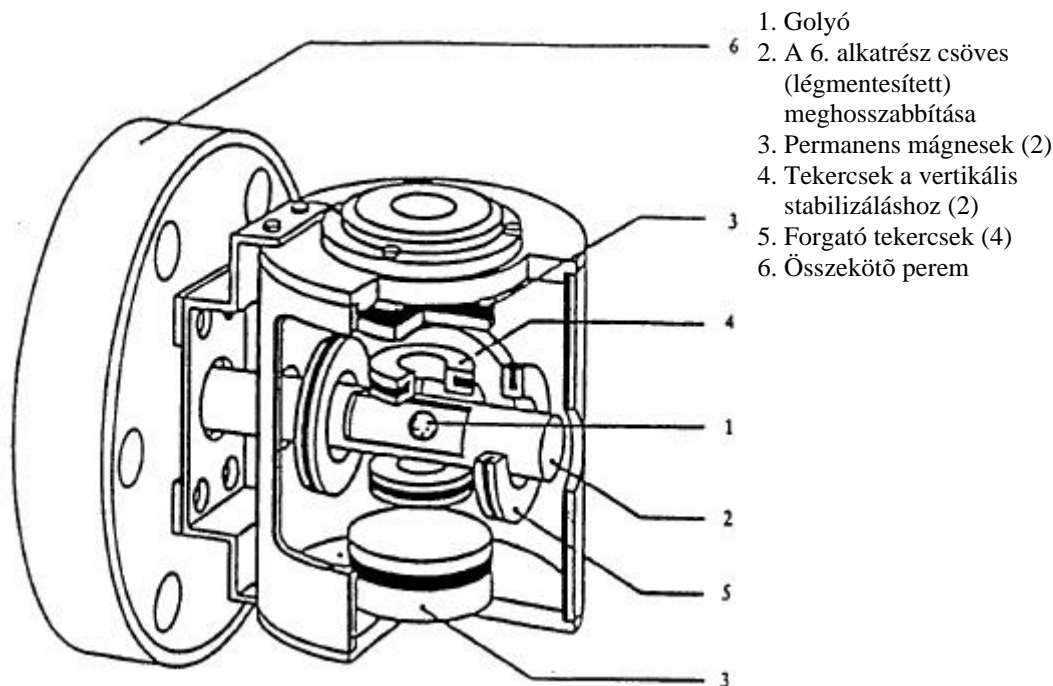
7. ábra



- A. pörgő rotor érzékelő fej
B. Mintacella
C. Termosztát
D. Vákuumvezeték (turbószivattyú)
E. Levegő-termosztát

Példa a forgó rotor módszerrel végbemenő gőznyomásmérés kísérleti berendezésére

8. ábra



Példa a forgó rotor érzékelőfejre

A.5. FELÜLETI FESZÜLTÉSÉG

1. MÓDSZER

A leírt módszerek az OECD Test Guideline-on alapulnak (1). Az alapelveket 2. irodalmi hivatkozás adja meg.

1.1. Bevezetés

A leírt módszerek vizes oldatok felületi feszültségének méréséhez alkalmazhatók.

A vizsgálatok megkezdése előtt hasznosak az információk az anyag vízoldékonyságáról, struktúrájáról, hidrolizáló tulajdonságairól és a micella-képződés kritikus koncentrációjáról.

A következő módszerek a legtöbb vegyi anyagnál használhatók, függetlenül azok tisztasági fokától.

A felületi feszültség mérése a gyűrűs tenziométeres módszerrel azokra a vizes oldatokra korlátozódik, amelyek dinamikus viszkozitása kisebb kb. 200 mPa s-nál.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

Felületi feszültségnek az egységnyi felületre vonatkoztatott szabad felületi entalpiát tekintik.

A felületi feszültség megadható a következő egységekben:

N/m (SI egység) vagy

mN/m (SI alegység) $1 \text{ N/m} = 10^3 \text{ dyn/cm}$ $\text{mN/m} = 1 \text{ dyn/cm}$ az elavult cgs rendszerben

1.3. Referencia anyagok

Új anyagok vizsgálatához referencia anyagokra nincs minden esetben szükség.

A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

A felületi feszültségek széles skálájára kiterjedő referencia anyag felsorolása az irodalomjegyzékben megtalálható (1, 3).

1.4 A módszerek elve

Ezek a módszerek azon alapszanak, hogy mérik azt a legnagyobb függőlegesen kifejtett erőt, amelyet szükséges kifejteni a mérőedényben lévő folyadék felületével érintkező gyűrűn vagy kengyelen, hogy elválassza azt ettől a felülettől, vagy pedig egy lemezen, amely szélé érintkezik a felülettel, hogy kiemelje a képződött folyadékfilmet.

A vízben legalább 1 mg/liter koncentrációban oldódó anyagokat egyetlen koncentrációban vizsgálják.

1.5. Minőségi kritériumok

Ezek a módszerek nagyobb pontosságra képesek, mint amelyet a környezeti becslések valószínűleg megkívánnak.

1.6. A módszerek leírása

Az anyag oldatát desztillált vízben készítik el. Az oldat koncentrációjának 90%-os telített oldatnak kell lennie; ha ez a koncentráció meghaladja az 1 g/litert, akkor 1 g/literes koncentrációt használnak a vizsgálathoz.

Az 1 mg/liternél kisebb vízzoldékonyságú anyagokat nem szükséges vizsgálni.

1.6.1. Lemezes módszer

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

1.6.2. Kengyeles módszer

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

1.6.3. Gyűrűs módszer

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

1.6.4. OECD által harmonizált gyűrűs módszer

1.6.4.1. Készülék

A kereskedelemben kapható tenziométerek megfelelőek ezekhez a mérésekhez. Az eszközök elemei a következők:

- mobil mintaasztal,
- erőmérő rendszer,
- mérőtest (gyűrű),
- mérőedény.

1.6.4.1.1. Mobil mintaasztal

A mobil mintaasztal a vizsgálandó folyadékot tartalmazó kontrollált hőmérsékletű mérőedény támasztéka. Az erőmérő rendszerrel együtt egy talpazatra szerelik.

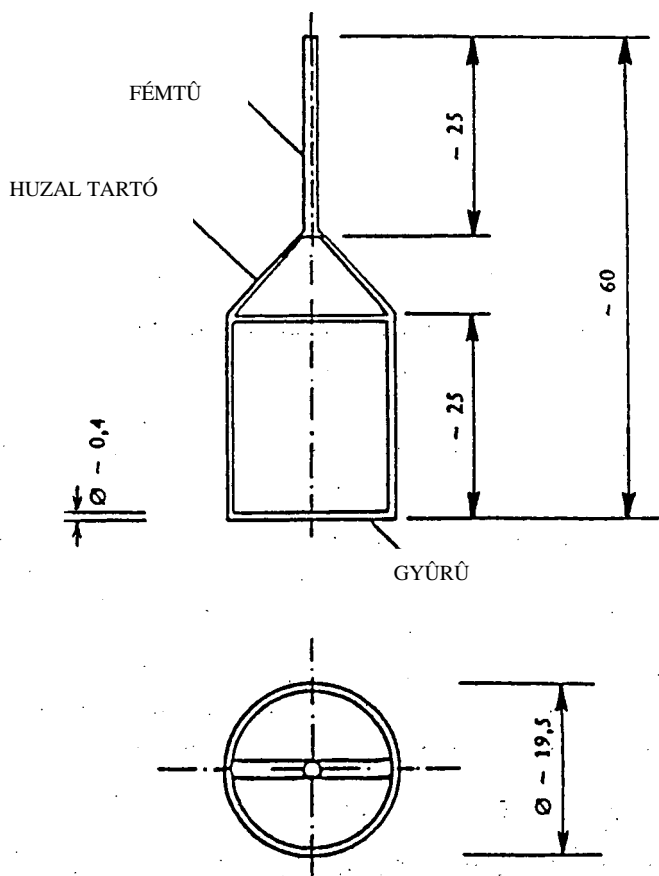
1.6.4.1.2. Erőmérő rendszer

Az erőmérő rendszert a mintaasztal fölé helyezik. Az erőmérés hibája nem lépheti túl a $\pm 10^{-6}$ N-t a tömegmérés $\pm 0,1$ mg-os hibahatárának megfelelően. A kereskedelemben kapható tenziométerek mérési skáláját a legtöbb esetben mN/m-ben kalibrálják, hogy a felületi feszültséget közvetlenül mN/m-ben lehessen leolvasni 0,1 mN/m pontossággal.

1.6.4.1.3. Mérőtest (gyűrű)

A gyűrű rendszerint 0,4 mm vastag platina-irídium huzalból készül, átmérője átlagban 60 mm. A huzalgyűrűt vízszintesen függesztik fel egy fémtűről és a huzaltartó hozza létre a kapcsolatot az erőmérő rendszerrel (lásd az 1. ábrát).

1. ábra



Mérőtest (valamennyi dimenzió milliméterben van megadva)

1.6.4.1.4. Mérőedény

A testtoldatot magában foglaló mérőedénynek ellenőrizhető hőmérsékletű üvegedénynek kell lennie. Úgy kell megtervezni, hogy a mérés alatt a testtoldat folyadék- és gázfázisa a felszín felett állandó maradjon és a minta ne tudjon párologni. A hengeres üvegedény 45 mm-nél nem kisebb belső átmérője az elfogadott.

1.6.4.2. A készülék előkészítése

1.6.4.2.1. Tisztítás

Az üvegedényt gondosan kell tisztítani. Szükség esetén meleg krómkénsavval, azt követően pedig foszforsavsziruppal (83–98%-os H_3PO_4 -oldat) kell kimosni, aztán csapvízzel kell alaposan öblíteni, végül kétszer desztillált vízzel kell kimosni a semleges kémhatásig, majd meg kell szárítani vagy a mérendő folyadékkal kell átöblíteni.

A gyűrűt először alaposan le kell öblíteni vízzel, hogy minden vízdékony anyagot eltávolítsanak róla, rövid időre krómkénsavba kell meríteni, majd kétszer desztillált vízzel kell mosni a semleges kémhatásig, végül metanol lángjában rövid ideig kell hevíteni.

Megjegyzés:

Olyan anyagokkal való szennyezés esetén, amelyek nem oldódnak vagy nem bomlanak krómkénsav vagy foszforsav hatására – a szilikonok ilyenek –, azokat alkalmas szerves oldószerrel kell eltávolítani.

1.6.4.2.2. A készülék kalibrálása

A készülék hitelesítése a zero pont hiteles kijelöléséből és azt úgy kell megadni, hogy a készülék a céljának megfelelően megbízható meghatározást tegyen lehetővé, mN/m egységben kifejezve.

Összeszerelés

A készüléket vízszintezni kell, például vízmérték segítségével a tenziométer alaplapján a vízszintező csavarok beállításával a talpuzaton.

A zero pont beállítása

A gyűrű készülékbe szerelése után és a folyadékba merítése előtt a tenziométer mutatóját zéróra kell beállítani és ellenőrizni kell azt, hogy a gyűrű párhuzamos-e a folyadék felszínével. E célra a folyadékfelszint tükörként lehet használni.

Kalibráció

Az aktuális tesztkalibrációt következő két eljárás valamelyikével kell elvégezni:

a) tömeg felhasználásával – az eljárásnál ismert tömegű lovasokat (0,1–1,0 g) helyeznek el a gyűrűn. A kalibrációs faktor – Φ_a –, amellyel az összes leolvasást meg kell majd szorozni, a következő egyenlettel kell meghatározni (1):

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

ahol

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

m = a lovas tömege (g)

g = gravitációs gyorsulás (981 cm.s⁻² a tenger szintjén)

b = a gyűrű átlagos kerülete (cm)

σ_a = a tenziométer leolvasása a lovas gyűrűre helyezése után (mN/m)

b) Víz felhasználásával – az eljárásban tiszta vizet használnak fel, amelynek felületi feszültsége például 23 °C-nál 72,3 mN/m. Az eljárás gyorsabb a súllyal végbemenő kalibrációnál, de fennáll az a veszély, hogy a víz felületi feszültségét meghamisítják a felületaktív anyagokkal való szennyezés nyomai.

A kalibrációs faktort – Φ_b –, amellyel minden leolvasást meg kell majd szorozni, a következő egyenlettel kell meghatározni (2):

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

ahol

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

σ_g = a víz felületi feszültségének mért értéke (mN/m)

mindkettő ugyanazon a hőmérsékleten megadva.

1.6.4.3. A minták előkészítése

A vizsgálandó anyag vizes oldatát kell elkészíteni a kívánt koncentrációban; az oldatnak semmilyen nem oldott anyagot nem szabad tartalmaznia.

Az oldatot állandó hőmérsékleten kell tartani ($\pm 0,5$ °C).

Mínthogy az oldat felületi feszültsége a mérőedényben változik az idővel, több mérést kell elvégezni különböző időpontokban és az így kapott görbe mutatja a felületi feszültséget az idő függvényében. Amikor további változás már nem következik be, az egyensúlyi állapot jött létre.

Egyéb anyagok okozta por- és gázszennyeződés zavarják a mérést. A munkát ezért védőernyő alatt kell elvégezni.

1.6.5. Vizsgálati körülmények

A mérést kb. 20 °C-on kell elvégezni és a hőmérsékletet $\pm 0,5$ °C között kell tartani.

1.6.6. A vizsgálat kivitelezése

A mérendő oldatot óvatosan kell átvinni a megtisztított mérőedénybe – ügyelve a habképződés elkerülésére és aztán a mérőedényt a tesztkészülék mérőasztalára kell elhelyezni. Az asztaltetőt a mérőedénnyel meg kell emelni, amíg a gyűrűt a mérendő oldat felszíne alá merítik. Majd az asztaltetőt fokozatosan süllyeszteni kell és a gyűrűt egyenesen (kb. 0,5 cm/min mértékben) el kell választani a felülettől addig, amíg a maximális erőt el nem érték. A gyűrűre került folyadékraeget nem kell a gyűrűről eltávolítani. A mérések befejezése után a gyűrűt ismét a felszín alá merítik és a méréseket addig ismétlik, amíg el nem érik az állandó felületi feszültség értéket. Az oldat mérőedénybe öntésének időpontját minden meghatározáskor fel kell jegyezni. A leolvasásokat annál a maximális erőnél kell elvégezni, amely szükséges a gyűrűnek a folyadék felületétől való elválasztásához.

2. ADATOK

A felületi feszültség kiszámításához a készüléken leolvasott mN/m-ben megadott értéket először meg kell szorozni a kalibrációs faktoralal (az alkalmazott kalibrációs módszertől függően). Az így kapott érték csak közelítésre alkalmazható, ezért további korrekciót kíván meg.

Harkins és Jordan (4) empirikusan határozták meg a korrekciós faktort a gyűrűs módszerrel meghatározott felületi feszültség értékeire, amely függ a gyűrű dimenzióitól, a folyadék sűrűségétől és a felületi feszültségétől.

Mínthogy munkaigényes a korrekciós faktor meghatározása a Harkins–Jordan táblázatból minden egyes egyedi mérésre, vizes oldatok felületi feszültségének kiszámításához az egyszerűsített eljárásban a korrigált felületi feszültség közvetlenül táblázatból is leolvasható. (Interpolációt kell alkalmazni, ha a leolvasások a táblázati értékek közé esnek.)

Táblázat: A mért felületi feszültség korrekciója

Csak vizes oldatokra alkalmazható ($\rho = 1 \text{ g/cm}^3$)

R = 9,55 mm (a gyűrű átlagos sugara)

r = 0,185 mm (a gyűrű huzalának sugara)

Kísérleti érték (mN/m)	Korrigált érték (mN/m)	
	Kalibráció tömegre [lásd az 1.6.4.2.2a)]	Kalibráció vízre [lásd az 1.6.4.2.2b)]
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	–
76	71,2	–
78	73,2	–

Ezt a táblázatot a Harkins–Jordan korrekció alapján állították össze. Hasonló ehhez a DIN Standard (DIN 53914) vízre és vizes oldatokra (sűrűség $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$) és a kereskedelemben kapható gyűrűre (R = 9,55 mm – gyűrű sugara átlagban, illetve r = 0,185 mm – a gyűrűhuzal sugara). A táblázat olyan korrigált értékeket ad meg a felületi feszültségre, amelyeket súllyal vagy vízzel való kalibráció után kaptak.

Alternatív módon előzetes kalibráció nélkül a felületi feszültség a következő képlet alapján is kiszámítható:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4pR}$$

ahol

F = a dinamométeren mért erő a film szakadási pontjában

R = a gyűrű sugara

f = korrekciós faktor (1)

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- a felhasznált módszer,
- a felhasznált víz vagy oldat típusa,
- az anyag pontos specifikációja (azonosság, szennyeződések),
- mérési eredmények: felületi feszültség (leolvasás), amely közli mind az egyedi leolvasásokat és aritmetikai középértékeket, mind a korrigált középértékeket (figyelembe véve a készülék faktorát és a korrekciós táblát),
- az oldat koncentrációja,
- vizsgálati hőmérséklet,
- a felhasznált oldat kora, az időtartam az oldat készítése és a mérés között,
- a felületi feszültség időfüggésének leírása az oldatnak a mérőedénybe öntése után,
- a jelentésbe bele kell foglalni az összes olyan információt és megjegyzést, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire és fizikai állapotára.

3.2. Az eredmények értelmezése

Figyelembe véve, hogy a desztillált víz felületi feszültsége 72,75 mN/m 20 °C-on, az olyan anyagokat, amelyek felületi feszültsége kisebb 60 mN/m-nél ezen módszer körülményei között, felületaktív anyagoknak kell tekinteni.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- (1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 115, Decision of 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. Amer. Chem. Soc., 1930, vol. 52, 1751.

A.6. OLDHATÓSÁG VÍZBEN

1. MÓDSZER

A leírt módszer az OECD Test Guideline-on alapul (1).

1.1. Bevezetés

A vizsgálat előtt hasznos az információ az anyag szerkezeti képletéről, gőznyomásáról, disszociációs állandójáról és hidrolíziséről (mint a pH függvénye).

Sok egyedi módszer áll rendelkezésre, amely az oldékonyság egész tartományát felöleli.

A két alább ismertetett módszer kiterjed az oldhatóság egész tartományára, de nem alkalmazható illékony folyadékokhoz. Az egyik, a 'lombikmódszer' főként alacsony oldékonyságú tiszta anyagoknál használható (< 10⁻²g liter) és amelyek stabilak vízben.

A tesztanyag vízben való oldhatóságára jelentősen hathat a szennyezések jelenléte.

1.2. Fogalom meghatározás és mértékegységek

Az anyag vízben való oldhatósága meghatározható az anyag telítettségi tömeg-koncentrációjával adott hőmérsékleten. Az anyag vízben való oldhatósága az oldat térfogatára számított tömegével jellemezhető. A SI-egység a kg/m³ (g/liter szintén használható).

1.3. Referencia anyagok

Új anyagok vizsgálatához referencia anyagokra nincs minden esetben szükség.

A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A minta hozzávetőleges mennyiségét és a telítettségi koncentráció eléréséhez szükséges időt egyszerű elővizsgálattal kell meghatározni.

1.4.1. Oszlop-elúciós módszer

Ez a módszer a vizsgálati anyagnak a mikro-oszlopról vízzel való kimosásán (elúció) alapszik; az oszlopot inert hordozóanyaggal töltik fel, ilyen anyag az üvegyöngy vagy a homok, amelyet a tesztanyag feleslegével kevernek össze. A vízoldhatóságot akkor lehet kinyilvánítani, ha a mosófolyadék (eluátum) tömegkoncentrációja állandó. Ezt a koncentráció plató mutatja az idő függvényében.

1.4.2. A lombik módszer

Ennél a módszernél az anyagot (a szilárdakat előbb el kell porítani) vízben feloldják a vizsgálatnál kissé magasabb hőmérsékleten. Amikor a telítődés bekövetkezik, a keveréket hűtik, majd a vizsgálati hőmérsékleten tartják keveréssel addig, amíg az egyensúly beáll. Más esetben a mérést közvetlenül a vizsgálati hőmérsékleten végzik, ha megfelelő mintavétel biztosítja azt, hogy a telítettségi egyensúlyt elérjék. Ezt követően az anyag tömegkoncentrációja vizes oldatban, amely nem tartalmaz semmilyen feloldatlan részt sem, az erre alkalmas analitikai módszerrel határozható meg.

1.5. Minőségi kritériumok

1.5.1. Ismételhetőség

Az oszlop elúciós módszernél <30%; a lombik módszernél <15%.

1.5.2. Érzékenység

Ez az analízis módszerétől függ, de a tömegkoncentrációkat 10^{-6} g/l-ig lehet meghatározni.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Vizsgálati körülmények

A vizsgálatot $20 \pm 0,5$ °C-on javasolt végezni. Ha az oldhatóságnál a hőmérsékletfüggés gyanúja felmerül (>3% °C-onként), további két hőmérsékleten, 10 °C-al a kezdeti hőmérséklet felett, illetve alatt is el kell végezni a vizsgálatot. Ebben az esetben a hőmérséklet kontrollnak $\pm 0,1$ °C-nak kell lennie.

A választott hőmérsékletet a berendezés minden fontos pontján tartani kell.

1.6.2. Előzetes vizsgálat

Kb. 0,1 g mintához (a szilárdakat el kell porítani) üveg dugós 10 ml-es mérőhengerbe desztillált vizet öntenek növekvő térfogatban szobahőmérsékleten az alábbi táblázatban megadott lépések szerint:

0,1 g oldani „x” ml vízben	0,1	0,5	1	2	10	100	>100
Közelítőleges oldhatóság (gr/l)	>1000	1000–200	200–100	100–50	50–10	10–1	<1

A keveréket a jelzett mennyiségű víz minden egyes hozzáadása után 10 percig erélyesen rázzák és ellenőrzik, hogy maradt-e feloldatlan rész a hengerben. Ha 10 ml víz hozzáadása után a minta vagy részei nem oldódtak fel, a kísérletet meg kell ismételni 100 ml-es mérőhengerrel és nagyobb víztérfogatokkal. Alacsonyabb oldhatóságnál az anyag feloldásához szükséges idő lényegesen hosszabb lehet (legalább 24 órás időtartamot kell hagyni). A közelítő oldhatóság a táblázatban található meg úgy, hogy közlik a hozzáadott víz térfogatát, amelyben a minta teljes oldódása bekövetkezik. Ha az anyag láthatóan oldhatatlan, 24 óránál hosszabb megfigyelési időt kell hagyni (maximálisan 96 óra), vagy további hígítást kell végezni, hogy bizonyossá váljék, hogy az oszlop-elúciós vagy a lombikos módszert kell alkalmazni.

1.6.3. Az oszlop-elúciós módszer

1.6.3.1. Hordozóanyag, oldószer, eluáló anyag

Az oszlop-elúciós módszerhez használt hordozóanyagnak inertnek kell lennie.

Lehetséges anyag az üveggyöngy és a homok. Analitikai tisztaságúnak kell lennie a megfelelő illékony oldószernek, amelyben a tesztanyagot feloldják. Eluáló folyadékként üveg vagy kvarckészülekből származó 2 x desztillált vizet kell használni.

Megjegyzés: Közvetlenül szerves ioncserélőből vett vizet nem szabad használni.

1.6.3.2. A hordozóanyag telítése

Kb. 600 mg hordozóanyagot kimérnek és 50 ml-es gömblombikba töltenek.

Az alkalmas mennyiségű kimért tesztanyagot a kiválasztott oldószerben feloldják. Megfelelő mennyiségű oldatot adnak a hordozóanyaghoz. Az oldószernek teljesen el kell párolognia például egy forgó párologtatóban; máskülönben a hordozóanyag vízzel való telítődése nem érhető el a segédanyag felületén a megoszlási hatás következtében.

A hordozóanyag telítése okozhat bizonyos nehézségeket (téves eredmények), ha a tesztanyag olajszerűen vagy kristályos fázisként lerakódik. A kérdést kísérletesen kell vizsgálni és a részletekről jelentést kell írni.

A kezelt hordozóanyagot kb. 2 órára kb. 5 ml vízben állni hagyják és aztán a szuszpenziót a mikro-oszlopba adagolják. Más esetben száraz hordozóanyagot is önthetnek a mikro-oszlopba, amelyet vízzel töltenek fel és az egyensúlyi állapotot kb. 2 óra múlva érik el.

Tesztelési eljárás

Az anyag kimosása – elúciója – a hordozóanyagról a két mód egyikével végezhető el:

– recirkulációs szivattyú (lásd az 1. ábrát)

– szintkiegyenlítő edény (lásd a 4. ábrát).

1.6.3.3. Oszlop-elúciós módszer recirkulációs szivattyúval

Készülék

A tipikus rendszer vázlata az 1. ábrán látható.

Az alkalmas mikro-oszlopot a 2. ábra tünteti fel, noha bármilyen méretű elfogadható, feltéve, hogy megfelel a reprodukálhatóság és az érzékenység kritériumainak. Az oszlopnak a fejrészben biztosítania kell legalább öt töltetnyi térfogatú vizet és legalább 5 mintát kell befogadnia.

A méretet lehet csökkenteni, ha utántöltésről gondoskodnak, hogy pótolják a kezdeti 5 térfogatnyi vizet, ami a szennyeződésekkel együtt távozik el.

Az oszlopot recirkulációs szivattyúval kell összekötni, amely képes az áramlás – 25 ml/óra – szabályozására. A szivattyút politetrafluoretilénből (P.T.F.E.) és/vagy üvegből készült vezetékkel csatlakoztatják. Az oszlopnak és a szivattyúnak összeszerelve biztosítaniuk kell a mintavételt és az egyensúly beállítását a fejrészben atmoszférikus nyomáson.

Az oszlopban elhelyeznek egy kis (5 mm-es) üvegyapot csomót, ez is a részecskék kiszűrését végzi. A recirkulációs szivattyú lehet membránszivattyú vagy perisztaltikus pumpa (ügyelni kell arra, hogy a cső anyagával semmilyen szennyeződés és/vagy abszorpció ne következzen be!).

Mérési eljárás

Az áramlás az oszlopon keresztül megindul. Az áramlási sebesség kb. 25 ml/óra legyen (ez felel meg a 10 töltetnyi víztérfogat/órának az ismertett oszlopnál). Az első 5 töltetnyi térfogatot el kell dobni, hogy eltávolítsák a vízdékony szennyeződések.

Ezt követően a recirkulációs szivattyú működésbe lép az egyensúly beálltáig, ami akkor következik be, ha 5 egymás után következő minta koncentrációja nem tér el egymástól átlagosan $\pm 30\%$ -nál jobban.

Ezeket a mintákat el kell különíteni egymástól olyan időközönként, amely megfelel legalább 10 töltetnyi eluáló folyadék térfogatnak.

1.6.3.4. Oszlop-elúciós módszer szintkiegyenlítő edénnyel

Készülék (lásd a 4. és 3. ábrát)

Szintkiegyenlítő edény: az összeköttetés a szintkiegyenlítő edénnyel üvegből készült csatlakozáson át PTFE csővel valósul meg. Ajánlatos 25 ml/óra áramlási sebességet alkalmazni.

Az egymás után következő eluátum-frakciókat gyűjteni és a kiválasztott módszerrel analizálni kell.

Mérési eljárás

A középső eluátum-tartományban azokat a frakciókat használják fel a vízdoldhatóság meghatározására, amelyekben a koncentrációk legalább 5 egymást követő frakcióban állandóak (30%-os eltéréssel).

Mindkét eljárásban (recirkulációs szivattyút vagy nyomáskiegyenlítő edényt használva) a második mérési sorozatot az első sorozat áramlási sebességének felével kell elvégezni. Ha az eredmények megegyeznek a két sorozatban, a vizsgálat kielégítő; ha az oldhatóság a kisebb áramlási sebességnél nyilvánvalóan nagyobb, akkor a felezett áramlási sebességgel addig kell folytatni a vizsgálatot, amíg két egymást követő sorozatban ugyanazt az oldhatóságot kapják.

Mindkét eljárásban (recirkulációs szivattyút vagy szintkiegyenlítő edényt használva) a frakciókat ellenőrizni kell a Tyndall-effektus (a fény szórása) vizsgálatával, hogy jelen van-e bennük kolloidális anyag. Ilyen részecskék jelenléte az eredményeket meghamisítja, ezért a vizsgálatot meg kell ismételni azzal a módosítással, hogy az oszlopban szűrést végeznek.

Minden egyes minta pH-ját regisztrálni kell. A második menetet ugyanazon a hőmérsékleten kell elvégezni.

1.6.4. Lombik módszer

1.6.4.1. Készülék

A lombik módszerhez a következő felszerelés szükséges:

- normál laboratóriumi üvegáru és berendezés,
- az oldat folyamatosan ellenőrzött hőmérsékleteken történő rázására alkalmas eszköz,
- centrifuga (lehetőleg termosztált), ha az emulziók miatt ez szükséges,
- eszköz az analitikai meghatározáshoz.

1.6.4.2. A mérési eljárás

Az anyag bizonyos mennyiségének telített oldatához szükséges víztérfogatot előzetes vizsgálattal becslik. A megkívánt víztérfogat az analitikai módszertől és az oldhatósági tartománytól függ. A fent meghatározott anyagmennyiség mintegy ötszörösét mérik be a három üvegedény mindegyikébe, amelyek üvegdugóval vannak ellátva (pl. centrifugacsövek, lombikok). Mindegyik edénybe meghatározott térfogatú vizet töltenek és az edényeket szorosan lezárják. A lezárt edényeket 30 °C-on rázzák. (A rázó vagy keverő berendezéshez állandó hőmérséklet kell, pl. mágneses keverő termosztált vízfürdőben.)

Egy nap múlva az egyik edényt eltávolítják és a vizsgálati hőmérsékleten alkalmi rázásokkal 24 órára új egyensúlyi helyzetet hoznak benne létre. Az edény tartalmát aztán a vizsgálati hőmérsékleten centrifugálják és az erre alkalmas analitikai módszerrel meghatározzák a tesztanyag koncentrációját a tiszta vizes fázisban. A másik két edényt hasonlóan kezelik a kezdeti ekvilibráció után 30 °C-on két, illetve 3 napon át. Ha legalább az utolsó két edényből kapott

koncentráció-mérések eredményei megfelelnek a kívánt reprodukálhatóságnak, akkor a vizsgálat eredménye kielégítő. A vizsgálatot hosszabb egyensúly-beállási idővel meg kell ismételni, ha az 1., 2. és 3. edény eredményei az értékek növekvő tendenciájúak.

A mérést el lehet végezni a 30 °C-os preinkubáció nélkül is. Abból a célból, hogy a telítettségi egyensúly beállításának a sebességét megbecsüljék, a mintákat akkor kell venni, amikor a keverési idő már nem befolyásolja a tesztoldat koncentrációját.

Minden egyes minta pH-ját regisztrálni kell.

1.6.5. Analízis

Az anyagspecifikus analitikai módszer ezeknél a meghatározásoknál előnyös, minthogy kis mennyiségű oldható szennyezések jelentős hibákat okozhatnak a mért oldhatóságban. Példák az ilyen módszerekre: gáz- vagy folyadékkromatográfia, titrálós módszerek, fotometriás módszerek, voltametriás módszerek.

2. ADATOK

2.1. Oszlop-elúciós módszer

A telítettségi plató legalább öt egymást követő mintájának középértékét minden egyes sorozatra ki kell számítani, hogy meghatározhassák a standard deviációt. Az eredményeket az oldat térfogatára számított tömegegységben kell megadni.

A különböző áramlási sebességgel végzett két vizsgálatban kapott középértékeket összehasonlítják. A vizsgálatok ismételtetőségi eltéréseinek kisebbnek kell lenni 30%-nál.

2.2. Lombik módszer

Az egyes eredményeket a három lombik mindegyikére meg kell adni és az állandó jellegűnek tekintett eredményeket (az ismételtetőségi eltérés kisebb 15%-nál) átlagolni kell és tömeg/térfogat egységben meg kell adni. Ez megkívánhatja a tömegegység újbóli átszámítását térfogategységre, felhasználva a sűrűséget, ha az oldhatóság igen magas (> 100 g/liter).

3. JELENTÉS

3.1. Oszlop-elúciós módszer

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az elővizsgálat eredményei,
- az anyag pontos specifikációja (azonosítás, szennyeződések),
- minden mintában az egyedi koncentrációk, áramlási sebességek és pH,
- a telítettségi plató legalább öt mintájának középértékei és standard deviációi minden mérési sorozatból,
- két egymást követő, elfogadható mérési sorozat átlaga,
- a víz hőmérséklete a telítődési folyamatban,
- az alkalmazott analitikai módszer,
- az alkalmazott hordozóanyag jellege,
- a hordozóanyag betöltése,
- a felhasznált oldószer,
- bizonyíték az anyag bármilyen kémiai instabilitására a vizsgálat folyamán és a bizonyítás módszere,
- az összes olyan információ és megjegyzés, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire és fizikai állapotára.

3.2. Lombik módszer

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az elővizsgálat eredményei,
- az anyag pontos specifikációja (azonosítás, szennyeződések),
- az egyedi analitikai meghatározások és azok átlagai, ha egyenél több meghatározás volt minden egyes lombikra,
- minden minta pH-ja,
- különböző lombikokból kapott, egyező értékek átlaga,
- vizsgálati hőmérséklet,
- az alkalmazott analitikai módszer,
- bizonyíték az anyag bármilyen kémiai instabilitására a vizsgálat folyamán és a bizonyítás módszere,
- az összes lényeges információ és megjegyzés, különösen az anyag szennyeződéseiről és fizikai állapotáról.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

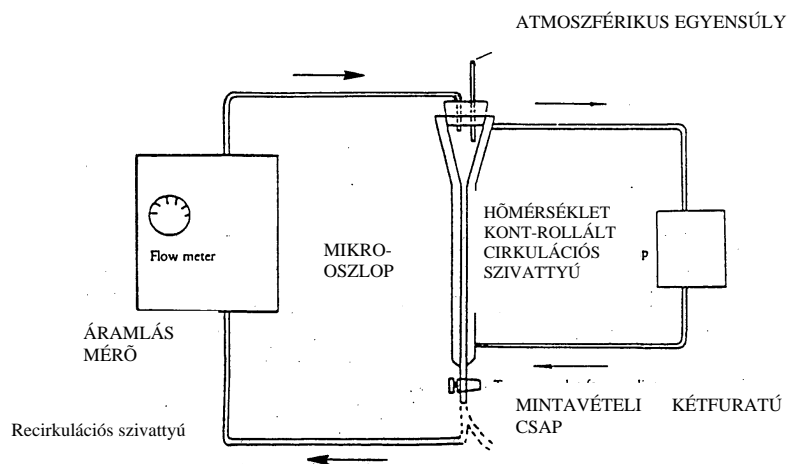
(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, Decision of the Council C (81) 30 final.

(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 low solubility – Flask method

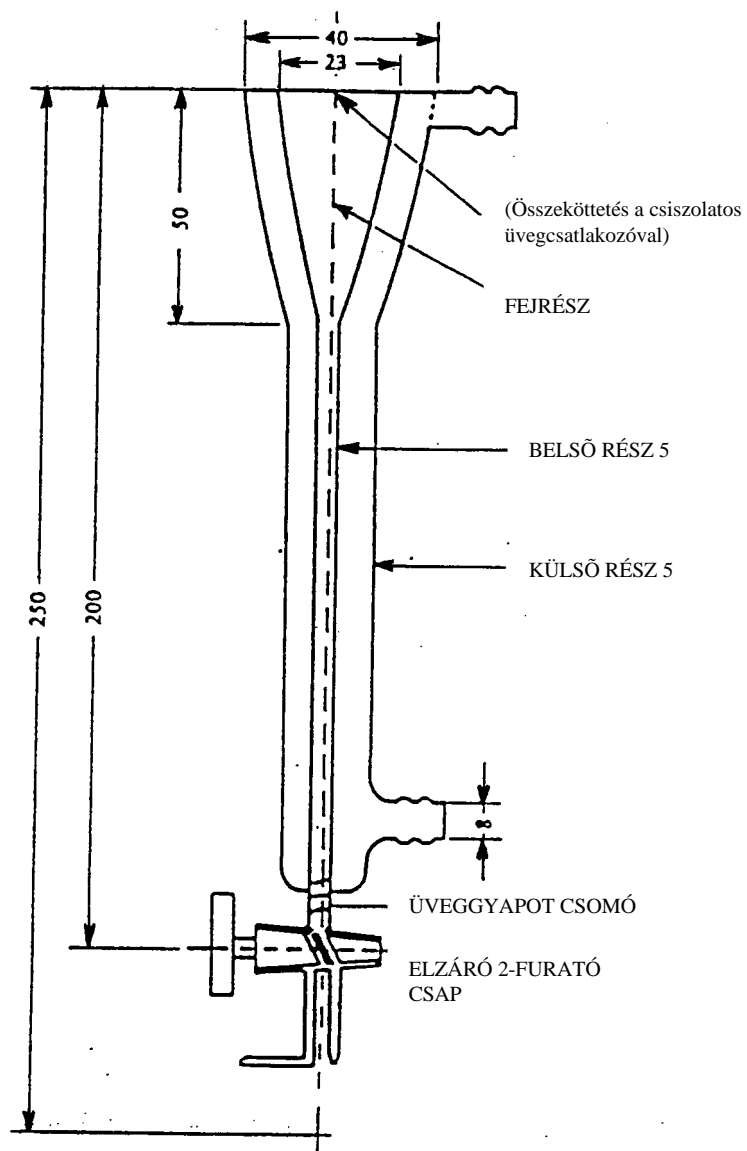
Függelék

1. ábra

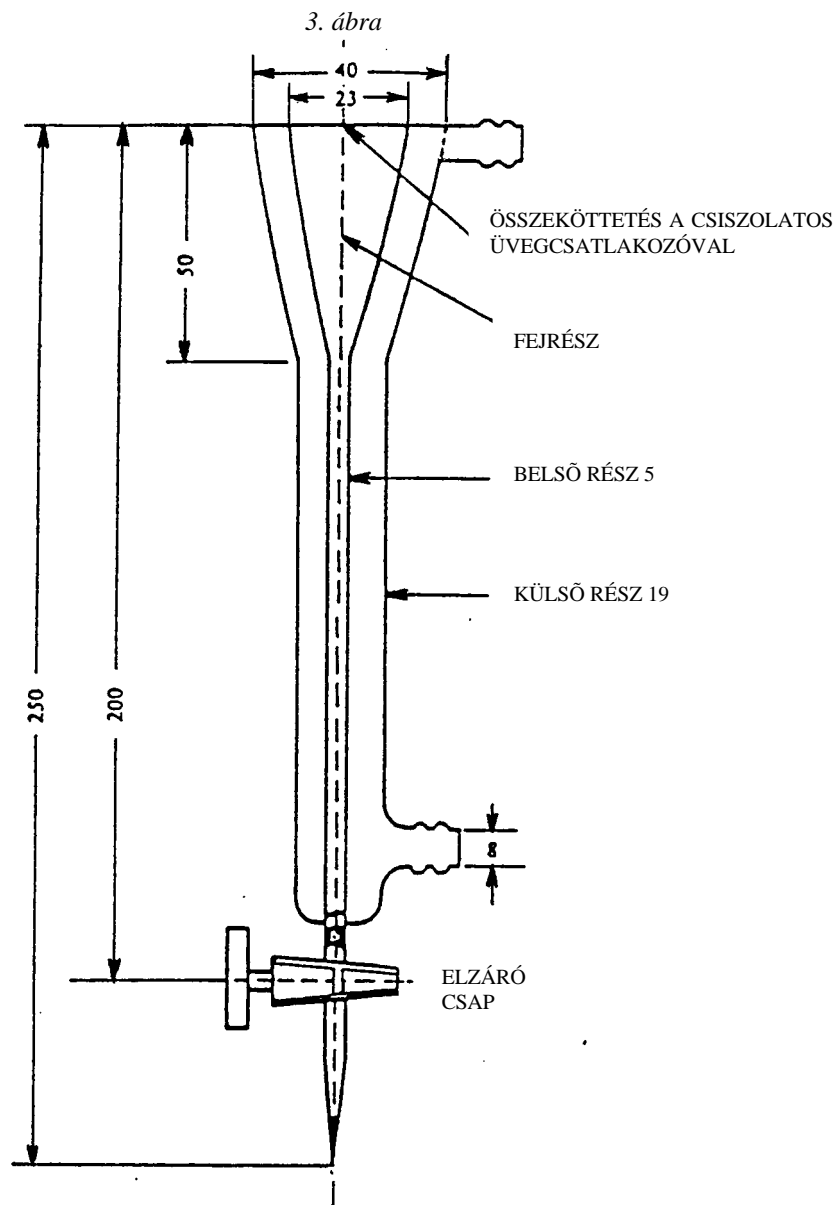


Oszlop-elúciós módszer recirkulációs szivattyúval

2. ábra

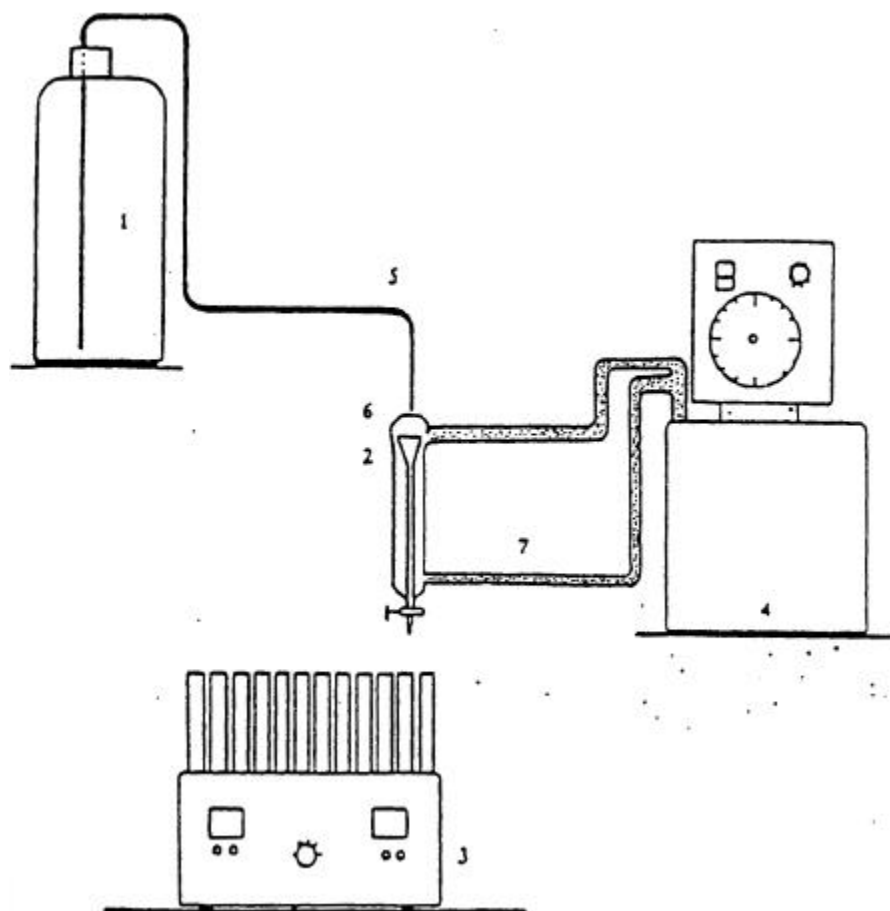


Tipikus mikro-oszlop
(Az összes dimenzió milliméterben)



Tipikus mikro-oszlop
(Az összes dimenzió milliméterben)

4. ábra



- 1 Szintkiegyenlítő edény
(pl. 2,5 l-es palack)
- 2 Oszlop (lásd a
3. ábrát!)
- 3 Frakciókollektor
- 4 Termosztát
- 5 Tefloncső
- 6 Csiszoltos üveg
csatlakozó
- 7 Vízvezeték
(a termosztát és az
oszlop között, belső
átmérő kb. 8 mm)

Oszlop-elúciós módszer szintkiegyenlítő edénnyel

A.7. – a pontot az EU törölte

A.8. MEGOSZLÁSI HÁNYADOS

1. MÓDSZER

A leírt kirázásos módszer az OECD Test Guideline-on alapul (1).

1.1. Bevezetés

A vizsgálat előtt hasznos az információ az anyag szerkezeti képletéről, disszociációs állandójáról, vízben való oldhatóságáról, hidrolíziséről, n-oktanolban való oldhatóságáról és a felületi feszültségéről.

Az ionizálható anyagok mérését csak nem ionizált állapotukban (szabad sav vagy szabad bázis) kell elvégezni, ezt alkalmas puffer felhasználásával lehet elérni, amelynek pH-ja legalább egy pH-egységgel kisebb (szabad savnál), illetve nagyobb (szabad bázisnál) mint a pK.

Ez a vizsgálati módszer két különálló eljárást foglal magába: a kirázásos módszert és a nagy hatékonyságú (nagy nyomású) folyadékkromatográfiát (HPLC). Az előbbit akkor alkalmazzák, ha a $\log P_{ow}$ érték (lásd alább a definíciót!) a (-2) és 4 közötti tartományba esik, az utóbbit pedig a 0–6 közötti tartományban. Mielőtt valamelyik kísérletes eljárást felhasználnák, először a megoszlási hányadost kell megbecsülni.

A kirázásos módszert csak főként a vízben és n-oktanolban oldható tiszta anyagoknál alkalmazzák. Nem használható felületaktív anyagoknál (amelyeknél a számított értékről vagy becslésről gondoskodni kell az n-oktanolban, illetve a vízben való oldhatóság alapján).

A HPLC módszer nem használható erős savaknál és bázisoknál, fémkomplexeknél, felületaktív anyagoknál vagy olyan anyagoknál, amelyek reagálnak az eluáló anyaggal. Ezeknél az anyagoknál az n-oktanolban illetve vízben való oldhatóság alapján a számított vagy becsült értéket meg kell adni.

A HPLC módszer a kirázásos módszerrel összehasonlítva kevésbé érzékeny a tesztanyagban lévő szennyeződésekre. Mindazonáltal, a szennyeződések olykor megnehezíthetik az eredmények értelmezését, mert a csúcs kijelölése bizonytalanná válik. A keverékeknel, amelyek egy határozatlan sávot adnak, a log P alsó és felső határait meg kell adni.

1.2. Fogalommeghatározás és mértékegységek

A megoszlási hányados (P) az oldott anyag egyensúlyi koncentrációinak (c_i) hányadosaként határozzák meg egy kétfázisú rendszerben, amely egymással többnyire nem elegyedő oldószerből áll. A víz és n-oktanol esetében:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{oktanol}}{C_{v\acute{e}z}}$$

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

1.3. Referencia anyagok

Kirázásos módszer

Új anyag vizsgálatánál referencia anyagok használata nem minden esetben szükséges.

A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék, és lehetővé tegyék az összehasonlítást a más módszerekkel kapott eredményekkel.

HPLC-módszer

Annak érdekében, hogy a vegyület mért HPLC-adatai korreláljanak a P értékével, kalibrációs görbét kell készíteni a log P és a kromatográfiás adatok összefüggéséről legalább 6 referencia ponton. Ez arra szolgál, hogy a felhasználó kiválaszthassa a megfelelő referencia anyagokat. Amikor csak lehetséges, legalább egy referencia anyag P_{ow} -ének a tesztanyagénál nagyobbaknak, egy másik referencia anyagának pedig kisebbnek kell lennie. A 4-nél kisebb log P értékekhez a kalibrációt a kirázásos módszerrel kapott adatokra lehet alapozni. A 4-nél nagyobb log P értékekhez a kalibrációt hitelesítésére vonatkozó irodalmi adatokra támaszkodva végzik, ha ezek megegyeznek a számított értékekkel. A nagyobb pontosság eléréséhez előnyös a referencia anyagokat úgy választani, hogy azok szerkezetileg rokonok legyenek a tesztanyaggal. A vegyi anyagok sok csoportjában a log P_{ow} értékek rendelkezésre állnak (2), (3). Ha a szerkezetileg rokon vegyületek megoszlási hányadosáról nincs adat, akkor sokkal általánosabb, más referencia anyagokkal létesített kalibrációt használnak.

Az ajánlott referencia anyagok és P_{ow} értékeit a 2. Függelék tartalmazza.

1.4. A módszer elve

1.4.1. Kirázásos módszer

A megoszlási hányados meghatározására a rendszer interakcióban lévő összes komponense között meg kell teremteni az egyensúlyt és az egyes fázisokban oldott anyagok koncentrációját meg kell határozni. A téma irodalma arra utal, hogy a kérdés, azaz a vizsgálati anyag egyensúlyi koncentrációjának a meghatározása a két fázis elkülönítése után a két fázis alapos elegyítésével több különféle technika segítségével is megoldható.

1.4.2. HPLC-módszer

A HPLC-t analitikai oszlopokon végzik; az oszlopokat a kereskedelemben kapható szilárd fázissal töltik, amely kémiaiilag a szilícium-dioxidhoz kötött, hosszú szénláncú szénhidrogénekből (pl. C_8 , C_{18}) áll. A vegyi anyagokat az oszlopra injektálják, amelyen különböző mértékben haladnak, mert a megoszlásuk különböző fokú a mozgó fázis és az álló szénhidrogén-fázis között. A vegyi anyagok keverékeit eluálják hidrofob tulajdonságuk sorrendjében, a vízdékony vegyi anyagok eluálódnak először, az olajban oldódók pedig utoljára a szénhidrogén-víz megoszlási hányadosuk arányában. Ez lehetővé teszi az ilyen oszlopon a kapcsolat megállapítását a retenciós idő és a meghatározandó n-oktanol/víz megoszlási hányados között. A megoszlási hányados levezethető a kapacitási faktorból:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

amelyben t_R = tesztanyag retenciós ideje, és a t_0 az oldószer molekuláknak az oszlopon való áthaladásához (holt idő) szükséges átlagos időtartama.

Kvantitatív analitikai módszerek használata nem követelmény, csak az eluciók időinek meghatározása szükséges.

1.5. Minőségi kritériumok

1.5.1. Ismételtetés

Kirázásos módszer

A megoszlási hányados pontosságának biztosítása érdekében párhuzamos meghatározásokat kell végezni három különböző vizsgálati feltétel között, amelyekben a specifikált anyag mennyisége, továbbá az oldószer térfogatok aránya változhat. A megoszlási hányados meghatározott értékeinek (logaritmusban kifejezve) $\pm 0,3$ log egység tartományba kell esni.

HPLC-módszer

A mérés megbízhatóságának növelése érdekében párhuzamos meghatározásokat kell végezni. Az egyedi mérésekből származtatott log P értékeknek $\pm 0,1$ log egység tartományba kell esni.

1.5.2. Érzékenység

Kirázásos módszer

A mérési tartományt az analitikai eljárás kimutatási határa szabja meg. Ennek lehetővé kell tennie a log P_{ow} értékek becslését -2 és 4 között (alkalmanként, ha a körülmények ezt megkívánják, tartomány a log $P_{ow} = 5$ -ig kiterjeszhető), akkor ha az oldott anyag koncentrációja egyik fázisban sem több $0,01$ mol/liternél.

HPLC-módszer

A HPLC-módszer képes a megoszlási hányados becslésére a 0 és 6 közötti log P_{ow} -tartományban. Szokásos esetben az anyag megoszlási hányadosa a kirázásos módszerrel mért érték ± 1 log egységen belül megbecsülhető. A szakirodalomban tipikus korrelációk találhatók (4), (5), (6), (7), (8). Rendszerint nagyobb pontosság érhető el, ha a korrelációs ábrát szerkezeti rokon referencia anyagokra alapozzák (9).

1.5.3. Specificitás

Kirázásos módszer

Nernst megoszlási törvénye csak állandó hőmérsékleten, nyomáson és pH-n érvényes a híg oldatokra. Szigorúan érvényes, ha tiszta anyag oszlik meg két tiszta oldószer között. Ha több különböző oldott anyag van egy vagy mindkét fázisban egyidejűleg, akkor ez befolyásolhatja az eredményeket.

Az oldott molekulák disszociációja vagy asszociációja eltérést eredményez Nernst megoszlási egyenletétől. Ezek az eltérések jelzik azt a tényt, hogy a megoszlási hányados függ az oldat koncentrációjától.

Mínthogy többszörös egyensúlyról van szó, a vizsgálati módszert korrekció nélkül nem lehet ionizálható vegyületeknél használni. Pufferoldatokat kell használni víz helyett ezeknél a vegyületeknél; a puffer pH-jának legalább 1 pH-egységgel kell eltérnie az anyag pK_a -értékétől és figyelembe kell venni ennek a pH-nak a jelentőségét a környezetre.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. A megoszlási hányados előzetes becslése

A megoszlási hányados jól becsülhető számítós módszer segítségével (lásd az 1. Függelék), vagy ahol az alkalmas, a tesztanyagoknak a tiszta oldószerekben való oldhatóságának hányadosából (10).

1.6.2. Kirázásos módszer

1.6.2.1. Előkészítés

n-Oktanol: a meghatározást nagy tisztaságú analitikai minőségű reagenssel kell elvégezni.

Víz: üvegben vagy kvarc-készülékben desztillált vagy kétszer desztillált vizet kell használni. Ionizálható anyagoknál víz helyett pufferoldatok használata indokolt.

Megjegyzés: A közvetlenül ioncserélőből vett vizet nem szabad használni.

1.6.2.1.1. Az oldószerek előzetes telítése

A megoszlási hányados meghatározása előtt az oldószer-rendszer fázisait kölcsönösen telíteni kell rázással a kísérlet hőmérsékletén. Ennek elvégzéséhez célszerű két nagy palack nagy tisztaságú analitikai minőségű n-oktanolt, illetve vizet összerázni egymással 24 órán át mechanikus rázógéppel, aztán azokat elég hosszú ideig állni kell hagyni, hogy a két fázis elkülönüljön és elérje a telítettségi állapotot.

1.6.2.1.2. Előkészületek a vizsgálathoz

A tesztedényt a kétfázisú rendszer közel teljes térfogatával kell feltölteni. Ez segíti az olyan anyagvesztés megelőzését, ami a párolgásból adódik. Az anyagok térfogathányadosait és mennyiségeit a következők alapján kell megszabni:

- a megoszlási hányados előzetes becslése (lásd fentebb),
- az analitikai eljáráshoz szükséges tesztanyag minimális mennyisége,
- a maximális koncentráció korlátozása mindkét fázisban $0,01$ mol/liter értékre.

Három vizsgálatot kell végezni. Az elsőben a n-oktanol és a víz számított térfogatarányát használják, a másodikban ezt a hányadost kettővel osztják; a harmadikban pedig megszorozzák kettővel (pl. $1:1$, $1:2$, $2:1$).

1.6.2.1.3. Tesztanyag

A törzsoldatot úgy készítik, hogy n-oktanolt előzetesen telítenek vízzel. A törzsoldat koncentrációját pontosan meg kell mérni, mielőtt felhasználnák a megoszlási hányados meghatározásához. Ezt az oldatot olyan körülmények között kell tárolni, hogy stabilitása biztosítva legyen.

1.6.2.2. Vizsgálati körülmények

A vizsgálati hőmérsékletet állandó szinten kell tartani (± 1 °C) és a tartománya 20–25 °C.

1.6.2.3. Mérési eljárás

1.6.2.3.1. A megoszlási egyensúly megteremtése

A kívánt, pontosan kimért mennyiségű két oldószert tartalmazó kettős tesztedényt valamennyi vizsgálatnál, a szükséges mennyiségű törzsoldattal együtt kell előkészíteni.

A n-oktanolos fázist térfogat szerint mérik be. A tesztedényeket megfelelő rázógéphez helyezik el, vagy kézzel rázzák. Ha centrifugacsövet használnak, akkor az ajánlott módszer a cső forgatása transzverzális tengelye körül 180 fokkal, hogy az összes oldott levegő távozzék mind a két fázisból. A tapasztalat azt mutatja, hogy 50 ilyen forgatás rendszerint elégséges a megoszlási egyensúly megteremtéséhez. E cél biztos eléréséhez 100 forgatás javasolt 5 perc alatt.

1.6.2.3.2. A fázisok elkülönítése

Amikor szükséges, akkor a fázisok elkülönítéséhez a keveréket centrifugálni kell. Ezt laboratóriumi centrifugával kell elvégezni szobahőmérsékleten, vagy ha a centrifugálás hőmérséklete nem szabályozható, a centrifugacsöveket a vizsgálati egyensúlyi hőmérsékleten tartják az analízis előtt legalább egy órával.

1.6.2.4. Analízis

A megoszlási hányados meghatározásához a tesztanyag koncentrációjának meghatározása mindkét fázisban szükséges. Ez úgy lehetséges, hogy mindkét fázisnál minden egyes csőből minden egyes vizsgálatnál alikvot részt vesznek, és azokat a kiválasztott módszerrel analizálják. A két fázisban a jelen levő teljes anyagmennyiséggel kell számolni, az eredményt össze kell hasonlítani az eredetileg bevitt anyag mennyiségével.

A vizes fázisból olyan eljárással kell mintát venni, hogy az n-oktanol maradékának a bevitelének a kockázata minimális legyen: a vizes fázisból történő mintavételhez eldobható tűvel ellátott üvegfecskendő használható. A fecskendőt kezdetben részlegesen levegővel kell megtölteni. A levegőt óvatosan ki kell engedni, miközben a tűt átvezetik a n-oktanol rétegén. A fecskendőbe elegendő térfogatú vizes fázist kell visszaszívni. A fecskendőt aztán gyorsan eltávolítják az oldatból, és a tűt lehúzzák. A fecskendő tartalmát vizes mintaként használják fel. A két elkülönített fázist lehetőleg az anyagra specifikus módszerrel kell meghatározni. Megfelelőek lehetnek az alábbi analitikai módszerek:

- fotometria,
- gázkromatográfia,
- HPLC.

1.6.3. HPLC-módszer

1.6.3.1. Előkészítés

Készülék

Az eljáráshoz pulzálásmentes szivattyúval és alkalmas detektáló készülékkel összekötött folyadékkromatográf szükséges. Ajánlatos injektáló hurokkal ellátott injektáló szelepet használni. Poláros csoportok jelenléte az álló fázisban súlyosan károsíthatja a HPLC-oszlop működését, ezért az álló fázis csak minimális százalékban tartalmazhat poláros csoportokat (11). A kereskedelembe kapható mikrorészecskés reverz fázis csomagok vagy előretöltött oszlopok is használhatók. Egy elötét-oszlopot is el lehet helyezni az injektáló rendszer és az analitikai oszlop közé.

Mozgó fázis

Az eluáló oldat készítéséhez HPLC-minőségű metanolt és HPLC-minőségű vizet használnak, amelyet a felhasználás előtt gázmentesítenek. Izokratikus eluciót kell használni. Legalább 25% víztartalommal kell megállapítani a metanol/víz arányt. A 3:1 térfogatarányban lévő metanol-víz elegy általában megfelelő a log P=6 vegyületek egy órán belüli eluálásához 1 ml/min áramlási sebességnél. Ha az anyag log P-je nagy, akkor szükségessé válik az eluciós idő csökkentése (az anyag referencia anyagainál is!) a mozgó fázis polaritásának csökkentésével vagy az oszlop hosszának csökkentésével.

Az n-oktanolban az igen kis oldékonyságú anyagok hajlamosak arra, hogy rendkívül kis log P_{ow} értékeket adjanak a HPLC-módszerrel; az ilyen anyagok csúcsai olykor az oldószert-fronthoz társulnak. Ez valószínűleg annak tulajdonítható, hogy a megoszlási folyamat az egyensúly eléréséhez túlságosan lassú ahhoz az időhöz képest, amely a HPLC-elváláshoz általában szükséges. Az áramlási sebesség csökkentése és/vagy az alacsonyabb metanol/víz arány hatásos lehet abban, hogy reális értéket kapjanak.

A teszt- és a referencia anyagoknak elégséges koncentrációban kell oldódnia ahhoz, hogy azokat ki lehessen mutatni. A metanol-víz elegyhez csak kivételes esetekben használható adalékanyag, minthogy az adalékanyagok megváltoztatják az oszlop tulajdonságait. Az adalékanyagokkal készült kromatogramokhoz is ugyanolyan típusú külön oszlopot kell használni. Ha a metanol-víz nem alkalmas, más szerves oldószert-víz elegy használható, például etanol-víz vagy acetonitril-víz elegy.

Az eluáló folyadék pH-ja az ionizálható vegyületeknél kritikus. Az oszlopban a műveletekhez bizonyos pH-tartomány szükséges, ami rendszerint 2 és 8 között van. A pufferolás ajánlatos. Különös gonddal kell elkerülni a sók kicsapódását és az oszlop károsodását, amely előfordulhat néhány szerves fázis/puffer keverékkel. A szilikagél-alapú álló fázisú HPLC-berendezéssel a mérések pH 8 felett nem tanácsosak, mert alkalikus mozgó fázis alkalmazása rövid idő alatt lerontaná az oszlop teljesítményét.

Oldott anyagok

A referencia anyagoknak a lehető legtisztábbnak kell lenniük. A vizsgálatra vagy kalibrálásra szánt anyagokat lehetőleg oldatban kell a mozgó fázisba vinni.

Vizsgálati körülmények

A mérések idején a hőmérséklet változásainak nem szabad ± 2 K-nál többnek lenni.

1.6.3.2. A mérés

A holt idő számítása

A holt idő meghatározható homológ sorok felhasználásával (például n-alkil-metil-keetonok) vagy szerves vegyületek (például tiokarbamid vagy formamid) felhasználásával. A holt idő számításához homológ sorokat alkalmazva egy homológ sor legalább hét tagját kell injektálni, majd az egyes holt időket meghatározni. A nyers retenciós időket $t_{r(n_c+1)}$ a t_{m_c} függvényeként, valamint a regressziós egyenes ordinátakülönbségét (a) és meredekségét (b) meg kell határozni:

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

ahol n_c = a szénatomok száma, holt idő (t_0) pedig következő:

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

Kalibrációs görbe

A következő lépés a log k – log P korreláció megállapítása a megfelelő referencia anyagok között. A gyakorlatban egy 5–10 tagból álló referencia anyag készletet, amelynek log P-értéke a várt tartományba esik, injektálnak egyidejűleg és meghatározzák a retenciós időket, lehetőleg egy regisztráló integrátoron, amelyet a detektáló rendszerhez kapcsolnak. A kapacitási faktorok – k – megfelelő logaritmusait kiszámítják és megadják a kirázásos módszerrel meghatározott log P függvényeként. A kalibrációt szabályos időközönként végzik el, legalább egyszer naponta, hogy az oszlop teljesítményében a lehetséges változásokat felismerjék.

A tesztanyag kapacitási faktorának meghatározása

A tesztanyagot a lehető legkisebb mennyiségben injektálják a mozgó fázisba. A retenciós időt meghatározzák (párhuzamos méréssel), hogy lehetővé tegyék a kapacitási faktor kiszámítását. A referencia anyagok korrelációs görbéjéből a tesztanyag megoszlási hányadosa interpolálható. Nagyon alacsony és nagyon magas megoszlási hányadosoknál extrapoláció szükséges. Ezekben az esetekben különös óvatossággal kell megállapítani a regressziós görbe konfidencia-határait.

2. ADATOK

Kirázásos módszer

A P meghatározott értékeinek megbízhatósága úgy vizsgálható, hogy a párhuzamos meghatározások átlagait összehasonlítják az összes meghatározás átlagával.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg az alábbi információkat kell magába foglalni:

- az anyag pontos specifikációja (azonosítás és szennyeződések),
- amikor a módszerek nem alkalmazhatók (pl. felületaktív anyagok), számított értéket vagy becslést kell közölni, az utóbbit a n-oktanolban, illetve a vízben való oldhatóság alapján kell megadni,
- az összes olyan információ és megjegyzés, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez, különös tekintettel az anyag szennyeződéseire és fizikai állapotára.

A kirázásos módszernél

- az előzetes becslés eredménye, ha van,
- a meghatározás hőmérséklete,
- a koncentrációk meghatározásához használt analitikai eljárások adatai,
- a centrifugálás időtartama és sebessége, ha használták,
- a mért koncentrációk mindkét fázisban minden egyes meghatározásban (ez azt jelenti, hogy az összes – 12 – koncentrációt közölni kell),
- a tesztanyag tömege, minden egyes tesztedényben alkalmazott minden egyes fázis térfogata és a tesztanyag teljes számított mennyisége minden egyes fázisban az egyensúly beállása után,

– a megoszlási hányados (P) számított értékeit és a középértékeket minden egyes vizsgálatnál közölni kell, ahogyan a középértéket pedig az összes meghatározásra kell megadni. Ha a megoszlási hányados koncentráció-függése felvetődik, azt szintén bele kell venni a jelentésbe,

- az egyedi P értékek standard deviációját a középérték mellett közölni kell,
- az összes meghatározásból származó P középértéket ki kell fejezni 10-es alapú logaritmus értékeként is,
- a számított elméleti P_{ow} , ha ezt az értéket meghatározták vagy mérték és értéke $> 10^4$,
- a felhasznált víz és a vizes fázis pH-ja a kísérlet folyamán,
- ha használtak puffereket, a pufferek víz helyett történő alkalmazásának indoklása, a pufferek összetétele, koncentrációja és pH-ja, a vizes fázis pH-ja a kísérlet előtt és után.

A HPLC-módszernél

- az előzetes becslés eredménye, ha van,
- a tesztanyagok és a referencia anyagok és tisztaságuk,
- a meghatározások hőmérséklet tartománya,
- pH, amelynél a meghatározásokat elvégezték,
- az analitikai és az előtét-oszlop adatai, a mozgó fázis és a detektálás eszközei,
- a kalibrációhoz használt referencia anyagok retenciós adatai és irodalmi log P értékei,
- az illesztett regressziós egyenes ($\log k - \log P$) adatai,
- a tesztanyag átlagolt retenciós adatai és interpolált log P értéke,
- elució profilkok,
- az oszlopba vitt tesztanyagok és referencia anyagok mennyisége,
- a holt idő és mérésének módja.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- (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 Sundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
- (5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219.
- (6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
- (7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.
- (8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.
- (9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.
- (10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band, I/1, 223-339.
- (11) R.R. 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. 71, 525.
- (16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. 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. Flag, 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.

1. Függelék

Számítási/beclsési módszerek

Bevezetés

Általános bevezetesként a számítási módszerekhez azt közli a Melléklet, hogy adatok és példák találhatóak a Handbook of Chemical Property Estimation Methods c. műben (a).

A P_{ow} felhasználható számított értékei:

- annak eldöntésére, hogy melyik módszer az alkalmas (kirázásos módszer tartománya: $\log P_{ow}$ -2-től 4-ig, HPCL-tartomány: $\log P_{ow}$ 0-tól 6-ig,
- a megfelelő vizsgálati feltételek kiválasztására (pl. referencia anyagok a HPLC-eljárásokhoz, a n-oktanol/víz térfogathányados a kirázásos módszernél),
- a lehetséges kísérleti hibák belső laboratóriumi ellenőrzéséhez,
- P_{ow} becsléséhez olyan esetekben, amelyekben kísérletes módszerek technikai okokból nem használhatók.

Beclsési módszer

A megoszlási hányados előzetes becslése

A megoszlási hányados értéke becsülhető a tesztanyagok tiszta oldószerekből való oldhatóságának felhasználásával.

$$P_{\text{becsült}} = \frac{\text{telítettség}_i \text{ C}_n \text{ - oktanol}}{\text{telítettség}_i \text{ c}_{\text{viz}}}$$

Számításos módszerek

A számításos módszerek elve

Valamennyi számításos módszer azon alapszik, hogy a molekulát fragmentálják olyan megfelelő szerkezeti elemekre, amelyekre megbízható $\log P_{ow}$ értékek ismertek. A molekula $\log P_{ow}$ -értéke aztán kiszámítható a megfelelő fragment-értékek összegéből, és tekintettel az intramolekuláris interakciókra, hozzá kell még adni a korrekciós tagot.

A fragment-konstansok és a korrekciós tagok jegyzéke megtalálható az irodalomban (b) (c) (d) (e). Néhányat közülük rendszeresen korszerűsítene (b).

Minőségi kritériumok

A számításos módszer megbízhatósága általában csökken a vizsgált vegyület komplexitásával.

Egyszerű, kis molekulatömegű, egy vagy két funkciós csoportot tartalmazó molekuláknál a 0,1–0,3 $\log P_{ow}$ egység eltérés várható a különféle fragmentációs módszerek eredményei és a mért értékek között. Összetettebb molekuláknál a hibásáv nagyobb lehet. Ez függ a fragment-konstansok megbízhatóságától és hozzáférhetőségétől, valamint attól, hogy felismerik-e az intramolekuláris interakciókat (pl. hidrogénkötések), és hogy helyesen használják-e a korrekciós kifejezéseket (kevesebb a probléma a CLOGP-3 számítógépes szoftverrel) (b). Ionizáló vegyületeknél fontos, hogy a töltést és az ionizáció mértékét megfelelő módon vegyék figyelembe.

Számítási eljárások

Hansch π -módszere

Az eredeti hidrofób szubsztituens konstans π – Fujita és munkatársai (f) vezették be, a fogalom meghatározása:

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

ahol $P_{ow}(\text{PhX})$ egy aromás származék megoszlási hányadosa és a $P_{ow}(\text{PhH})$ pedig az anyavegyületé. (Pl.:

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

E definíció szerint a π -módszer főként aromás szubsztitúcióra alkalmazható. A π -értékeket nagyszámú szubsztituensre határozták meg és táblázatba foglalták (b) (c) (d). Ezeket az aromás molekulák vagy szerkezeti elemek $\log P_{ow}$ értékeinek számítására használják.

Rekker módszere

Rekker szerint (g) a $\log P_{ow}$ értéke a következőképpen számítható:

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

ahol f_i reprezentálja a különböző molekuláris fragment-konstansokat és a_i az előfordulásuk frekvenciája a vizsgált molekulában. A korrekciós tag megadható egyetlen konstans többszörösének integráljaként (ún. 'magic constants'). A fragment-konstansokat f_i -t és C_m -t egy jegyzék alapján határozták meg, amely 1054 kísérleti P_{ow} értéket sorol fel (825 vegyület) a többszörös regressziós analízis felhasználásával (c) (h). Az interakciós tag meghatározását az irodalomban megtalálható szabályok szerint végezték el (e) (h) (i).

Hansch–Leo módszer

Hansch és Leo szerint (c) a $\log P_{ow}$ érték így számítható:

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

ahol f_i reprezentálja a különböző molekuláris fragment-konstansokat, F_j a korrekciós tagokat és a_i , b_j pedig az előfordulás frekvenciáját. Kísérleti P_{ow} értékekből való származtatással egy sor atom és csoportos fragment értékeket, valamint F_j korrekciós tagokat (ún. 'factors') határoztak meg fokozatos közelítéssel. A korrekciós tagokat több különböző osztályba sorolták (a) (c). Viszonylag bonyolult és időigényes az összes szabály és korrekciós tagok figyelembevétele. Szoftver csomagokat fejlesztettek ki (b).

Kombinált módszer

Az összetett molekula $\log P_{ow}$ értékének kiszámításán jelentősen javítani lehet, ha a molekula nagyobb szerkezeti elemekre bontható, amelyekre megbízható $\log P_{ow}$ értékek állnak rendelkezésre, akár táblázatból (b) (c), akár saját mérésekből. Ilyen fragmentek (pl. heterociklusos vegyületek, antrakinon, azobenzol) kombinálhatók aztán Hansch π -értékeivel vagy Rekker vagy Leo fragment-konstansokkal.

Megjegyzések:

(i) A számítási módszereket csak részben vagy teljesen ionizált vegyi anyagoknál lehet használni, ha lehetséges a szükséges korrekciós faktor figyelembevétele.

(ii) Ha intramolekuláris hidrogénkötéseket feltételeznek, a megfelelő korrekciós kifejezést (közelítőleg +0,6 – +1,0 $\log P_{ow}$ egység) kell hozzáadni (a). Ilyen kötések jelenlétét a molekulában sztereo-modellek és a spektroszkópiás adatok jelezhetik.

(iii) Ha több tautomér alak lehetséges, a legvalószínűbb alakot kell a számítás alapjának tekinteni.

(iv) A fragmentum konstansok jegyzékének revízióit figyelemmel kell kísérni.

Jelentés

A számítási/becslési módszerek alkalmazásánál a vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az anyag leírása (keverék, szennyeződések, stb.),
- valamely lehetséges intramolekuláris kötés, disszociáció, töltés és bármely szokatlan hatás feltüntetése,
- a számítási módszer leírása,
- az adatbázis készlet ismertetése vagy azonosítása,
- különleges szempontok a fragmentumok kiválasztásában,
- a számítások átfogó dokumentációja.

Irodalmi hivatkozások

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl, and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Properties 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. 1, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. – Chim. Ter., 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 Fragment Constant, Pharmacology 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.

2. Függelék

No	Referencia anyagok	Log P _{ow}	pKa
1	2-Butanon	0,3	
2	4-Acetilpiridin	0,5	
3	Anilin	0,9	
4	Acetanilid	1,0	
5	Benzil-alkohol	1,1	
6	p-Metoxifenol	1,3	pKa = 10,26
7	Fenoxiecetsav	1,4	pKa = 3,12
8	Fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4-Dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	Benzonitril	1,6	
11	Fenilacetonitril	1,6	
12	4-Metilbenzil-alkohol	1,6	
13	Acetofenon	1,7	
14	2-Nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	3-Nitrobenzoesav	1,8	pKa = 3,47
16	4-Klóranilin	1,8	pKa = 4,15
17	Ditrobenzol	1,9	
18	Fahéj-alkohol	1,9	
19	Benzoészav	1,9	pKa = 4,19
20	p-Krezol	1,9	pKa = 10,17
21	Fahéjsav	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anizol	2,1	
23	Metil-benzoát	2,1	
24	Benzol	2,4	pKa = 4,27
25	3-Metilbenzoesav	2,4	pKa = 9,1
26	4-Klórfenol	2,4	
27	Triklóretilén	2,6	
28	Atrazin	2,6	
29	Etil-benzoát	2,6	
30	2,6-Diklórbenzonitril	2,7	pKa = 3,82
31	3-Klórbenzoesav	2,7	
32	Toluol	2,7	pKa = 9,34
33	1-Naftol	2,8	
34	2,3-Diklóranilin	2,8	
35	Klórbenzol	2,9	
36	Allil-fenil-éter	3,0	pKa = 9,54
37	Brómbenzol	3,2	
38	Etilbezol	3,2	pKa = 0,79
39	Benzofenon	3,2	
40	4-Fenilfenol	3,3	
41	Timol	3,4	
42	1,4-Diklórbenzol	3,4	
43	Difenil-amin	3,6	pKa = 6
44	Naftalin	3,6	
45	Fenil-benzoát	3,7	
46	Izopropilbenzol	3,7	
47	2,4,6-Triklórfenol	4,0	
48	Bifenil	4,0	
49	Benzil-benzoát	4,1	
50	2,4-Dinitro-6-sec.-butilfenol	4,2	
51	1,2,4-Triklórbenzol	4,2	
52	Dodekánsav	4,2	
53	Difenil-éter	4,5	

No	Referencia anyagok	Log P _{ow}	pKa
54	n-Butilbenzol	4,5	
55	Fenantrén	4,5	
56	Fluorantén	4,7	
57	Dibenzil	4,8	
58	2,6-Difenilpridin	4,9	
59	Trifenil-amin	5,7	
60	DDT	6,2	
1	Nikotinsav	-0,07	Más referencia anyagok alacsony Log P _{ow} értékkel

A.9. LOBBANÁSPONT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálat megkezdése előtt hasznosak az információk az anyag gyúlékonyságáról. A vizsgálati eljárás olyan folyadékoknál alkalmazható, amelyek gőze gyújtóforrással meggyújtható. Az ebben a szövegben felsorolt vizsgálati módszerek csak olyan lobbanáspont-tartományokban használhatók, melyekre egyedi módszereket határoztak meg.

A módszer kiválasztásánál figyelembe kell venni az anyag és a mintatartó között a lehetséges kémiai reakciókat.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

A lobbanáspont az a 101,325 kPa nyomásra korrigált legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a folyadékból gőzök képződnek, a vizsgálati módszer meghatározott feltételei között olyan mennyiségben, hogy gyúlékony gőz/levegő elegy keletkezik a tesztedényben.

Egységek: °C, $t = T - 273$, 15 (t °C-ban és T K-ben)

1.3. Referencia anyagok

Új anyagok vizsgálatánál referencia anyagok használata nem minden esetben szükséges.

A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A módszer elve

Az anyagot tesztedényben helyezik és a leírt módszernek megfelelően melegítik, vagy hűtik a vizsgálati hőmérsékletre, majd gyújtási próbát végeznek annak kiderítésére, hogy a minta lobban-e vagy sem a vizsgálati hőmérsékleten.

1.5. Minőségi kritériumok

1.5.1. Ismételhetőség

Az ismételhetőség a lobbanáspont-tartomány és a felhasznált tesztmódszer szerint változik; maximálisan 2 °C.

1.5.2. Érzékenység

Az érzékenység a használt vizsgálati módszertől függ.

1.5.3. Specifitás

Néhány vizsgálati módszer specifitása bizonyos lobbanáspont-tartományokra korlátozódik és függ az anyag bizonyos jellemzőitől (pl. magas viszkozitás).

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Előkészítés

A tesztanyag mintáját az 1.6.3.1. pontban és/vagy az 1.6.3.2. pontban ismertetett tesztelési készülékben helyezik el. Biztonsági okból ajánlatos kisméretű mintát használni, kb. 2 cm³-nyi anyagot használnak energiadús vagy toxikus anyagokból.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

A készüléknek a lehető legbiztonságosabbnak kell lennie, és huzatmentes helyen kell elhelyezni.

1.6.3. A vizsgálat kivitelezése

1.6.3.1. Egyensúlyi módszer

Lásd az ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 és az ISO 3679 szabványokat.

1.6.3.2. Nem-egyensúlyi módszer

Abel-készülék

Lásd a BS 2000 part 170, NF M07-11 és a NF T66-009 szabványokat.

Abel–Pensky-készülék

Lásd az EN 57, DIN 51755 part 1 (5–65 °C-os tartományra), DIN 51755 part 2 (5 °C alatti hőmérsékletekre), NF M07-019 szabványokat.

„Tag készülék”

Lásd az ASTM D 56 szabványt.

Pensky–Martens készülék

Lásd az ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34, NF M07-19 szabványokat.

Megjegyzések

Ha a lobbanáspontot az 1.6.3.2. pontban leírt nem-egyensúlyi módszerrel meghatározva 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C vagy 55 ± 2 °C értékeket kapnak, akkor ezeket egyensúlyi módszerrel meg kell erősíteni ugyanazon készülék felhasználásával.

A bejelentéshez csak azokat a módszereket lehet felhasználni, amelyek a lobbanáspontot meg tudják adni.

Oldószeret tartalmazó viszkózus folyadékok (festékek, gumi és hasonlók) lobbanáspontjának meghatározásához csak olyan készülékek és módszerek használhatók, amelyek viszkózus folyadékok lobbanáspontjának meghatározásához alkalmasak.

Lásd az ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 (part 1.) szabványokban.

2. ADATOK

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg az alábbi információkat kell magába foglalni:

- az anyag pontos specifikációja (azonosság és szennyeződések),
- a felhasznált módszer, valamint az attól való bármilyen eltérés,
- az eredmények és minden olyan kiegészítő megjegyzés, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

Nincsenek.

A.10. GYŰLÉKONYSÁG (SZILÁRD ANYAGOK)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálatok megkezdése előtt hasznosak az információk az anyag lehetséges robbanó tulajdonságairól. A módszer csak por alakú, szemcsés vagy pasztaszerű anyagoknál alkalmazható.

Abból a célból, hogy ne vizsgáljanak minden meggyújtható anyagot, hanem csak azokat, amelyek hevesen égnek, vagy amelyek viselkedése égés közben bármilyen módon különösen veszélyes, olyan anyagokat tekintenek nagyon gyúlékonyak, amelyek égési sebessége meghalad bizonyos határértéket.

Különösen veszélyes lehet, ha az fémporokban terjed, mert nehézségekbe ütközik a tűz eloltása. A fémporokat nagyon gyúlékonyaknak kell tekinteni, ha tömegük meghatározott időn keresztül történő izzásának terjedését elősegítik.

1.2. Fogalommeghatározás és mértékegységek

Az égési időt másodpercben fejezik ki.

1.3. Referencia anyagok

Nem határozták meg.

1.4. A módszer elve

Az anyagot mintegy 250 mm hosszú, töretlen szalagba vagy porsávba formálják és elvégzik az előzetes szűrővizsgálatot annak meghatározására, hogy gázlángos gyújtásra az égés lánggal terjed vagy parázslik az anyag. Ha a terjedés 200 mm-es szakaszon belül meghatározott időn belül következik be, akkor az égési sebesség meghatározására a teljes vizsgálati programot végigvizslik.

1.5. Minőségi kritériumok

Nem határozták meg.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Előzetes szűrővizsgálat

Az anyagot mintegy 250 mm hosszúságban, 20 mm-es szélességben és 10 mm magasságban töretlen szalagba vagy porsávba formálják nem éghető, nem-porózus és alacsony hővezető képességű alaplapon. Gázégő forró lángját (átmérője legalább 5 mm) helyezik a porsáv egyik végéhez a por meggyulladásáig vagy maximálisan 2 percig (5 percig a fémek vagy fémötvözetek porához). Meg kell figyelni, hogy az égés a 200 mm-es hosszban a 4 perces vizsgálati időn belül (vagy 40 percen belül a fémporoknál) terjed-e végig. Ha az anyag nem gyullad meg és nem terjed az égés lánggal vagy parázssal a 200 mm-es szakaszon végig 4 percen belül (vagy 40 percen belül), akkor az anyagot nem kell nagyon gyúlékonynak tekinteni és nem szükséges további vizsgálat. Ha az anyagban az égés a 200 mm-es szakaszon végigterjed 4 percnél (vagy fémporoknál 40 percnél) rövidebb idő alatt, az alább (1.6.2. és az azt követő pontok) leírt eljárást kell használni.

1.6.2. Az égési sebesség vizsgálata

1.6.2.1. Előkészítés

Por alakú vagy szemcsés anyagokat lazán töltenek be 250 mm hosszú, 10 mm belső magasságú, 20 mm szélességű, háromszög-keresztmetszetű formába. A forma mindkét oldalán hosszanti irányban 2 fémlapot szerelnek (ábra). A formát aztán háromszor leejtik 2 cm magasságból szilárd felületre. Ha szükséges, a formát újból megtöltik. Az oldallapokat eltávolítják és a felesleges anyagot kikaparják. A forma tetejére nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető képességű alaplapon helyeznek, a készüléket megfordítják és a formát eltávolítják.

A paszttaszerű anyagokat nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető képességű alaplapon alakítják kötél formájúra (hossza 250 mm, keresztmetszete kb. 1 cm²).

1.6.2.2. Vizsgálati körülmények

Nedvességre érzékeny anyagoknál a vizsgálatot az anyagnak a tárolóedényből történő kivétele után a lehető leggyorsabban el kell végezni.

1.6.2.3. A vizsgálat kivitelezése

A vizsgálati anyagnyalábot elszívószekrény huzatában kell elhelyezni.

A légsebességnek elendőnek kell lennie ahhoz, hogy elkerüljék a füst kijutását a laboratóriumba és azt a vizsgálat alatt nem szabad megváltoztatni. Huzaternyőt kell emelni a készülék köré.

Gázégő forró lángját (legalább 5 mm átmérőjű) használják az anyag tömb meggyújtására az egyik végén. Amikor a tömb 80 mm-es távolságban ég, az égési sebességet a következő 100 mm-en mérik.

Ezt a vizsgálatot hatszor kell elvégezni, minden alkalommal tiszta hideg lemezt használva, hacsak nem kapnak már korábban pozitív eredményt.

2. ADATOK

Az előzetes szűrővizsgálatban (1.6.1.) kapott égési idő és a legfeljebb hat vizsgálatban (1.6.2.3.) mért legrövidebb égési idő kell a megfelelő értékeléshez.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az anyag pontos specifikációja (azonosítás és szennyeződések),
- a vizsgált anyag leírása, fizikai állapota, ideértve a nedvességtartalmat is,
- az előzetes szűrővizsgálat eredményei és az égési sebesség vizsgálatának eredményei, ha a végeztek ilyen vizsgálatot,
- az összes lényeges kiegészítő megjegyzés az eredmények értelmezéséhez.

3.2. Az eredmény értelmezése

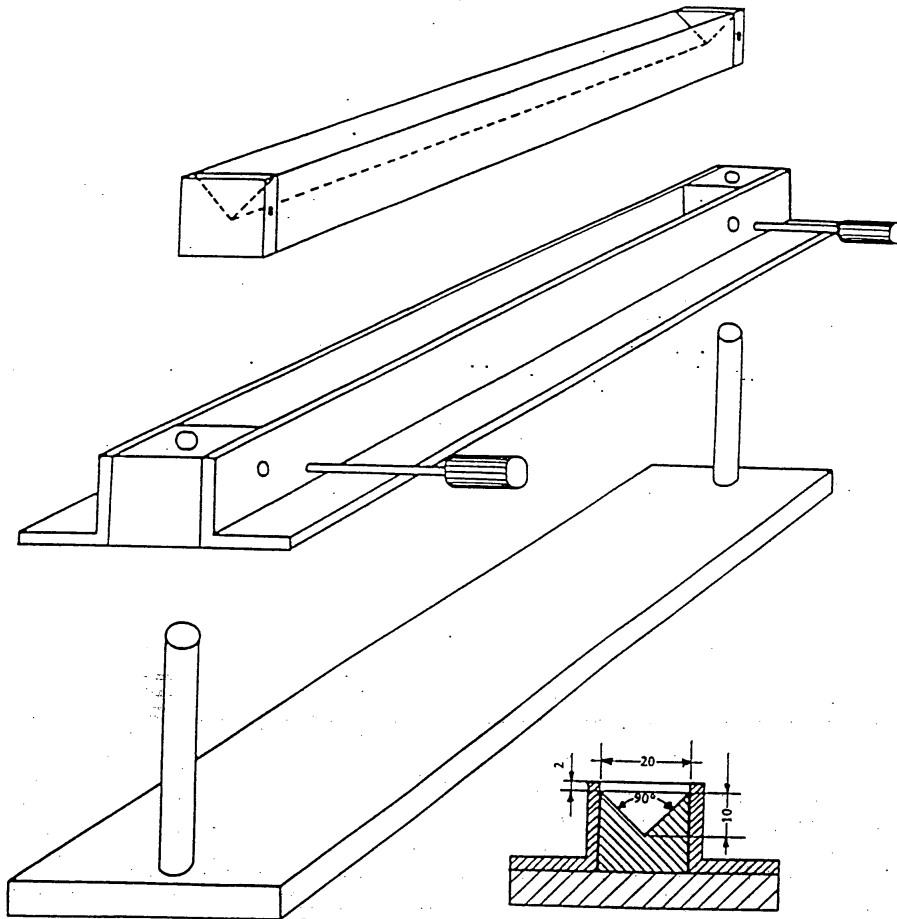
Por alakú, szemcsés vagy paszttaszerű anyagokat akkor kell nagyon gyúlékonynak tekinteni, ha az égési idő az 1.6.2. pontban foglalt vizsgálati eljárás szerint végzett bármely vizsgálatban kisebb 45 másodpercnél (sec). Fémek vagy fémötvözetek porát akkor kell nagyon gyúlékonynak tekinteni, ha azok meggyújthatók és a láng vagy a reakciózóna az egész mintán 10 perc vagy annál rövidebb idő alatt végigterjed.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

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

Függelék

Ábra



A FORMA HOSSZA: 250 MM
ANYAGA: ALUMÍNIUM

A forma és tartozékai az anyagyaláb előkészítéséhez (Az összes dimenzió milliméterben van megadva.)

A.11. GYÚLÉKONYSÁG (GÁZOK)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Ez a módszer lehetővé teszi annak meghatározását, hogy a levegővel elegyedett gázok szobahőmérsékleten (kb. 20 °C) és atmoszférikus nyomáson gyúlékonyak-e és ha igen, milyen koncentráció-tartomány felett. A vizsgált gáz levegővel alkotott, növekvő koncentrációjú elegyét elektromos szikra hatásának teszik ki és megfigyelik, hogy a gyulladás bekövetkezik-e.

1.2. Fogalommeghatározás és mértékegységek

A gyúlékonyság tartománya az a koncentráció-tartomány, amely az alsó és felső robbanási határérték között van. Az alsó és felső robbanási határok jelentik az éghető gáz koncentrációját a levegővel alkotott elegyben, amelynél a láng terjedése nem következik be.

1.3. Referencia anyagok

Nem határozták meg.

1.4. A módszer elve

A gáz koncentrációját a levegőben fokozatosan növelik és az elegyet minden szakaszban elektromos szikra hatásának teszik ki.

1.5. Minőségi kritériumok

Nem állapították meg azokat.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Készülék

A tesztedény függőlegesen álló üveghenger, amelynek belső átmérője legalább 50 mm, magassága legalább 300 mm. A gyújtó elektródok 3-5 mm távolságban vannak egymástól, és azokat a henger alja felett 60 mm-rel helyezik el. A hengert nyomásmentesítő nyílással látják el. A készüléket védőburkolattal veszik körül, hogy a robbanás bármilyen káros hatását korlátozzák.

Az indukciós szikrázás – állandó – időtartama 0,5 s, a szikrát nagyfeszültségű transzformátor állítja elő (maximális bemeneti teljesítménye 300 W, kimeneti feszültsége 10–15 kV), a szikrát gyújtóforrásként használják. Az alkalmas készülék példáját az irodalom ismerteti (2).

1.6.2. Vizsgálati körülmények

A vizsgálatot szobahőmérsékleten kell végezni (kb. 20 °C).

1.6.3. A vizsgálat kivitelezése

Adagoló szivattyúkat alkalmazva ismert koncentrációjú gáz-levegő elegyet juttatnak be az üveghengerbe. A szikra áthatol az elegyen és megfigyelik, hogy láng képződik-e a gyújtóforrásnál és szabadon terjed-e tovább vagy sem. A gáz koncentrációját 1%-onként változtatják, ameddig a gyulladás bekövetkezik a fent ismertetett módon.

Ha a gáz kémiai szerkezete azt jelzi, hogy nem gyúlékony és a levegővel a sztöchiometriai keverék összetétele kiszámítható, akkor a keverékek vizsgálatát 1%-os lépésekben csak abban a tartományban kell elvégezni, amely a sztöchiometriai összetételnél 10%-kal kisebb értéknél kezdődik és a sztöchiometriai összetételnél 10%-kal nagyobb értéknél végződik.

2. ADATOK

Ennek a tulajdonságnak a meghatározásához a láng terjedésének bekövetkezte az egyetlen megfelelő tájékoztató adat.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg az következő információkat kell magába foglalni:

- az anyag pontos specifikációja (azonosítás és szennyeződések),
- az alkalmazott készülék leírása, a méreteivel együtt,
- vizsgálati hőmérséklet,
- a vizsgált koncentrációk és a kapott eredmények,
- a vizsgálat eredménye: nem gyúlékony gáz vagy nagyon gyúlékony gáz,
- ha arra következtetnek, hogy a gáz nem gyúlékony, akkor azt a koncentráció-tartományt kell megadni, amelyben 1%-os eltérésekkel vizsgálták,
- az összes kiegészítő megjegyzés, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

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

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Hrosse-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. GYÚLÉKONYSÁG (ÉRINTKEZÉS VÍZZEL)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálati módszerrel azt lehet meghatározni, hogy az anyag vízzel vagy gőzzel végbemenő reakciója vezet-e olyan gáz vagy gázok veszélyes mennyiségben való képződéséhez, amelyek nagyon gyúlékonyak lehetnek. A vizsgálati módszert mind a szilárd, mind a folyékony anyagoknál alkalmazható. A módszer nem használható olyan anyagoknál, amelyek spontán meggyulladnak, ha a levegővel érintkeznek.

1.2. Fogalom meghatározások és mértékegységek

Nagyon gyúlékony az az anyag, amelyből vízzel vagy a levegő vízgőzével érintkezve olyan gáz vagy gázok képződnek veszélyes mennyiségben (legalább 1 liter/kg/óra), amelyek nagyon gyúlékonyak.

1.3. A módszer elve

Az anyagot az alább leírt módon több lépésben vizsgálják; ha gyulladás következik be bármelyik lépésben, akkor további vizsgálat nem szükséges. Ha ismert, hogy az anyag nem reagál hevesen a vízzel, akkor a 4. lépésig folytatódik a vizsgálat (1.3.4.).

1.3.1. – 1. lépés

A tesztanyagot desztillált vizet tartalmazó vályúszerű edénybe helyezik 20 °C-on és megfigyelik, hogy a képződött gáz meggyullad-e vagy sem.

1.3.2. – 2. lépés

A tesztanyagot szűrőpapírra helyezik, amely egy edényben lévő 20 °C-os desztillált víz felületén van és megfigyelik, hogy a képződött gáz meggyullad-e vagy sem.

1.3.3. – 3. lépés

A tesztanyagot olyan tömbbé formálják, amely kb. 2 cm magas és 3 cm átmérőjű. Néhány csepp vizet adnak a tömbhöz és megfigyelik, hogy a képződött gáz meggyullad-e vagy sem.

1.3.4. – 4. lépés

A tesztanyagot desztillált vízzel keverik össze 20 °C-on és a gázképződés mértékét óránként mérik, hét órán keresztül. Ha a gázképződés egyenetlen vagy növekvő, hét óra után a mérési időszakot meg kell hosszabbítani maximum 5 napra. A vizsgálatot meg lehet szakítani, ha a gázképződés mértéke meghaladja az 1 liter/kg értéket óránként.

1.4. Referencia anyagok

Nem határozták meg.

1.5. Minőségi kritériumok

Nem állapították meg.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. – 1. lépés

1.6.1.1. Vizsgálati körülmények

A vizsgálatot szobahőmérsékleten végzik (kb. 20 °C).

1.6.1.2. A teszt végrehajtása

A tesztanyagot kis mennyiségben (kb. 2 mm átmérővel) helyezik a desztillált vizet tartalmazó vályúszerű edénybe. Megfigyelik, hogy (i) képződik-e egyáltalán gáz, (ii) meggyullad-e a gáz. Ha a gáz meggyullad, akkor nem szükséges az anyag további vizsgálata, mert az anyagot veszélyesnek tekintik.

1.6.2. – 2. lépés

1.6.2.1. Készülék

Szűrőpapír lebeg az alkalmas edényben (pl. 100 mm átmérőjű párologtató csésze) lévő desztillált víz sima felszínén.

1.6.2.2. Vizsgálati körülmények

A vizsgálatot szobahőmérsékleten végzik (kb. 20 °C).

1.6.2.3. A vizsgálat kivitelezése

A tesztanyagot kis mennyiségben (kb. 2 mm átmérővel) helyezik a szűrőpapír közepére. Megfigyelik, hogy (i) képződik-e egyáltalán gáz, (ii) meggyullad-e a gáz. Ha a gáz meggyullad, akkor nem szükséges az anyag további vizsgálata, mert az anyagot veszélyesnek tekintik.

1.6.3. – 3. lépés

1.6.3.1. Vizsgálati körülmények

A vizsgálatot szobahőmérsékleten végzik (kb. 20 °C).

1.6.3.2. A vizsgálat kivitelezése

A tesztanyagot olyan tömbbé formálják, amely kb. 2 cm magas és 3 cm átmérőjű és a tetején horpadt. Néhány csepp vizet öntenek a mélyedésbe és megfigyelik, hogy (i) képződik-e egyáltalán gáz, (ii) meggyullad-e a gáz. Ha a gáz meggyullad, akkor nem szükséges az anyag további vizsgálata, mert az anyagot veszélyesnek tekintik.

1.6.4. – 4. lépés

1.6.4.1. Készülék

A készüléket az 1. ábrán látható módon állítják össze.

1.6.4.2. Vizsgálati körülmények

Ellenőrizni kell a tesztanyag tartályát, hogy van-e benne por

<500 µm (részecskeméret). Ha a por több, mint 1 tömeg %-ot tesz ki, vagy a minta morzsálódik, akkor a vizsgálat előtt az egész anyagot porrá kell őrölni, hogy figyelembe lehessen venni a részecskeméret csökkenését a tárolás és kezelés alatt; egyébként az anyagot úgy kell vizsgálni, ahogyan az érkezett. A vizsgálatot szobahőmérsékleten (kb. 20 °C) és atmoszférikus nyomáson kell végezni.

1.6.4.3. A vizsgálat kivitelezése

10–20 ml vizet öntenek a készülék csepegtető tölcserébe és az anyagból 10 g-ot helyeznek a kúp alakú üvegbe. A fejlődött gáz térfogatát bármilyen alkalmas eszközzel meg kell mérni. A csepegtető tölcser csapját kinyitják, hogy a vizet a kúp alakú üvegbe engedjék és megindítják a stopperórát. A gázképződést a hétórás időszak alatt minden órában megméri. Ha ebben az időszokban a gázképződés egyenetlen, vagy ha az időszak végére a gázképződés fokozódik, a mérés időtartamát 5 napra kell meghosszabbítani. Ha a mérés alatt a gázképződés bármikor túllépi az 1 liter/kg/óra mértéket, a vizsgálatot meg lehet szakítani. Ezt a vizsgálatot három párhuzamos méréssel kell végezni.

Ha a gáz kémiai összetétele nem ismeretes, a gázt analizálni kell. Ha a gáz igen gyúlékony komponenseket tartalmaz és arról sincs információ, hogy az egész elegy erősen gyúlékony-e, akkor ugyanolyan összetételű elegyet kell készíteni és azt az A.11.-ben megadott módszer szerint kell tesztelni.

2. ADATOK

Az anyagot akkor tekintik veszélyesnek, ha

- a vizsgálat bármely szakaszában spontán meggyullad, vagy
- gyúlékony gáz 1 liter/kg anyag/óra értéknél nagyobb mennyiségben képződik.

3. JELENTÉS

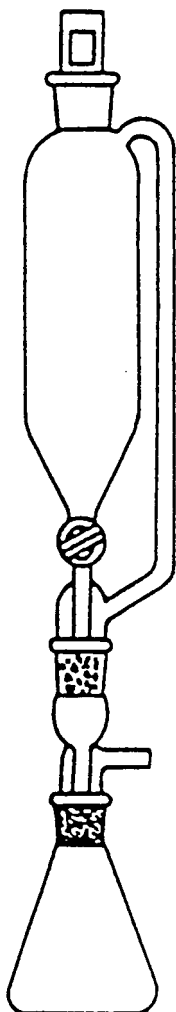
A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az anyag pontos specifikálása (azonosság, szennyeződések),
- a tesztanyag bármilyen előkészítésének adatai,
- a vizsgálat eredményei (1., 2., 3. és 4. lépés),
- a képződött gáz kémiai azonossága,
- a gázképződés mértéke, ha a 4. lépés megtörtént,
- bármely egyéb megjegyzés, ami lényeges az eredmények értékeléséhez.

4. SZAKIRODALMI HIVATKOZÁSOK

(1) Recommendations on the transport of dangerous goods, tests 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 hydrolysis of solid and liquid products.



1. ábra
Készülék

A.13. SZILÁRD ANYAGOK ÉS FOLYADÉKOK ÖNGYULLADÁSI KÉPESSÉGE

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálati eljárás olyan szilárd és folyékony anyagoknál használható, amelyek kis mennyisége szobahőmérsékleten (kb. 20 °C) a levegővel érintkezve rövid időn belül spontán meggyullad. Ez a vizsgálati módszer nem terjed ki az olyan anyagokra, amelyek expozíciója a levegővel szobahőmérsékleten több órát vagy napot igényelne, vagy magasabb hőmérsékleten következne be a gyulladásuk.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

Azok az anyagok tekintendők öngyulladónak (pirofórosnak), amelyek az 1.6. pontban ismertetett feltételek mellett meggyulladnak vagy elszenesedést okoznak. A folyadékok öngyulladásának vizsgálata szintén szükséges lehet az A.15. Öngyulladási hőmérséklet (folyadékok és gázok) c. fejezetben lévő módszer felhasználásával.

1.3. Referencia anyagok

Nem határozták meg.

1.4. A módszer elve

A szilárd vagy folyékony anyagot inert vivőanyaghoz adják és környezeti hőmérsékleten 5 percen át. Hagyják érintkezni a levegővel. Ha a folyadék nem gyullad meg, akkor a folyadékot szűrőpapírral felitatják és a környezet hőmérsékletén (kb. 20 °C) kiteszik a levegőre szintén 5 percre. Ha a szilárd vagy a folyékony anyag meggyullad, vagy a folyadék meggyújtja vagy elszenesíti a szűrőpapírt, akkor az anyagot öngyulladónak tekintik.

1.5. Minőségi kritériumok

Ismételhetőség: minthogy a biztonság szempontjából igen jelentős, egyetlen pozitív eredmény elégséges ahhoz, hogy az anyagot pirofórosnak tekintsék.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Készülék

Kb. 10 cm átmérőjű porceláncsészét diatómafölddel töltenek meg mintegy 5 mm magasságban szobahőmérsékleten (kb. 20 °C).

Megjegyzés

Az általában beszerezhető diatómaföldet vagy bármilyen más hasonló inert anyagot úgy kell tekinteni, hogy azok a talajt reprezentálják, amelybe a tesztanyag balesetknél beszivároghat. A folyadékok vizsgálatához száraz szűrőpapír szükséges, ami a levegővel érintkezve nem gyullad meg, ha érintkezik az inert vivőanyaggal.

1.6.2. A vizsgálat kivitelezése

a) Por alakú szilárd anyagok

1-2 cm³-nyi por alakú tesztanyagot mintegy 1 m hosszúságban nem éghető felületre öntenek és megfigyelik, hogy az anyag 5 percen belül meggyullad-e.

A vizsgálatot hatszor végzik el, hacsak az anyag előbb meg nem gyullad.

b) Folyadékok

Kb. 5 cm³-nyi tesztfolyadékot öntenek az előkészített porceláncsészébe és megfigyelik, hogy az anyag meggyullad-e 5 percen belül.

Ha a 6 vizsgálatban nem következik be a gyulladás, akkor a következő vizsgálatokat végzik el: a bevagdosott szűrőpapírdarabra fecskendőből 0,5 ml tesztmintát fecskendeznek és megfigyelik, hogy bekövetkezik-e 5 percen belül a szűrőpapír meggyulladása vagy elszenesedése.

A vizsgálatot háromszor végzik, hacsak a szűrőpapír hamarabb nem gyullad meg vagy szenesedik el.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények feldolgozása

A vizsgálatot meg lehet szakítani, ha bármelyik vizsgálat eredménye pozitív.

2.2. Értékelés

Ha az anyag 5 percen belül meggyullad, amikor inert vivőanyaghoz adják és levegő hatásának teszik ki, vagy a folyadék elszenesíti vagy 5 percen belül meggyújtja a szűrőpapírt, ha arra helyezik, akkor az anyagot öngyulladónak tekintik.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- az anyag pontos specifikációja (azonosítás és szennyeződések),
- vizsgálati eredmények,
- az összes kiegészítő lényeges megjegyzés az eredmények értelmezéséhez.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

(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. ROBBANÁSI TULAJDONSÁGOK

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A módszer vázlatosan ismerteti azt a vizsgálati rendszert amellyel meghatározzák, hogy a szilárd vagy paszttaszerű anyagok robbanásveszélyesek-e, amikor azokat láng hatásának (hőérzékenység) illetve ha ütésnek vagy súrlódásnak (érzékenység mechanikai hatásokra) teszik ki, illetve hogy a folyadék robbanásveszélyes-e, ha láng vagy ütés éri.

A módszer három részből áll:

- a) a hőérzékenység vizsgálata (1),
- b) a mechanikai érzékenység vizsgálata ütésre (1),
- c) a mechanikai érzékenység vizsgálata súrlódásra (1).

A módszerrel kapott adatok alapján megbecsülik bizonyos szokványos stimulussal kiváltott robbanás valószínűségét. A módszernek nem az a célja, hogy kiderítsék az anyag képes-e robbanásra bármilyen egyéb feltételek között.

A módszer alkalmas annak meghatározására, vajon egy anyag robbanásveszélyt jelent-e (hő- és mechanikai érzékenység) az irányelvben meghatározott különleges feltételek között. A módszert többféle típusú készülékre alapozták, amelyeket széles körben, nemzetközi szinten használnak (1), és amelyek rendszerint kielégítő eredményeket adnak. Felismerték, hogy a módszer nem határozott. Többféle készülék is használható, feltéve, hogy nemzetközileg elismerik azt és az eredmények megfelelően korrelálnak az itt specifikált készülékkel kapott eredményekkel.

A vizsgálatot nem szükséges elvégezni, ha a rendelkezésre álló termodinamikai információ (pl. képződéshő, bomláshő) és/vagy a szerkezeti képletben bizonyos reaktív csoportok hiánya (2) lehetővé teszi annak megállapítását, hogy az anyag nem képes gázképződéssel járó heves bomlásra vagy hő felszabadítására (azaz az anyag nem jelenti a robbanás semmilyen kockázatát sem). A mechanikai érzékenység vizsgálatát a súrlódásra folyadékoknál nem kívánják meg.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

Robbanóképesség

Azok az anyagok képesek robbanásra, amelyek láng hatására robbanhatnak, vagy amelyek ütésre, súrlódásra érzékenyek a specifikus készülékben (vagy amelyek mechanikai szempontból érzékenyebbek az 1,3,-dinitrobenzonnál az alternatív készülékben).

1.3. Referencia anyagok

A súrlódási és ütési módszerekhez technikai, kristályos, 0,5 mm-es szitán átszitált 1,3-dinitrobenzolt használnak.

A súrlódási és ütések vizsgálat második sorozatában vizes ciklohexanonból átkristályosított, 250 µm-es szitán nedvesen szitált majd 150 µm szitán fennmaradt és 103 ±2 °C-on 4 órán át szárított perhidro-1,3,5 – trinitro-1,3,5-triazint (RDX, hexogén, ciklonit – CAS száma 121-82-4) használnak.

1.4. A módszer elve

Ahhoz, hogy megállapíthassák a biztonsági feltételeket a három érzékenységi vizsgálat elvégzéséhez előzetes vizsgálatok szükségesek.

1.4.1. Vizsgálatok az anyag biztonságos kezeléséhez (3)

Biztonsági okokból a fő vizsgálat előtt, igen kis mennyiségű tesztanyagot (kb. 10 mg) közvetlen lánggal hevítenek korlátozás nélkül, megfelelő készülékben rázzák vagy súrlódásnak teszik ki fakalapáccsal és üllővel, vagy bármilyen más alkalmas eszközzel.

A cél annak kiderítése, hogy az anyag olyan érzékeny és robbanóképese-e, hogy az előírt érzékenységi vizsgálatoknál, főként a hőérzékenységi vizsgálatnál szükség van-e speciális óvintézkedésekre annak érdekében, hogy a vizsgálatot végző személy ne sérüljön meg.

1.4.2. Hőérzékenység

A módszer alkalmazásakor a tesztanyagot acélcsőben hevítik. A cső száját olyan lemezekkel zárják le, amelyeken különböző átmérőjű nyílások vannak. Azt határozzák meg, hogy az anyag hajlamos-e robbanásra az erős hevítés és a meghatározott fokú fojtás körülményei között.

1.4.3. Mechanikai érzékenység (ütésre)

A módszerrel az anyagot ütésnek teszik ki úgy, hogy meghatározott tömeget dobnak rá meghatározott magasságból.

1.4.3. Mechanikai érzékenység (súrlódásra)

A módszerrel a szilárd vagy a paszttaszerű anyagot súrlódásnak teszik ki standardizált felületek között meghatározott terheléssel és relatív elmozdulással.

1.5. Minőségi kritériumok

Nem állapították meg.

1.6. A módszerek leírása

1.6.1. Hőérzékenység (láng hatása)

1.6.1.1. Készülék

A készülék egyszerűhasználatos acélcsőből áll, amely újra használható zárólemezzel (blende) van ellátva (1. ábra). A csövet hevítő és védő berendezésben helyezik el. A csövek acéllemezből készültek (lásd a Függelékben), belső átmérőjük 24 mm, hosszuk 75 mm, falvastagságuk 0,5 mm. A csövek nyitott végükön peremmel vannak ellátva, hogy lezárhatóak legyenek egy zárólemez (blende) illesztésével. Ez utóbbi nyomásálló zárólemez, központi nyílással, amely szorosan illeszthető a csőhöz kétrészes csatlakozással (menetes karima + anya). Az anya és a menetes karima króm-mangán acélból készültek (lásd a Függelékben), amely szikramentes 800 °C-ig. A zárólemezek (blendék) 6 mm vastagok, anyaguk hőálló acél (lásd a Függelékben) és különböző átmérőjű nyílással vannak ellátva.

1.6.1.2. Vizsgálati körülmények

Az anyagokat rendszerint úgy vizsgálják, ahogyan azok a vizsgálat helyszínére érkeznek, bizonyos esetekben azonban, ha tesztanyagokat például préssel, öntéssel vagy más módon tömörítették, a tesztanyagot apróra törés után kell vizsgálni.

Szilárd anyagoknál az egyes vizsgálatokban felhasznált anyag mennyiségét két szakaszban, száraz eljárással határozzák meg. Egy kitárított csövet megtöltenek 9 cm³-nyi anyaggal és az anyagot 80 N erővel tömörítik a cső teljes keresztmetszetében. Biztonsági okból olyan esetekben, amelyekben a minta fizikai állapotát az összenyomás megváltoztathatja, más töltési eljárásokat használhatnak. Például, ha az anyag nagyon érzékeny a súrlódásra, akkor a tömörítés nem alkalmazható. Ha az anyag összenyomható, akkor több is adagolható belőle és tovább addig tömöríthető, amíg a cső felső vége alatt 55 mm-re van feltöltve. A teljes töltési tömeget az 55 mm-es szintig meghatározzák, majd a töltési tömeget kétszer növelik, mindkét alkalommal döngölést végeznek 80 N-nal. Még tovább adhatják az anyagot a csőbe (illetve vehetnek el) és tömöríthetnek, amíg a töltési szint a cső felső végétől 15 mm-re nem lesz.

A második száraz szakasz végrehajtását az első száraz szakaszban meghatározott teljes döngölt mennyiség egyharmadával kezdik. Több, mint kétszer adnak hozzá (vagy vesznek el) még anyagot 80 N-os tömörítéssel úgy, hogy az anyag szintje a cső felső végétől 15 mm-re legyen. Valamennyi próbához a második szakaszban meghatározott anyagmennyiséget használják fel; a töltést három egyenlő mennyiségben végzik, mindegyiket 9 cm³-re sűrítik össze, akármeckora erő is szükséges hozzá. (A műveletet menetes gyűrűvel lehet megkönnyíteni.)

A folyadékokat és a géleket a csőbe 60 mm magasságban töltik be, közben külön figyelnek arra, hogy a gélek ne képezzenek üregeket. A menetes karimát alulról a csőre csúsztatják, a megfelelő zárólemezt (blendét) elhelyezik és az anyát megszorítják. Kenőanyagként kis mennyiségű molibdén-szulfidot használnak. Lényeges annak ellenőrzése, hogy nem jutott-e tesztanyag a perem és a lemez közé vagy a csavarmentetbe.

A hevítésről nyomásszabályozóval ellátott (60–70 mbar) ipari gázpalackból propánnal gondoskodnak. A gáz áramlásmérőn áramlik át és egyenlően oszlik meg a négy gázégő között (vizuálisan a láng megfigyelésével ellenőrizhető). A gázégőket a vizsgálati kamra körül helyezik el az 1. ábrán látható módon. A négy gázégő fogyasztása kb. 3.2 liter propán percenként. Másfajta gázt vagy égőt is lehet használni, azonban a fűtés mértékének olyannak kell lennie, amelyet a 3. ábra meghatároz. A fűtés mértékét időszakosan valamennyi készüléknél dibutil-ftaláttal töltött csövekkel ellenőrizni kell, amint azt a 3. ábra bemutatja.

1.6.1.3. A vizsgálat kivitelezése

Minden egyes vizsgálatot addig kell végezni, amíg vagy a cső nem reped/törik szét, vagy amíg a csövet öt percig nem hevítették. Ha a vizsgálat azt eredményezi, hogy a cső három vagy több darabra esik szét; néhány esetben vékony fémcsíkokkal lehetnek egymással a fragmentumok összekötésben, amint azt a 2. ábra bemutatja, akkor ez robbanásként értékelhető. Ha kevesebb a fragmentum vagy a fragmentáció nem következik be, a megfigyeltet nem tekintik robbanásnak.

A három vizsgálatból álló sorozatot a 6,0 mm-es nyílással ellátott zárólemezzel (blende) alkalmazásával kezdik meg, és ha nem következett be robbanás, akkor a 20 mm-es nyílással ellátott zárólemez felhasználásával szintén három vizsgálatból álló második sorozatot végzik el. Ha bármelyik vizsgálati sorozatban robbanás előfordul, a vizsgálatot nem kell tovább folytatni.

1.6.1.4. Értékelés

A vizsgálat eredményeit pozitívnak tekintik, ha bármelyik fenti vizsgálati sorozatban robbanás következik be.

1.6.2. Mechanikai érzékenység (ütésre)

1.6.2.1. Készülék (4. ábra)

A tipikus ejtőkalapácsos készülék lényeges részei: öntvényacél tömb az alaplappal, üllő, oszlop, ejtősúlyok, kioldó szerkezet és a mintatartó. Az acélüllő (átmérője 100 mm – magassága 70 mm) egy acéltömb (hossza 230 mm – szélessége 250 mm – magassága 200 mm) tetejére van csavarozva az alaplappal (hossza 450 mm – szélessége 450 mm – magassága 60 mm) együtt. Az oszlop varrat nélküli acélcsőből készült, egy tartóra van szerelve az acéltömb tetejére. A készüléket négy csavar rögzíti a szilárd alaplaphoz (60 x 60 x 60 cm), hogy a vezető sínek teljesen függőlegesek legyenek és az ejtősúly szabadon essék. 5 és 10 kg-os tömegű, tömör acélból készült súlyokat használnak. Minden súly ütőtűskéje edzett acélból van (HRC 60 – HRC 63) és a súlyok átmérője legalább 25 mm.

A vizsgálandó mintát egy ütészivsgáló készülékbe zárják, amely két koaxiális, tömör acélból készült hengerből áll, egyik a másik felett helyezkedik el egy hengeres acél vezetőgyűrű bemélyedésében. A hengereknek 10 (–0,003 – –0,005) mm átmérőjűnek és 10 mm magasnak, csiszolt felületűnek, lekerekített szélűnek (a görbület sugara 0,5 mm), HRC 58–HRC 65 keménységűnek kell lenni. A hengermélyedésnek 16 mm-es átmérőjűnek kell lenni, csiszolt kalibere/furata 10 (+0,005 – +0,010) mm-es, magassága 13 mm. Az ütőkészülék egy közbeeső üllőre van szerelve (átmérője 26 mm – magassága 26 mm), az üllő acélból készült és perforált gyűrű állítja a középpontba, amely megengedi a füst távozását.

1.6.2.2. Vizsgálati körülmények

A minta térfogatának 40 mm³-nak, illetve az alternatív készüléknek megfelelő térfogatúnak kell lennie. A szilárd anyagoknak száraznak kell lenniük és azokat a következő módon kell előkészíteni:

a) a porított anyagokat szitálják (lyukméret 0,5 mm), a vizsgálathoz a szitán átjutott anyagot használják,

b) préselt, öntött vagy más módon sűrített anyagokat apró darabokra törik és azokat szitálják; a vizsgálathoz a 0,5–1,0 mm-es szitált frakciót használják és azt kell az eredeti anyag reprezentálásának tekinteni.

A rendszeren paszta formában előforduló anyagokat, ha ez lehetséges, száraz állapotban kell vizsgálni, vagy pedig azután, hogyha a hígítót, amennyire lehet, eltávolították. Folyékony anyagokat a felső és az alsó acélhenger között 1 mm-es réssel vizsgálnak.

1.6.2.3. A vizsgálat kivitelezése

A hat vizsgálatból álló sorozatot 10 kg tömeg 0,40 m-ről való ejtésével (40 J) hajtják végre. Ha a hat vizsgálatban 40 J-lal robbanás következik be, akkor 5 kg tömeg 0,15 m-ről való ejtésével további hat vizsgálatot kell végezni (7,5 J). Másféle készülékben a mintát meghatározott eljárással (pl. le-és-fel technika, stb.) kiválasztott referencia anyagokkal hasonlítják össze.

1.6.2.4. Értékelés

A teszteredményt pozitívnak tekintik, ha bármelyik vizsgálatban, amit az ütés hatását vizsgáló eszközzel végeztek, legalább egyszer robbanás következik be (lángok törnek ki és/vagy robbanással egyenértékű jelenséget figyelnek meg), vagy a minta érzékenyebb mint az 1,3-dinitrobenzol vagy az RDX az egyik alternatív ütési vizsgálatban.

1.6.3. Mechanikai érzékenység (súrlódásra)

1.6.3.1. Készülék (5. ábra)

A súrlódás hatását vizsgáló készülék öntvényacél alaplapból áll, amelyre súrlódást előidéző eszközt szerelnek. Ez rögzített porcelánhengerből és mozgó porcelánlemezből áll. A porcelánlapot kocsi tartja, amely két irányba mozog. A kocsi villanymotorral van kapcsolatban egy összekötő rúdon keresztül és excenter áttétellel úgy, hogy a porcelánlap előre-hátra mozog a porcelánhenger alatt 10 mm távolságban. A porcelánhenger terhelése változtatható (például 120 vagy 360 N).

A porcelánlapok fehér műszaki porcelánból készülnek (érdessége 9–32 μm), hosszúságuk 25 mm, szélességük 25 mm, magasságuk 5 mm. A porcelánhenger szintén fehér műszaki porcelánból készült, hosszúsága 15 mm, átmérője 10 mm; a hengerlapok érdesített felületű gömbszeletek, görbületük sugara 10 mm.

1.6.3.2. Vizsgálati körülmények

A minta térfogatának 10 mm³-nek kell lennie, alternatív készülékben pedig ahhoz alkalmas térfogatúnak. A szilárd anyagokat száraz állapotban vizsgálják és a következő módon készítik elő:

a) porokat 0,5 mm-es lyukméreten szitálják és a szitán átjutott anyagot vizsgálják,

b) az összepréselt, öntött vagy más módon sűrített anyagot apró darabokra törik és megszitálják: a szitált frakció < 0,5 mm-es, ezt használják a vizsgálathoz.

A pasztafényt kapott anyagot lehetőleg száraz állapotban kell megvizsgálni. Ha az anyag nem készíthető elő szárazon, a pasztából (a lehetséges maximális mennyiségű hígító eltávolítása után) egy formával 0,5 mm vastag, 2 mm széles és 10 mm hosszú filmet készítenek, és azt vizsgálják.

1.6.3.3. A vizsgálat kivitelezése

A porcelánhengert a vizsgálathoz a mintára helyezik és a hengert megterhelik. A vizsgálat alatt a porcelánlap porozitási jelzésének harántirányban kell állnia a mozgás irányával. Ügyelni kell arra, hogy amikor a porcelánhengert a mintára helyezik, elegendő tesztanyag legyen a porcelánhenger alatt, és hogy a porcelánlap megfelelően mozogjon a porcelánhenger alatt. Paszta állagú anyagoknál egy 0,5 mm vastag, 2 x 10 mm-es nyílással ellátott eszközt alkalmaznak, hogy az anyagot a lapra helyezték. A lapnak 10 mm-t kell haladnia előre és hátra a henger alatt 0,44 s ideig. A lap és a henger felszínének minden egyes részét csak egyszer szabad használni; minden egyes henger két vége két vizsgálatra szolgál és egy lap két felszínét egyenként három vizsgálatra használják.

A hat vizsgálatból álló sorozatot 360 N terheléssel végzik. Ha a hat vizsgálat eredménye pozitív, 120 N terheléssel további hat vizsgálatot kell végezni. Más készülékekben a mintát elfogadott eljárással (pl. le-fel technika, stb.) kiválasztott referencia anyaggal hasonlítják össze.

1.6.3.4. Értékelés

A vizsgálat eredményét akkor tekintik pozitívnak, ha a specifikált dörzsöléses készülékkel végzett bármelyik vizsgálatban legalább egyszer robbanás (sercegés és/vagy lángolás közlése egyenértékű a robbanással) következik be, vagy megfelel a fentiekkel egyenértékű kritériumoknak az alternatív dörzsöléses vizsgálatban.

2. ADATOK

Elvben az anyagot akkor tekintik robbanásveszélyesnek az irányelv értelmében, ha pozitív eredményt kapnak a hő-, rázási vagy dörzsölési érzékenységi vizsgálatban.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg az a következő információkat kell magába foglalni:

- a tesztanyag azonosítása, összetétele, tisztasága, nedvességtartalma, stb.,
- a minta fizikai állapota: az anyagot zúzták, összetörték és/vagy szitálták-e,
- megfigyelések a hőérzékenységi vizsgálatokban (pl. a minta tömege, a fragmentumok száma, stb.),
- megfigyelések a mechanikai érzékenységi vizsgálatokban (pl. jelentős mennyiségű füst képződése vagy az anyag teljes lebomlása szikra, láng, sisetegés észlelése nélkül, stb.),
- minden egyes vizsgálati típus eredménye,
- ha alternatív készüléket használtak, ennek tudományos indoklása, valamint közölni kell a specifikált készülékkel kapott eredményeket és meg kell adni az azzal egyenértékű készülékkel kapott eredmények közötti a korreláció bizonyítékát,
- bármilyen hasznosítható megjegyzés, pl. hivatkozás hasonló termékekkel végzett vizsgálatokra, ami lényeges lehet az eredmények megfelelő értelmezéséhez,
- bármely lényeges kiegészítő megjegyzés az eredmények értékeléséhez.

3.2. Az eredmények értelmezése és értékelése

A vizsgálati jelentésnek minden olyan eredményt közölnie kell, amelyet hamisnak, rendellenesnek vagy nem reprezentatívnak tekintenek. Ha bármelyik ilyen eredményt nem veszik figyelembe, erre magyarázatot kell adni, továbbá közölni kell az alternatív és a kiegészítő vizsgálat eredményeit. Kivéve, ha egy anomális eredményt meg tudnak magyarázni, akkor, el kell fogadni valós értéknek és fel kell használni az anyag megfelelő osztályozásához.

4. SZAKIRODALMI HIVATKOZÁSOK

- (1) Recommendations on the transport of dangerous goods, tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
- (2) Bretherick, L., Handbook of Chemical Hazards, 4th edition, Butterworth, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.
- (3) Koenen., H., Ide, K.H., Swartt, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 13 and 30-42.
- (4) NF T 20-038 (SEPT 85.). Chemical products for industrial use. – Determination of explosion risk.

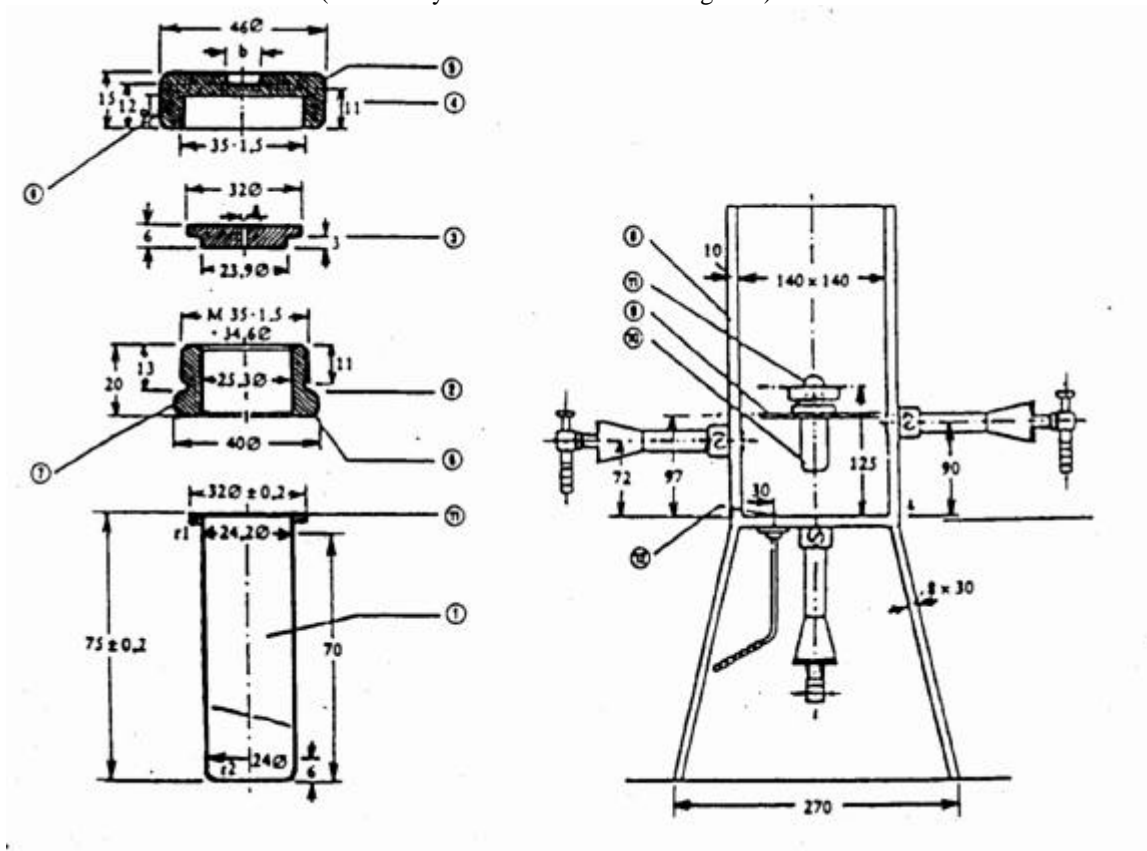
Függelék

Példa az anyag specifikációra a hőérzékenységi teszthez (lásd a DIN 1623-at)

- (1) Cső: Anyag specifikáció No 1.0336.505 g
- (2) Zárólemez (blende): Anyag specifikáció No. 1.4873
- (3) Menetes karima + anya: Anyag specifikáció No. 1.3817

1. ábra

Készülék a hőérzékenység vizsgálatához
(valamennyi méret mm-ben van megadva)



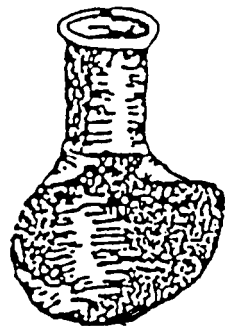
1a ábra – Acélcső és tartozékai

- (1) cső
- (1a) külső perem
- (2) menetes karima; kis surlódású menet
- (3) blende; $a = 2,0$ vagy $6,0$ mm átmérővel
- (4) anya; $b = 10$ mm átmérővel
- (5) rovátkolt felszín
- (6) 2 lemezfedél 41-es csavarhúzó mérethez

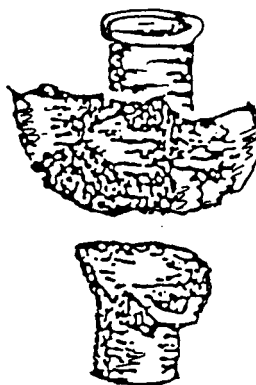
1b ábra – Fűtő és védő készülék

- (7) 2 lemezfedél 36-os csavarhúzó mérethez
- (8) szilánkbiztos doboz
- (9) 2 támasztórúd a cső részére
- (10) beszerelt cső
- (11) a hátsó égő elhelyezése; a többi égő látható
- (12) gyújtócső

2. ábra
Hőérzékenységi vizsgálat
Példák a fragmentációra



NINCS
ROBBANÁS



NINCS ROBBANÁS



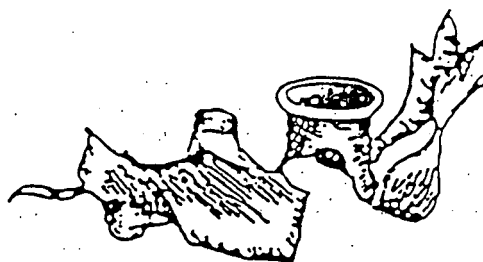
ROBBANÁS



ROBBANÁS

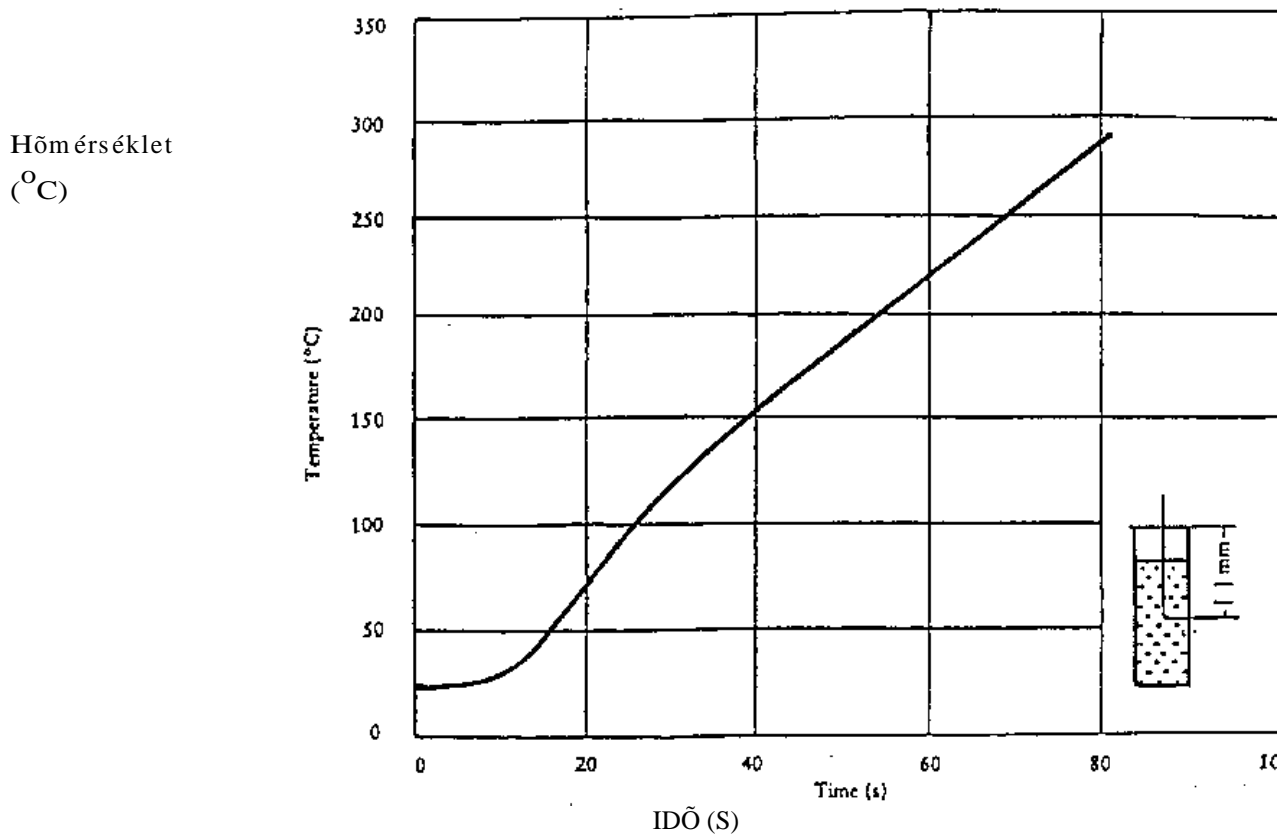


ROBBANÁS



ROBBANÁS

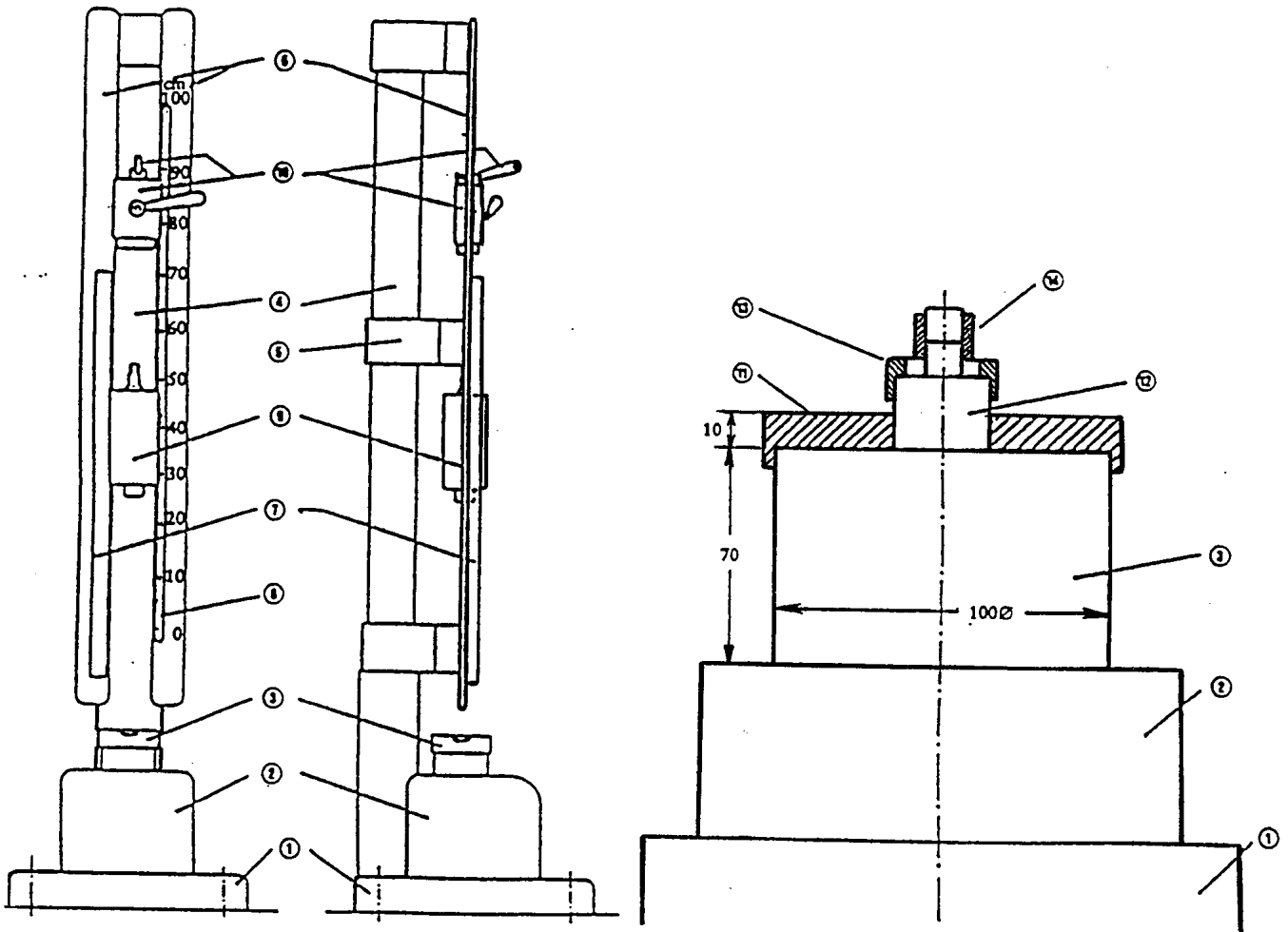
3. ábra
A fűtés mértékének kalibrációja a hőérzékenység vizsgálatához



A hőmérséklet/idő görbét dibutil-ftalát (27 cm^3) zárt csőben (1,5 mm-es zárólemeznyílással) való hevítése során kapják, a propán áramlási sebessége 3,2 liter/perc. A hőmérsékletet 1 mm átmérőjű rozsdamentes acéllal bevont kromel-alumel termoelemmel mérik, amelyet a cső pereme alatt 43 mm-re középen helyeznek el. $135 \text{ }^\circ\text{C}$ és $285 \text{ }^\circ\text{C}$ között a fűtés mértékének 185 K/perc és 218 K/perc között kell lennie.



4. ábra
 Ütési érzékenységet vizsgáló készülék
 (valamennyi méret mm-ben van megadva)



4a ábra
 Ejtő-kalapács, előlről és oldalról, teljes kép

4b ábra
 Ejtő-kalapács, alsó rész

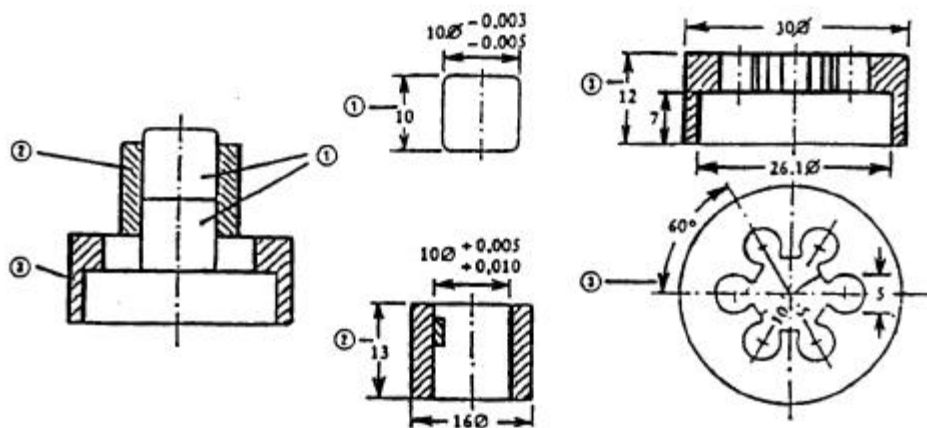
alap, 450 x 450 x 60
 acél blokk, 230 x 250 x 200
 üllő, 100 átmérőjű x 70
 torony
 középső-kereszt-tag
 2 vezetősín
 fogazott tartó

beosztott skála
 ejtő-kalapács (leeső tömeg)
 tartó- és indítószervezet
 rögzített lemez
 közbenső üllő (cserélhető)
 26 átmérőjű x 26
 rögzített gyűrű lyukakkal
 becsapódási szervezet

Az ábra folytatása

4c ábra

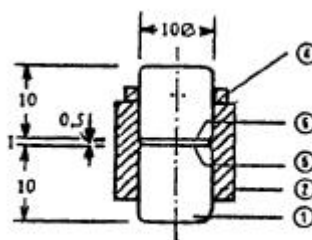
Rázókészülék porított és pasztaszerű anyagokhoz



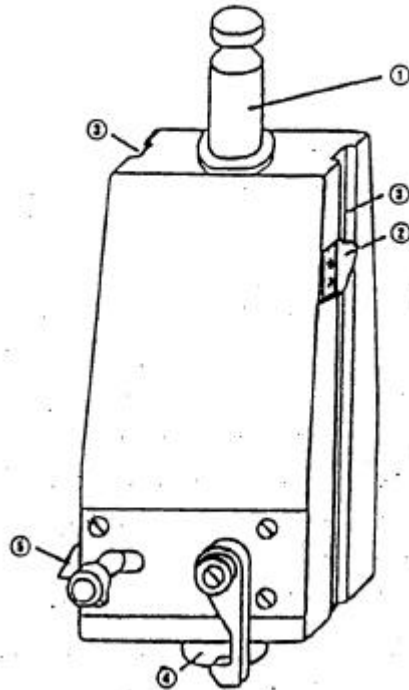
- (1) acélhengerek
- (2) vezetőgyűrű az acélhengerekhez
- (3) rögzítőgyűrű nyílásokkal
 - (a) függőleges metszet
 - (b) oldalmetszet
- (4) gumigyűrű
- (5) folyadék (40 mm³)
- (6) folyadékmentes tér

4d ábra

Rázókészülék folyadékokhoz



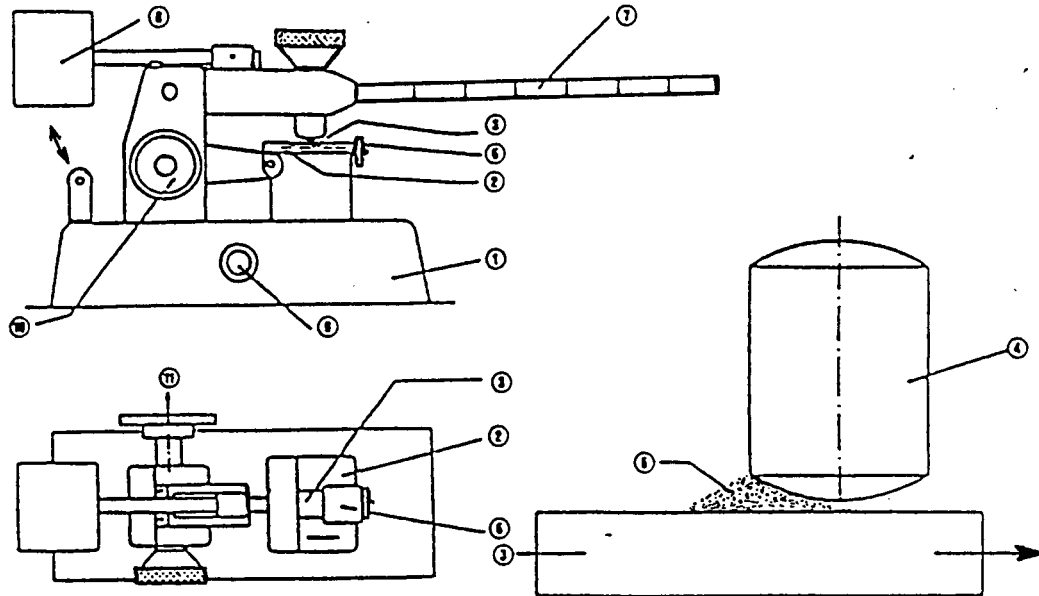
4e ábra
Kalapács (leeső tömeg 5 kg)



- (1) felfüggesztő
- (2) magasságjelző
- (3) beállító vájat
- (4) hengeres ütő hosszú tűske
- (5) visszaugró befogás

5. ábra

Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék



5a ábra – Súrlódási érzékenységet vizsgáló készülék: oldal- és felülnézetben

5b ábra – A henger kiindulási helyzete a mintán

- (1) acélalap
- (2) mozgatható kocsi
- (3) porcelán lemez, 25x25x5 mm, a kocsi tartja
- (4) rögzített porcelán henger, 10 átmérőx15 mm
- (5) vizsgálati minta, kb. 10 mm³
- (6) henger tartó
- (7) terhelőkar
- (8) ellensúly
- (9) kapcsoló
- (10) szabályozó kerék a kocsi kiindulási helyzetbe állításához
- (11) villanymotor hajtóművezérlő

A.15. ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLET (FOLYADÉKOK ÉS GÁZOK)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Robbanóképes és a levegővel érintkezve a környezet hőmérsékletén maguktól meggyulladni képes anyagokat nem ezzel az eljárással kell vizsgálni. A vizsgálati eljárást olyan gázok, folyadékok és gőzök vizsgálatára kell használni, amelyek forró felülettel érintkezve levegő jelenlétében meggyulladhatnak.

Az öngyulladás hőmérséklet katalitikus hatású szennyezők jelenlétében, felületaktív anyagokkal vagy nagyobb térfogatú tesztedénnyel jelentősen csökkenthető.

1.2. Fogalom meghatározások és mértékegységek

Az öngyulladás képesség mértéke kifejezhető az öngyulladás hőmérséklettel. Az öngyulladás hőmérséklet az a legalacsonyabb hőmérséklet, amelyen a tesztanyag meggyullad, ha levegővel elegyítik a vizsgálati módszer feltételei között.

1.3. Referencia anyagok

A referencia anyagokra szabványokban hivatkoznak (lásd az 1.6.3. pontban). A referencia anyagok főként azt a célt szolgálják, hogy a módszert időszakosan ellenőrizhessék és lehetővé tegyék az összehasonlítást más módszerekkel kapott eredményekkel.

1.4. A módszer elve

A módszer meghatározza azt a legkisebb hőmérsékletet egy körülkerített tér belső felületén, amelynél az ebbe a térbe juttatott gáz, gőz vagy folyadék meggyullad.

1.5. Minőségi kritériumok

Az ismételtetés az öngyulladás hőmérséklet tartományától és az alkalmazott módszertől függően változik.

Az érzékenység és a specificitás a vizsgálati módszertől függ.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Készülék

A készüléket az 1.6.3. pontban közölt módszer ismerteti.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

A testanyag mintáját az 1.6.3. pontban közölt módszer szerint vizsgálják.

1.6.3. A vizsgálat kivitelezése

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

2. ADATOK

Regisztrálni kell a vizsgálati hőmérsékletet, a légköri nyomást, a használt minta mennyiségét és a meggyulladásig eltelt időt.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg az alábbi információkat kell magába foglalni:

- a testanyag pontos specifikálása (azonosítás és szennyeződések),
- a használt minta mennyisége, az atmoszférikus nyomás,
- a használt készülék,
- mérési eredmények (vizsgálati hőmérsékletek, a gyulladással kapcsolatos adatok, a megfelelő időfázisok),
- az összes olyan kiegészítő megjegyzés, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

Nincsenek.

A.16. SZILÁRD ANYAGOK RELATÍV ÖNGYULLADÁSI HŐMÉRSÉKLETE

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Robbanóképes és levegővel érintkezve a környezet hőmérsékletén maguktól meggyulladni képes anyagokat nem ezzel az eljárással kell vizsgálni.

A vizsgálatnak a célja, hogy nyújtson előzetes információt a szilárd anyagok öngyulladásáról magasabb hőmérsékleten. Ha a hőmennyiséget, amely akár az anyag oxigénnel való reakciójával, akár exoterm bomlásával keletkezik, a környezet nem nyeli el elég gyorsan, az önhevítés öngyulladásához vezet. Az öngyulladás ezért akkor következik be, ha a hőtermelés mértéke meghaladja a hővesztéséget.

Ez a vizsgálati eljárás szilárd anyagok előzetes szűrővizsgálatára használható. A szilárd anyagok meggyulladásának és égésének komplex természetét figyelembe véve, az ennek a vizsgálati módszerrel meghatározott öngyulladási hőmérsékletét csak összehasonlításra lehet használni.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

Az ezzel a módszerrel kapott öngyulladási hőmérséklet az a legalacsonyabb környezeti hőmérséklet °C-ban kifejezve, amelyen a meghatározott mennyiségű anyag a meghatározott feltételek mellett meggyullad.

1.3. Referencia anyagok

Nem határozták meg.

1.4. A módszer elve

A meghatározott térfogatú tesztanyagot szobahőmérsékleten egy kemencébe helyezik, regisztrálják a minta közepében meglévő körülményekre utaló hőmérséklet/idő görbét, miközben a kemence hőmérsékletét 0,5 °C/min mértékben 400 °C-ra, vagy ha az olvadáspont alacsonyabb, az olvadáspontra emelik. A vizsgálat céljának megfelelően azt a kemence-hőmérsékletet, amelyen önhevítéssel a minta hőmérséklete eléri el a 400 °C-ot, nevezik öngyulladás hőmérsékletnek.

1.5. Minőségi kritériumok

Nem állapították meg.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Készülék

1.6.1.1. Kemence

A hőmérséklet-programozott laboratóriumi kemence (térfogata kb. 2 liter) a természetes légáramlással és robbanásgátlóval van összekötésben. A lehetséges robbanási kockázat elkerülésére a bomlási gázoknak nem szabad érintkezniük az elektromos fűtőelemekkel.

1.6.1.2. Dróthálókocka

Rozsdamentes acél huzaljából készült hálót (0,045 mm-es lyukakkal) az 1. ábrán látható minta szerint felvágják. A hálót összehajtogatják és huzallal rögzítve nyitott tetejű kockába helyezik.

1.6.1.3. Termoelemek

Megfelelő termoelemek szükségesek.

1.6.1.4. Regisztráló

Bármilyen kétcsatornás regisztráló, amelyet 0–600 °C közötti hőmérsékletre vagy a megfelelő feszültségre kalibráltak.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

Anyagokat abban a formában kell vizsgálni, ahogy rendelkezésre bocsátják.

1.6.3. A vizsgálat kivitelezése

A kockát megtöltik a tesztanyaggal és gyenge ütögetés közben addig adagolják, amíg a kocka teljesen megtelik. Aztán a kockát szobahőmérsékleten a kemence középpontjában felfüggesztik. Az egyik termoelemet a kocka közepébe, a másikat pedig a kocka és a kemence fala közé helyezik, hogy regisztrálják a kemence hőmérsékletét.

A minta és a kemence hőmérsékletét folyamatosan regisztrálják amíg a kemence hőmérséklete 0,5 °C/min mértékben 400 °C-ra vagy az olvadáspontra emelkedik, ha az olvadáspont alacsonyabb.

Ha az anyag meggyullad, a kemence hőmérsékletét meghaladó nagyon éles hőmérséklet-emelkedést a minta termoeleme mutatja.

2. ADATOK

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

3. JELENTÉS

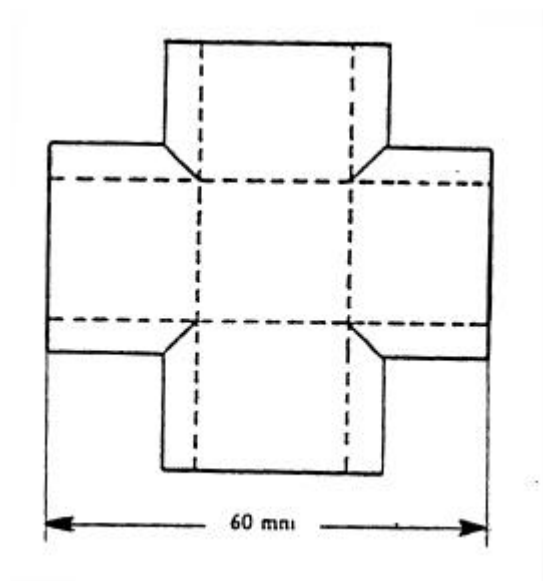
A vizsgálati jelentésnek lehetőleg az alábbi információkat kell magába foglalni:

- a tesztanyag leírása,
- a mérési eredmények, ideértve a hőmérséklet/idő görbét,
- valamennyi olyan kiegészítő megjegyzés, amely lényeges az eredmények értelmezéséhez.

4. IRODALMI HIVATKOZÁSOK

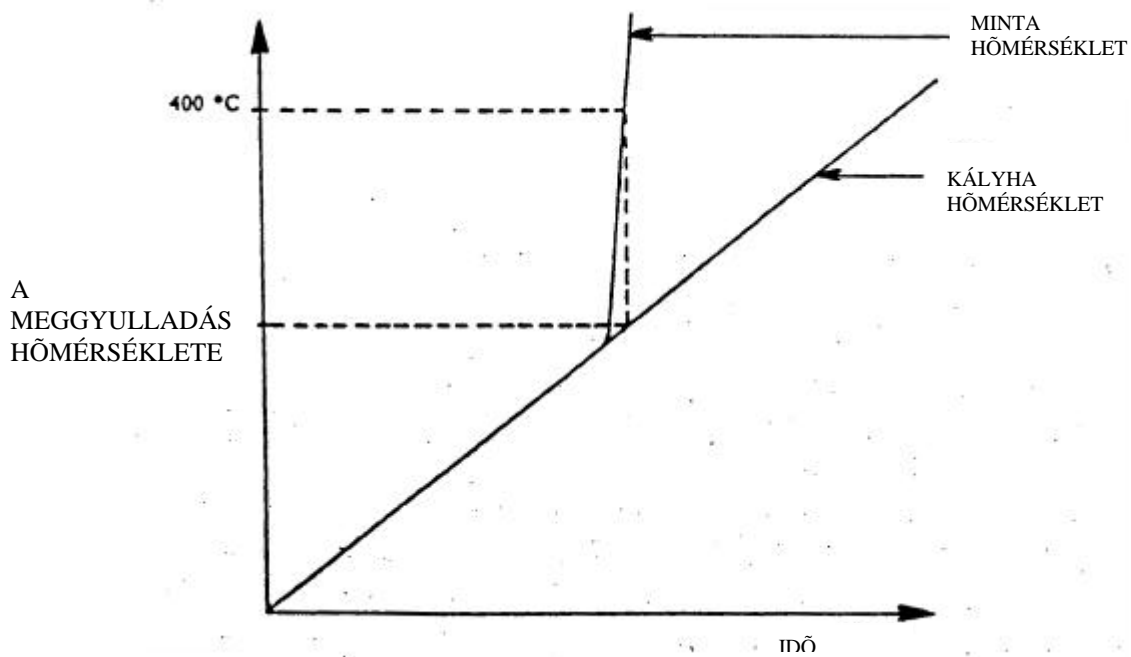
(1) NF T 20-036 (Sept. 85) Chemical products for industrial use. Determination of relative temperature of the spontaneous flammability of solids.

1. ábra



20 mm-es tesztblokk mintája

2. ábra



TIPIKUS HŐMÉRSÉKLET/IDŐ GÖRBE

A.17. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (SZILÁRD ANYAGOK)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálat megkezdése előtt hasznosak az információk az anyag potenciális robbanási tulajdonságairól. A módszer nem alkalmazható folyadékoknál, gázoknál, robbanásveszélyes vagy nagyon gyúlékony anyagoknál vagy szerves peroxidoknál.

A vizsgálatot nem kell elvégezni, ha a szerkezeti képletből minden kétséget kizáróan az állapítható meg, hogy az anyag nem képes exoterm reakcióba lépni éghető anyaggal. Annak kiderítésére, hogy a vizsgálatnál szükség van-e fokozott óvatosságra, előzetes vizsgálatot kell végezni.

1.2. Fogalommeghatározók és mértékegységek

Égési idő: reakcióidő s-ban, amely szükséges a reakciónában ahhoz, hogy az égés az 1.6. pontban leírtak szerint végigterjedjen az anyagnyalábon.

Égési sebesség: milliméter/s-ban fejezik ki.

Maximális égési sebesség: a legnagyobb értékű égési sebesség, amelyet a 10–90 súlyszázalékban oxidálószerrel tartalmazó keverékek vizsgálatából kaptak.

1.3. Referencia anyagok

A vizsgálatához és az előzetes vizsgálatához referencia anyagként analitikai tisztaságú bárium-nitrátot használnak.

A referencia keverék bárium-nitrát cellulózporral alkotott, az 1.6. pontban foglaltak szerint készített keveréke, amelynek van maximális égési sebessége (ez rendszerint a bárium-nitrát 60 tömegszázalékos keveréke).

1.4. A módszer elve

Az előzetes vizsgálatot biztonsági okokból végzik. Nem szükséges további vizsgálat, ha az előzetes vizsgálat egyértelműen jelzi, hogy az anyag oxidáló tulajdonságú. Ellenkező esetben az anyaggal a teljes vizsgálatot el kell végezni.

A teljes vizsgálatnál a tesztanyagot és a meghatározott éghető anyagot különféle arányokban keverik össze. Minden egyes keveréket egy nyalábbá formálnak és ezt a nyalábot az egyik végén meggyújtják. A maximális égési sebességet meghatározzák és összehasonlítják a referencia-keverék maximális égési sebességével.

1.5. Minőségi kritériumok

Ha megkívánják, az őrlés és a keverés bármelyik módszere megfelel, feltéve, hogy a maximális égési sebességek eltérése a hat elkülönített vizsgálatban nem nagyobb az aritmetikai középérték 10%-ánál.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Előkészítés

1.6.1.1. Tesztanyag

A tesztanyag részecskék méretét <0,125 mm-re a következő eljárással kell csökkenteni: a tesztanyagot meg kell szitálni, a visszamaradt részt meg kell őrlni és ezt az eljárást addig kell folytatni, amíg a vizsgálati anyag teljes mennyisége át nem megy a szitán.

Bármely őrlési és szitálási módszer használható, amely eleget tesz a minőségi kritériumoknak.

A keverék elkészítése előtt az anyagot 105 °C-on súlyállandóságig szárítják. Ha a tesztanyag bomlási hőmérséklete 105 °C alatt van, az anyagot alacsonyabb hőmérsékleten kell szárítani.

1.6.1.2. Éghető anyag

Éghető anyagként porított cellulózt használnak.

A vékonyréteg- vagy az oszlopkormatográfiánál használt típusú cellulózt kell használni. A rostosság az anyag több mint 85%-ánál 0,020 és 0,075 mm között legyen.

A cellulózport 0,125 mm-es lyukméretnél szitálják. Az egész vizsgálat alatt ugyanazon gyártási sorozatból származó cellulózt használnak.

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

Ha falisztet használnak az előzetes vizsgálatban, akkor olyan puha falisztet készítenek, amely 1,6 mm-es lyukméretnél átmegy a szitán, ezt alapos keverés után 105 °C-on 4 órán át 25 mm-nél nem vastagabb rétegben kiszárítják. Hűtik és jól megtöltött légmentes konténerben addig tárolják, amíg szükséges (lehetőleg a szárítástól számított 24 órán belüli időtartamig).

1.6.1.3. Gyújtóforrás

A gázégő legalább 5 mm átmérőjű lángját kell használni gyújtóforrásként. Ha más gyújtóforrást használnak (pl. ha inert atmoszférában tesztelnek), akkor annak leírását és indoklását közölni kell.

1.6.2. A vizsgálat kivitelezése

Megjegyzés:

Oxidálószeres cellulózzal vagy faliszttal alkotott keverékeivel úgy kell bánni mint potenciális robbanó anyagokkal és azokat különös óvatossággal kell kezelni.

1.6.2.1. Előzetes vizsgálat

A szárított anyagot a szárított cellulózzal vagy faliszttal 2:1 súlyarányban alaposan összekeverik és a keveréket töltéssel kis kúp alakú nyalábokká (az alap átmérője 3,5 cm, magasság 2,5 cm) formálják, ledöngölés nélkül kúp alakú forma (pl. csapos laboratóriumi üvegtölcsér) segítségével.

A nyalábot hűvös, nem éghető, nem porózus és alacsony hővezető képességű alaplapon helyezik el. A vizsgálatot füstszekrényben végzik az 1.6.2.2. pontban foglaltak szerint.

A gyújtóforrást érintkezésbe hozzák a kúppal. A fellépő reakció hevességét és időtartamát megfigyelik és regisztrálják.

Az anyagot akkor tekintik oxidálónak, ha heves reakció jön létre.

Bármely olyan esetben, amikor az eredmény kétséges, akkor az alább leírt teljes vizsgálat sorozat el kell végezni.

1.6.2.2. Vizsgálat sorozat

Oxidálószer-cellulóz keverékeket készítenek az oxidálószer 10–90% súly%-os arányával, 10%-os növekedésekkel. Határesetekben közbeeső oxidálószer-cellulóz keveréket kell használni, hogy az égési sebesség maximumát pontosabban kapják meg.

A nyalábot formával készítik. A forma fémből készült, hossza 250 mm, keresztmetszete háromszög alakú, belső magassága 10 mm és belső szélessége 20 mm. A forma mindkét oldalán hosszanti irányban két fémlemez van rá szerelve oldallapként, amely 2 mm-rel túlnyúlik a háromszög alakú keresztmetszet felső szélén (ábra). Ezt az eszközt lazán megtöltik a keverékkel, csekély felesleggel, majd a formát 2 cm magasról szilárd felületre ejtik. A maradék anyagfelesleget a ferdén elhelyezett lapról eltávolítják. Az oldalfalakat leszerelik és hengerrel elsimitják a maradék anyagot. A hűvös, nem éghető, nem porózus, és alacsony hővezető képességű alaplapot a forma tetejére helyezik el, majd a készüléket megfordítják és a formát eltávolítják.

Az anyagnyalábot a füstszekrény huzatában helyezik el.

A légsebességnek elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy megelőzze a füst kiszökését a laboratóriumba és ezt a vizsgálat alatt nem szabad megváltoztatni. A készülék körül huzatvédőt kell elhelyezni.

A cellulóz és néhány más anyag higroszkópos tulajdonsága miatt a vizsgálatot a lehető leggyorsabban el kell végezni.

A nyaláb egyik végét lánggal gyújtják meg.

A reakcióidőt 200 mm-es távolságon keresztül azután mérik, hogy a reakciózóna egy kezdeti 30 mm-es távolságra terjedt.

A vizsgálatot referencia anyaggal és legalább egyszer mindegyik tesztanyag-cellulóz keverék tartományból vett mintával végzik.

Ha a maximális égési sebességet jelentősen nagyobbak találják a referencia anyagénál, a vizsgálatot meg lehet szakítani; egyébként a vizsgálatot a legnagyobb égési sebesség mellett a három keverék mindegyikével ötször kell megismételni.

Ha felmerül a gyanú, hogy az eredmény álpozitív, akkor hasonló részecskeméretű inert anyaggal meg kell a vizsgálatot ismételni. A cellulóz helyett ilyen anyag a szilikagél. Alternatív eljárásként ilyenkor a legnagyobb égési sebességű tesztanyag-cellulóz keveréket inert atmoszférában (< 2 térfogat% oxigén-tartalom) újra megvizsgálják.

2. ADATOK

Biztonsági okokból a maximális égési sebességet – és nem a középértéket – kell figyelembe venni a tesztanyag oxidáló tulajdonságának jellemzésére.

Az adott keverék értékeléséhez a hat vizsgálat valamelyikében mért legnagyobb értéke a fontos.

A legnagyobb égési sebesség értékét és az oxidáló hatást okozó koncentráció közti összefüggést minden egyes keveréknél grafikusán kell ábrázolni. A legnagyobb égési sebességet a grafikus ábrából kell leolvasni.

A legnagyobb égési sebességű keveréknél hat mért maximális égési sebesség értékének 10%-nál nagyobb mértékben nem szabad eltérnie az aritmetikai középértéktől, ellenkező esetben javítani kell az örlési és keverési módszereken.

A kapott maximális égési sebességet össze kell hasonlítani a referencia keverék maximális égési sebességével (lásd az 1.3. pontot).

Ha a vizsgálatot inert atmoszférában végzik, a maximális reakciósebességet összehasonlítják a referencia keverék inert atmoszférában kapott reakciósebességével.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőleg a következő információkat kell magába foglalni:

- a tesztanyag azonosítása, összetétele, tisztasága, nedvességtartalma stb.,
- a vizsgálatokban használt gyújtóforrás,
- a mérési eredmények,
- a reakció módja (pl. felvillanások a felületen, égés az egész tömegen keresztül, információk az égéstermékekről, stb.)
- az összes olyan kiegészítő megjegyzés, ami lényeges az eredmények értelmezéséhez, ideértve a reakció hevességének leírását (lángolás, szikrázás, füstképződés, lassú hamvadás stb.), valamint az a közelítőleges időtartam, melyet az előzetes biztonsági/szűrővizsgálatban kaptak, mind a teszt-, mind a referencia anyagnál,
- az inert anyaggal végzett vizsgálatok eredményei, ha vannak ilyenek,
- az inert atmoszférában végzett vizsgálatok eredményei, ha vannak ilyenek.

3.2. Az eredmények értelmezése

Az anyagot akkor tekintik oxidáló anyagnak, ha

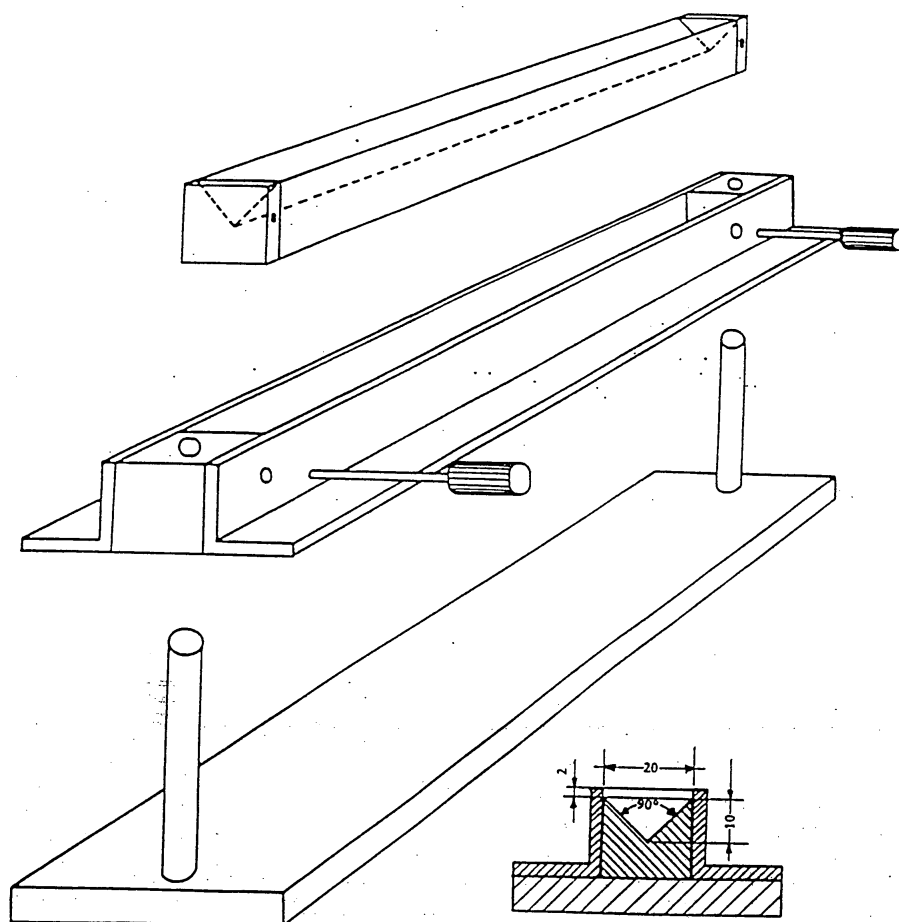
- a) az előzetes vizsgálatban heves reakció jön létre,
- b) a teljes vizsgálatban a vizsgált keverék maximális égési sebessége nagyobb vagy egyenlő a cellulózból és bárium-nitrátból álló referencia keverék maximális égési sebességénél.

Az álpozitív eredmények elkerülésére az olyan vizsgálatban kapott eredményeket, amelyben a tesztanyagot inert anyaggal keverik és/vagy inert atmoszférában vizsgálják, az eredmények értelmezésénél szintén figyelembe kell venni.

4. SZAKIRODALMI HIVATKOZÁSOK

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

Ábra



A forma és tartozékai az anyagnyaláb előkészítéséhez (az összes dimenzió milliméterben van megadva, a tégely hosszúsága 250 mm, anyaga alumínium)

A.18. SZÁMÁTLAG MOLEKULATÖMEG ÉS POLIMEREK MOLEKULATÖMEG-ELOSZLÁSA

1. MÓDSZER

Ez a Gél Permeációs Kromatográfiai módszer az OECD TG 118 (1996) másolata. Az alapelvek és további technikai információk az 1. hivatkozásban vannak megadva.

Bevezetés

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

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

Definíciók és egységek

Az M_n számtálag molekulatömeg és az M_w tömegátlag molekulatömeg a következő egyenletekkel van meghatározva:

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

ahol

H_i a detektorjel nagysága az alapvonaltól V_i retenciós térfogatra

M_i a polimerfrakció molekulatömege V_i retenciós térfogatonál, és

n a mérések száma.

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

1.3. Referenciaanyagok

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

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

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

1.4. A teszt módszer elve

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

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

Ideális helyzetben az elválasztást teljesen a molekulafajta mérete szabja meg, de a gyakorlatban nehéz elkerülni legalább valamelyes abszorpciós zavaró hatást. A nem egyenletes oszlop pakolás és a holt térfogat ronthatja a helyzetet (2).

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

1.5. Minőségi kritériumok

Az elúciós térfogat reprodukálhatósága (relatív standard deviáció, RSD) 0,3%-nál jobb kell hogy legyen. Az analízis megkövetelt reprodukálhatóságát belső standarddal való korrekcióval kell biztosítani, ha a kromatogram időfüggésben van kiértékelve, és nem felel meg a fent említett kritériumnak (1). A polidiszperzitás függ a standardok molekulatömegétől. Polisztirol standardoknál a tipikus értékek:

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

$$2\,000 \leq M_p \leq 10^6 \quad M_w/M_n < 1,05$$

$$M_p > 10^6 \quad M_w/M_n < 1,20$$

(M_p a standard molekulatömege a csúcs maximumnál)

1.6. A teszt módszer leírása

1.6.1. A standard polisztirol oldatok készítése

A polisztirol standardokat óvatos keverés közben oldják a választott eluensben. A gyártó ajánlásait számításba kell venni az oldatok készítésénél.

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

1.6.2. A mintaoldat készítése

Elvben a mintaoldatok készítésére is ugyanezek a követelmények érvényesek. A mintát megfelelő oldószerben pl. tetrahidrofurán (THF) oldják óvatos rázás közben. Semmilyen körülmények között sem szabad ultrahangos fürdőben feloldani. Ha szükséges, az oldat tisztítható 0,2–2 µm-es pórusméretű membránszűrővel.

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

1.6.3. Készülék

- oldószer tartály,
- gáztalanító (szükség szerint),
- pumpa,
- lökéscsillapító (szükség szerint),
- injektáló rendszer,
- kromatográfiás oszlopok,
- detektor,
- áramlásmérő (szükség szerint),
- adat rögzítő-feldolgozó,
- hulladéktároló.

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

1.6.4. Injektáló és oldószer szállító rendszer

A minta oldatának meghatározott térfogatát vagy automata adagolóval, vagy kézzel töltik az oszlopra egy élesen definiált zónába. Ha kézzel végzik, a fecskendő dugattyújának túl gyors benyomása vagy kihúzása a megfigyelt molekulatömeg eloszlásban változásokat okozhat. Az oldószer szállító rendszernek, amennyire csak lehet, lüktetésmentesnek kell lenni, ideálisan pulzálás csillapítót magában foglalva. Az áramlási sebesség 1 ml/perc nagyságrendű.

1.6.5. Oszlop

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

1.6.6. Elméleti tényérszám

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

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

ahol

- N az elméleti tényérszám
- V_e az elúciós térfogat a csúcs maximumnál
- W az alapvonal csúcshélesség
- $W_{1/2}$ a csúcshélesség félmagasságnál.

1.6.7. Az elválasztás hatékonysága

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

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

ahol

V_{e,M_x} az M_x molekulatömegű polisztirol elúciós térfogata

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

A rendszer felbontása általában így definiált:

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

ahol

V_{e1}, V_{e2} két polisztirol standard elúciós térfogata a csúcs maximumnál

W_1, W_2 az alapvonal csúcshélességei

M_1, M_2 a molekulatömegek a csúcs maximumnál (10-es faktoriall térjenek el).

Az oszloprendszerre az R -érték 1,7-nél legyen nagyobb (4).

1.6.8. Oldószerek

Minden oldószerek nagy tisztaságúnak kell lennie (THF-ből 99,5% tisztaságú használatos). Az oldószer tartálynak (inert gáz atmoszférában, ha szükséges) elég nagyoknak kell lenni az oszlop kalibrálásához és néhány mintaanalízishez. Az oldószert gáztalanítani kell, mielőtt a pumpával az oszlopra juttatjuk.

1.6.9. Hőmérséklet szabályozás

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

1.6.10. Detektor

A detektor célja az oszlopról eluált minta koncentrációjának kvantitatív meghatározása. A csúcsok szükségtelen szélesedésének elkerülésére a detektor cella küvetta térfogatának a lehető legkisebbnek kell lenni. Nem lehet nagyobb 10 μl -nél, kivéve a fényszórási és viszkozitás detektoroknál. A detektálásra differenciális törésmutató mérést szokás használni. Azonban, ha a minta vagy az elúciós oldószer speciális tulajdonságai megkövetelik, más detektor típusok is használhatók, pl. UV/VIS, IR, viszkozitás detektor stb.

2. ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

2.1. Adatok

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

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

M_n -t, M_w -t, M_w/M_n -t és M_p -t meg kell adni minden mérésnél. Fontos világosan jelezni, hogy a mért értékek a használt standard molekulatömegével ekvivalens relatív értékek. A retenciós térfogatok vagy a retenciós idők (lehetőleg belső standardot használva korrigáltak) meghatározása után a $\log M_p$ értékek (M_p a kalibráló standard csúcs maximuma) lesznek ábrázolva egyikük függvényében. Molekulatömeg dekádonként legalább két kalibrációs pont szükséges, és legalább öt mérési pont kell a teljes görbéhez, aminek le kell fedni a minta becsült molekulatömegét. A kalibrációs görbe kis molekulatömegű végpontját *n*-hexil-benzol, vagy más megfelelő nem-poláris oldott anyag definiálja. A számátlag és a tömegátlag molekulatömeget általában elektronikus adatfeldolgozással, az 1.2. alpont képletei alapján határozzuk meg. A kézi digitalizálás esetében az ASTM D 3536-91 használandó (3).

Az eloszlási görbét táblázat vagy ábra (differenciális frekvencia vagy összeg százalék a $\log M$ függvényében) formájában kell megadni. Grafikus bemutatásnál egy molekulatömeg dekádnak általában kb. 4 cm szélesnek kell lenni, a csúcs maximumnak pedig kb. 8 cm magasnak kell lenni. Integrális eloszlás görbék esetén az ordinátának 0 és 100% között kb. 10 cm-esnek kell lenni.

2.2. Teszt jegyzőkönyv

A teszt jegyzőkönyvben a következő információknak kell szerepelni:

2.2.1. Tesztanyag

- elérhető információk a tesztanyagról (azonosság, adalékok, szennyezők),
- a mintakezelés, megfigyelések, problémák leírása.

2.2.2. Műszerezettség

- eluens tartály, inert gáz, az eluens gáztalanítása, az eluens összetétele, szennyezők,
- pumpa, pulzálás csillapító, injektáló rendszer,
- elválasztó oszlopok (gyártó, az oszlop jellemzőiről minden információ, mint pórus-méret, az elválasztó anyag fajtája stb., a használt oszlopok száma, hossza, és elrendezése),
- az oszlop (vagy oszlopkombináció) elméleti tényérszáma, elválasztási hatékonysága (a rendszer felbontása),
- információ a csúcsok szimmetriájáról,
- oszlop hőmérséklet, hőmérséklet szabályozás módja,
- detektor (mérési elv, típus, küvetta térfogat),
- áramlásmérő, ha használtak (gyártó, mérési elv),
- adatrögzítő és -feldolgozó rendszer (hardver és szoftver).

2.2.3. A rendszer kalibrálása

- a kalibrációs görbék megalkotásához használt módszer részletes leírása,
- információk a módszer minőségi kritériumairól (pl. korrelációs együttható, hiba négyzetösszeg stb.),
- információk minden, a kísérleti eljárás és az adatok kiértékelése és feldolgozása során alkalmazott extrapolációról, feltételezésről és közelítésről,
- a kalibrációs görbék megalkotásához használt minden mérést dokumentálni kell egy táblázatban, amely minden kalibrációs pontra a következőket tartalmazza:

- a minta neve,
- a minta gyártója,
- az M_p , M_n , M_w , és M_w/M_n , standardok jellemző értékei, ahogy a gyártó rendelkezésre bocsátotta, vagy azt követő mérésekből következik, a meghatározási módszer részleteivel együtt,
- injektálási térfogat és koncentráció,
- a kalibrációhoz használt M_p érték,
- a csúcs maximumoknál mért elúciós térfogat, vagy korrigált retenciós idő,
- a csúcsmaximumnál számított M_p ,
- a számított M_p és a kalibrációs érték százalékos hibája.

2.2.4. Kiértékelés:

- időn alapuló kiértékelés: a megkövetelt reprodukálhatóság biztosítására használt módszerek (korrekciós módszer, belső standard stb.),
- információ arról, hogy a kiértékelés az elúciós térfogat vagy a retenciós idő alapján történt,
- információ a kiértékelés korlátairól, ha egy csúcs nem lett teljesen elemezve,
- a simítási módszerek leírása, ha használtak lettek,
- minta előállítási és előkezelési eljárások,
- feloldatlan részecskék jelenléte, ha voltak,
- injektálási térfogat (μl) és injektálási koncentráció (mg/ml),
- az ideális GPC profiltól való eltéréshez vezető hatásokat jelző megfigyelések,
- a teszt eljárások minden módosításának részletes leírása,
- a hibatarományok részletei,
- az eredmények értelmezésre vonatkozó bármely egyéb információ és megfigyelés.

3. IRODALOMJEGYZÉK

(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.

*Melléklet**Példák polimerek számátlag molekulatömege (M_n) meghatározásának más módszereire*

M_n meghatározására a gél permeációs kromatográfia (GPC) az előnyben részesített módszer, különösen, ha elérhető a polimeréhez hasonló szerkezetű standardkészlet. Azonban, ha gyakorlati nehézségekbe ütközik a GPC használata vagy már van olyan várakozás, hogy az anyag nem teljesít egy szabályozási M_n kritériumot (és ami igazolást igényel), vannak alternatív módszerek, úgymint:

1. A kolligatív tulajdonságok felhasználása

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

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\ 000$.

1.2. Göznyomás csökkenés: a kiválasztott referencia folyadék göznyomásának mérése ismert mennyiségű polimer hozzáadása előtt és után (1) (2).

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

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

Alkalmazhatóság: M_n 20 000 – 200 000 között.

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

Alkalmazhatóság: $M_n < 20\ 000$.

2. Végcsoport analízis

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

Alkalmazhatóság: M_n 50 000-ig (csökkenő megbízhatósággal).

Irodalomjegyzék

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). *Textbook of Polymer Science*, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). *Absolute Colligative Property Methods*. Chapter 4. In: *Polymer Molecular Weights*, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). *Membrane Osmometry*. In: *Determination of Molecular Weight*, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25 to 52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for 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. POLIMEREK KIS MOLEKULATÖMEG TARTALMA

1. MÓDSZER

Ez a gél permeációs kromatográfias módszer az OECD TG 119 (1996) másolata. Az alapelvek és további technikai információk az 1. hivatkozásban vannak megadva.

1.1. Bevezetés

Miután a polimerek tulajdonságai olyan változatosak, lehetetlen egyetlen módszert leírni, pontosan felsorolva az elválasztás és kiértékelés feltételeit, amelyek lefednek minden, a polimerek elválasztásánál előforduló lehetőséget és különlegességet. Főként a komplex polimer rendszereknél gyakran nem használható a gél permeációs kromatográfia (GPC). Ha a GPC nem használható, a molekulatömeg más módszerekkel határozható meg (lásd melléklet). Ilyen esetekben meg kell adni a használt módszer minden részletét és igazolását.

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

1.2. Definíciók és egységek

A kis molekulatömeg önkényesen 1 000 dalton alattként van definiálva.

Az M_n számátlag molekulatömeg és az M_w tömegátlag molekulatömeg a következő egyenletekkel van meghatározva:

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

ahol

H_i a detektorjel szintje az alapvonalától V_i retenciós térfogatra

M_i a polimerfrakció molekulatömege V_i retenciós térfogatnál, és

n az adatpontok száma.

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

1.3. Referenciaanyagok

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

A molekulatömeg és az elúciós térfogat között meghatározott összefüggés csak az adott kísérlet specifikus körülményei mellett érvényes. A körülmények magukban foglalják mindenek felett a hőmérsékletet, az oldószert (vagy oldószer elegyet), a kromatográfias feltételeket és az elválasztó oszlopot vagy oszlopokat.

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

1.4. A teszt módszer elve

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

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

Ideális helyzetben az elválasztást teljesen a molekulafajta mérete szabja meg, de a gyakorlatban nehéz elkerülni legalább abszorpciózavaró hatását. A nem egyenletes oszlop töltet és a holt térfogat ronthatja a helyzetet (2).

A detektálás megvalósul pl. a törésmutatóval, vagy az UV-elnyeléssel és egyszerű eloszlási görbét eredményez. Azonban ahhoz, hogy az aktuális molekulatömeg értékeket a görbéhez lehessen rendelni, az oszlopot kalibrálni kell ismert molekulatömegű és ideális esetben nagyjából hasonló szerkezetű polimerek, pl. különböző polisztirol standardok

futtatásával. Tipikusan Gauss-görbe kapható, néha a kis molekulatömeg oldalán kis farokkal eltorzítva, a függőleges tengely a különböző eluált molekulafajták tömeg szerinti mennyiségét mutatja, a vízszintes tengely pedig a molekulatömeg logaritmusát.

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

1.5. Minőségi kritériumok

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

$$\begin{array}{ll} M_p < 2\,000 & M_w/M_n < 1,20 \\ 2\,000 \square M_p \square 10^6 & M_w/M_n < 1,05 \\ M_p > 10^6 & M_w/M_n < 1,20 \end{array}$$

(M_p a standard molekulatömege a csúcs maximumnál)

1.6. A teszt módszer leírása

1.6.1. A standard polisztirol oldatok készítése

A polisztirol standardokat óvatos keverés közben oldják a választott eluensben. A gyártó ajánlásait számításba kell venni az oldatok készítésénél.

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

1.6.2. A mintaoldat készítése

Elvben a mintaoldatok készítésére is ugyanezek a követelmények érvényesek. A mintát megfelelő oldószerben pl. tetrahydrofurán (THF) oldják óvatos rázás közben. Semmilyen körülmények között sem szabad ultrahangos fürdőben feloldani. Ha szükséges, az oldat tisztítható 0,2–2 μ m-es pórusméretű membránszűrővel.

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

1.6.3. Korrekció szennyező- és adalék tartalomra

Rendszerint szükséges a $M < 1\,000$ fajta tartalmának korrekciója a nem-polimer fajtájú jelen lévő komponensek (pl. szennyezők és/vagy adalékok) járulékára, kivéve, ha a mért tartalom már $< 1\%$ -nál. Ezt a polimer oldat vagy a GPC eluátum közvetlen analízisével érjük el.

Ha az oszlopon való áthaladás után az eluátum túl híg a további analízishez, töményíteni kell. Szükséges lehet az eluátum beszárítása és újraoldása. Az eluátum töményítésének olyan körülmények között kell történnie, amelyek biztosítják, hogy az eluátumban nem történik változás. A GPC lépés utáni eluátumkezelés függ a mennyiségi meghatározás használt módszerétől.

1.6.4. Készülék

A GPC készülék a következő komponensekből áll:

- oldószer tartály,
- gázalanító (szükség szerint),
- pumpa,
- lökéscsillapító (szükség szerint),
- injektáló rendszer,
- kromatográfiás oszlopok,
- detektor,
- áramlásmérő (szükség szerint),
- adat rögzítő-feldolgozó,
- hulladékártoló.

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

1.6.5. Injektáló és oldószer szállító rendszer

A minta oldatának meghatározott térfogatát vagy automata adagolóval, vagy kézzel töltik az oszlopra egy élesen definiált zónába. Ha kézzel végzik, a fecskendő dugattyújának túl gyors benyomása, vagy kihúzása a megfigyelt molekulatömeg eloszlásban változásokat okozhat. Az oldószer szállító rendszernek, amennyire csak lehet, lüktetésmentesnek kell lenni, ideálisan pulzálás csillapítót magában foglalva. Az áramlási sebesség 1 ml/perc nagyságrendű.

1.6.6. Oszlop

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

1.6.7. Elméleti tényérszám

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

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

ahol

- N az elméleti tényérszám
 V_e az elúciós térfogat a csúcs maximumnál
 W az alapvonal csúcshélessége
 $W_{1/2}$ a csúcshélesség félmagasságánál.

1.6.8. Az elválasztás hatékonysága

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

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

ahol

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

A rendszer felbontása általában az alábbiak szerint definiált:

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

ahol

- V_{e1}, V_{e2} két polisztirol standard elúciós térfogata a csúcs maximumnál
 W_1, W_2 az alapvonal csúcshélességei
 M_1, M_2 a molekulatömegek a csúcs maximumnál (10-es faktoral térjenek el).

Az oszloprendszerre az R-érték 1,7-nél legyen nagyobb (4).

1.6.9. Oldószerek

Minden oldószernek nagy tisztaságúnak kell lennie (THF-ből 99,5% tisztaságú használatos). Az oldószer tartálynak (inert gáz atmoszférában, ha szükséges) elég nagyoknak kell lenni az oszlop kalibrálásához és néhány mintaanalízishez. Az oldószert gáztalanítani kell, mielőtt a pumpával az oszlopra juttatjuk.

1.6.10. Hőmérséklet szabályozás

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

1.6.11. Detektor

A detektor célja az oszlopról eluált minta koncentrációjának kvantitatív meghatározása. A csúcsok szükségtelen szélesedésének elkerülésére a detektor cella küvetta térfogatának a lehető legkisebbnek kell lenni. Nem lehet nagyobb 10 μl -nél, kivéve a fényszórási és viszkozitás detektoroknál. A detektálásra differenciális törésmutató mérést szokás használni. Azonban, ha a minta vagy az elúciós oldószer speciális tulajdonságai megkövetelik, más detektor típusok is használhatók, pl. UV/VIS, IR, viszkozitás detektor stb.

2. ADATOK ÉS JEGYZŐKÖNYVEZÉS

2.1. Adatok

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

Minden mintánál két független kísérletet kell végezni. Külön-külön kell azokat elemezni. Minden esetben alapvető a mintával azonos körülmények között kezelt vakpróbákból is meghatározni az adatokat.

Fontos világosan jelezni, hogy a mért értékek a használt standard molekulatömegével ekvivalens relatív értékek.

A retenciós térfogatok vagy a retenciós idők (lehetőleg belső standardot használva korrigáltak) meghatározása után a $\log M_p$ értékek (M_p a kalibráló standard csúcs maximuma) lesznek ábrázolva egyikük függvényében. Molekulatömeg dekádanként legalább két kalibrációs pont szükséges, és legalább öt mérési pont kell a teljes görbéhez, aminek le kell fedni a minta becsült molekulatömegét. A kalibrációs görbe kis molekulatömegű végpontját n -hexilbenzol vagy más megfelelő nem-poláris oldott anyag definiálja. A görbének az 1000-nél kisebb molekulatömegeknek megfelelő része szükség szerint van meghatározva korrigálva, a szennyezőkre és adalékokra. Az elúciós görbék általában elektronikus adatfeldolgozással vannak kiértékelve. A kézi digitalizálás esetében az ASTM D 3536-91 használandó (3).

Ha az oszlop bármilyen oldhatatlan polimert visszatart, molekulatömege valószínűleg nagyobb az oldható frakcióénál, és ha nincs figyelembe véve, a kis molekulatömegű tartalom túlbecsülését eredményezi. A mellékletben található útmutatás a kis molekulatömegű tartalom oldhatatlan polimerre való korrekciójára.

Az eloszlási görbét táblázat vagy ábra (differenciális frekvencia vagy összeg százalék a $\log M$ függvényében) formájában kell megadni. Grafikus bemutatásnál egy molekulatömeg dekádnak általában kb. 4 cm szélesnek kell lenni, a csúcs maximumnak pedig kb. 8 cm magasnak kell lenni. Integrális eloszlás görbék esetén az ordinátának 0 és 100% között kb. 10 cm-esnek kell lenni.

2.2. Teszt jegyzőkönyv

A teszt jegyzőkönyvben a következő információknak kell szerepelni:

2.2.1. Tesztanyag

- elérhető információk a tesztanyagról (azonosság, adalékok, szennyezők),
- a mintakezelés, megfigyelések, problémák leírása.

2.2.2. Műszerezettség

- eluens tartály, inert gáz, az eluens gáztalanítása, az eluens összetétele, szennyezői,
- pumpa, pulzálás csillapító, injektáló rendszer,
- elválasztó oszlopok (gyártó, az oszlop jellemzőiről minden információ, mint pórus-méret, az elválasztó anyag fajtája stb., a használt oszlopok száma, hossza, és elrendezése),
- az oszlop (vagy oszlopkombináció) elméleti tényérszáma, elválasztási hatékonysága (a rendszer felbontása),
- információ a csúcsok szimmetriájáról,
- oszlop hőmérséklet, hőmérséklet szabályozás módja,
- detektor (mérési elv, típus, küvetta térfogat),
- áramlásmérő, ha használva lett (gyártó, mérési elv),
- adatrögzítő és -feldolgozó rendszer (hardver és szoftver).

2.2.3. A rendszer kalibrálása

- a kalibrációs görbék megalkotásához használt módszer részletes leírása,
- információk a módszer minőségi kritériumairól (pl. korrelációs együttható, hiba négyzetösszeg stb.),
- információk minden, a kísérleti eljárás és az adatok kiértékelése és feldolgozása során alkalmazott extrapolációról, feltételezésről és közelítésről,
- a kalibrációs görbék megalkotásához használt minden mérést dokumentálni kell egy táblázatban, amely minden kalibrációs pontra a következőket tartalmazza:

- a minta neve,
- a minta gyártója,
- az M_p , M_n , M_w és M_w/M_n , standardok jellemző értékei, ahogy a gyártó rendelkezésre bocsátotta, vagy azt követő mérésekből következnek, a meghatározási módszer részleteivel együtt,
- injektálási térfogat és koncentráció,
- a kalibrációhoz használt M_p érték,
- a csúcs maximumoknál mért elúciós térfogat, vagy korrigált retenciós idő,
- a csúcs maximumnál számított M_p ,
- a számított M_p és a kalibrációs érték százalékos hibája.

2.2.4. Információ a kis molekulatömegű polimer tartalomról

- az analízishez használt módszerek és a kísérletek kivitelezése módjának leírása,
- információ a teljes mintára vonatkoztatott kis molekulatömegű fajta százalékos (w/w) tartalomról,

– információ a teljes mintára vonatkoztatott szennyező, adalék, és más nem-polimer fajta tartalomról, tömegszázalékban.

2.2.5. Kiértékelés:

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

- információ arról, hogy a kiértékelés az elúciós térfogat, vagy a retenciós idő alapján történt,
- információ a kiértékelés korlátairól, ha egy csúcs nem lett teljesen elemezve,
- a simítási módszerek leírása, ha használva lettek,
- minta előállítási és előkezelési eljárások,
- feloldatlan részecskék jelenléte, ha voltak,
- injektálási térfogat (μl) és injektálási koncentráció (mg/ml),
- az ideális GPC profiltól való eltéréshez vezető hatásokat jelző megfigyelések,
- a teszt eljárások minden módosításának részletes leírása,
- a hibatarományok részletei,
- az eredmények értelmezésre vonatkozó bármely egyéb információ és megfigyelés.

3. IRODALOMJEGYZÉK

(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.

Melléklet

Útmutató a melletti kis molekulatömeg tartalom korrekciójához oldhatatlan polimer jelenléte esetén

Ha oldhatatlan polimer van jelen a mintában, tömegvesztéseget okoz a GPC analízis során. Az oldhatatlan polimer irreverzibilisen visszatartódik az oszlopon vagy a minta szűrőn, a minta oldható része pedig áthalad az oszlopon. Ha a polimer törésmutató növekedése (dn/dc) megbecsülhető vagy mérhető, meg lehet becsülni a minta tömegvesztését az oszlopon. Ekkor ismert koncentrációjú standard anyagokkal való külső kalibrálás és a dn/dc használatával korrekció alkalmazható a refraktométer válaszában kalibrálására. Az itt következő példában poli(metil-metakrilát) (pMMA) standardot használtak.

Az akril polimerek analízisének a külső kalibráció során ismert koncentrációjú tetrahydrofuranban oldott pMMA standardot analizálnak GPC-vel. A kapott adatok használhatók a refraktométer-állandó megállapításához, a következő egyenlet szerint:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

ahol

K a refraktométer-állandó (mikrovoltmásodperc/ml-ben)

R a pMMA standard válasza (mikrovoltmásodperc-ben)

C a pMMA standard koncentrációja (mg/ml-ben)

V az injektált térfogat (ml-ben) és

dn/dc a törésmutató növekedése pMMA-ra tetrahydrofuranban (ml/mg-ban).

A következő adatok tipikusak a pMMA standardra:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg.

Az eredményül kapott K értéket ($3,05 \times 10^{11}$) ezután az elméleti detektor válasz kiszámítására lehet használni, arra az esetre, ha az injektált polimer 100%-a eluálódott a detektoron.

A.20. POLIMEREK OLDÓDÁSI/EXTRAKCIÓS TULAJDONSÁGAI VÍZBEN

1. MÓDSZER

A leírt módszer az OECD TG 120 (1997) másolata. Az alapelvek és további technikai információk az 1. hivatkozásban vannak megadva.

1.1. Bevezetés

Bizonyos polimereknél, pl. emulziós polimereknél, kezdeti előkészítő munkára lehet szükség, mielőtt az alábbiakban közölt módszert használni lehetne. A módszer nem alkalmas folyadék polimerekre és a vizsgálati körülmények között vízzel reagáló polimerekre.

Ha a módszer nem praktikus, vagy nem lehetséges, az oldódás/extrakció más módszerekkel is vizsgálható. Ilyen esetben meg kell adni a használt módszer minden részletét és igazolását.

1.2. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.3. A teszt módszer elve

A polimerek vizes közegben való oldódási/extrakciós tulajdonságai lombik módszerrel (lásd A.6 vízoldhatóság, lombik módszer) határozhatók meg, az alább leírt módosításokkal.

1.4. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.5. A teszt módszer leírása

1.5.1. Berendezés

A következő berendezés szükséges a módszerhez:

- aprító eszköz, pl. őrlőmalom ismert méretű részecskék előállítására,
- rázókészülék, hőmérséklet szabályozási lehetőséggel,
- membránszűrő rendszer,
- megfelelő analitikai berendezés,
- standardizált sziták.

1.5.2. Mintakészítés

Egy reprezentatív mintát először 0,125 és 0,25 mm közötti részecske méretűre kell csökkenteni megfelelő szitákat használva. Szükség lehet hűtésre a minta stabilitásához, vagy az őrlési folyamatnál. Gumyszerű anyagok folyékony nitrogén hőmérsékleten apríthatók (1).

Ha a megkövetelt részecske méret nem érhető el, a részecske méretet annyira le kell csökkenteni, amennyire csak lehetséges, és jegyzőkönyvezni kell az eredményt. A jegyzőkönyvben fel kell tüntetni az aprított minta teszt előtti tárolási módját.

1.5.3. Eljárás

A tesztanyagból három 10 g-os mintát kell bemérni egyenként, három üvegdugós edénybe, és 1 000 ml vizet kell adni mindegyikhez. Ha 10 g mennyiségű polimer kezelése kivihetetlen, a következő legnagyobb kezelhető mennyiséget kell használni, és a víz mennyiségét ehhez igazítani.

Az edényeket szorosan be kell dugni és 20 °C-on rázni. Állandó hőmérsékleten működni képes rázó vagy keverő eszközt kell használni. 24 órás időtartam elteltével az edények tartalmát centrifugálni vagy szűrni kell, és a polimer koncentrációját a tiszta vizes fázisban megfelelő analitikai módszerrel meg kell határozni. Ha nincs megfelelő analitikai módszer a vizes fázishoz, a teljes oldhatóság/extrahálhatóság megbecsülhető a szűrési maradék, vagy centrifugálási csapadék száraz tömegéből.

Rendszerint szükség van egyrészt a szennyezők és az adalékok, másrészt a kis molekulatömegű fajták közti mennyiségi megkülönböztetésre. Gravimetriás meghatározásnál tesztanyag használata nélküli vakpróba elvégzése is szükséges, hogy a kísérleti eljárásból származó maradványokkal is el lehessen számolni.

A polimerek oldódási/extrakciós tulajdonságainak meghatározása vízben 37 °C-on 2-es és 9-es pH-nál, a 20 °C-on történő kísérlet leírása szerint végezhető. A pH értékek vagy alkalmas pufferek, vagy megfelelő savak és bázisok, mint sósav, ecetsav, analitikai tisztaságú nátrium-, vagy káliumhidroxid, vagy NH₃ hozzáadásával állíthatók be.

A használt analitikai módszertől függően egy vagy két tesztet kell elvégezni. Ha a vizes fázis polimer tartalmának közvetlen analizisére elegendően specifikus módszerek állnak rendelkezésre, egy, a fent leírtak szerinti tesztnek kielégítőnek kell lenni. Ha ilyen módszerek nem állnak rendelkezésre és a polimer oldódási/extrakciós tulajdonságait csak a vizes extraktum teljes szerves szén (TOC) tartalmának közvetett analizisével határozzuk meg, még egy további tesztet kell elvégezni. Ezt a további tesztet is három párhuzamossal kell megcsinálni, 10-szer kisebb polimer mintákkal és az első tesztben használttal azonos vízmennyiséggel.

1.5.4. Analízis

1.5.4.1. Egy mintamérettel végzett teszt

Rendelkezésre állhatnak módszerek a vizes fázisú polimer komponenseinek közvetlen analizésére. Alternatív lehetőségként fontolóra vehető az oldott/extrahált polimer komponensek közvetett analizése a teljes oldható rész tartalom meghatározásával és a nem polimer-specifikus komponensekre vonatkozó korrekcióval.

A vizes fázis összes polimer fajtára való analizése lehetséges:

vagy elegendően érzékeny módszerrel, pl.

– TOC, CO₂-ot fejlesztő perszulfát vagy dikromát feltárással, amit IR-rel, vagy kémiai analizissel történő becslés követ,

– atomabszorpciós spektroszkópia (AAS), vagy induktívan csatolt plazma (ICP) emisszió ekvivalense szilícium, vagy fémtartalmú polimereknél,

– UV abszorpció vagy spektrofluorimetria aril polimereknél,

– LC-MS kis molekulatömegű mintáknál,

vagy a vizes extraktum száradásig történő vákuumbepárlásával és a maradék spektroszkópiás (IR, UV, stb.) vagy AAS/ICP analizésével.

Ha a vizes fázis ily módon történő analizése nem kivitelezhető, a vizes extraktumot vízzel nem elegyedő szerves oldószerrel, pl. klórozott szénhidrogénnel kell extrahálni. Az oldószert ezután el kell párologtatni, és a maradékot a fentiek szerint kell analizálni a megadott polimer tartalomra. Bármilyen szennyezőként vagy adalékként azonosított komponenst ebben a maradékban le kell vonni a polimerre magára jellemző oldódás/extrakciós fok meghatározásának céljából.

Ha ezeknek az anyagoknak viszonylag nagy mennyisége van jelen, szükséges lehet a maradékot például HPLC-vel vagy GC-vel analizálni, hogy megkülönböztethetők legyenek a szennyezők a jelen lévő monomer és monomer származék fajtáktól, és az utóbbiak valódi tartalma meghatározható legyen.

Néhány esetben elegendő lehet a szerves oldószer egyszerű száradásig történő elpárologtatása és a száraz maradék lemerése.

1.5.4.2. Két különböző mintamérettel végzett teszt

Minden vizes extraktumot TOC-ra is meg kell vizsgálni.

A nem oldódott/nem extrahált minta részlet gravimetriás meghatározásra kerül. Ha az egyes edények tartalmának centrifugálása, vagy szűrése után polimer maradékok maradnak az edény falához tapadva, az edényt a szűrlettel kell öblíteni, amíg az edény megtisztul minden látható maradéktól. Ezt követően a szűrletet újra centrifugáljuk, vagy szűrjük. A szűrőn, vagy a centrifuga csőben maradó maradékok 40 °C-on vákuumban szárítjuk és lemérjük. A szárítást állandó tömeg eléréséig kell folytatni.

2. ADATOK

2.1. Egy minta mérettel végzett teszt

Mind a három lombik egyedi eredményeit és az átlag értékeket is meg kell adni, és az oldat tömeg per térfogat (tipikusan mg/l), vagy tömeg per polimer minta tömeg (tipikusan mg/g) egységekben kell kifejezni. Továbbá a minta tömegveszteségét (számítása: az oldott anyag tömege osztva a kiindulási minta tömegével) is meg kell adni. Ki kell számolni a relatív standard deviációkat (RSD). Meg kell adni az egyedi számokat a teljes anyagra (polimer + alapvető adalékok, stb.) és csak a polimerre (azaz az ilyen adalékok járulékanak levonása után).

2.2. Két különböző minta mérettel végzett teszt

Meg kell adni a két három párhuzamossal végzett kísérlet vizes extraktumainak, tömeg per oldat térfogat (tipikusan mgC/l) és tömeg per kiindulási mintatömeg (tipikusan mgC/g) egységekben is kifejezett, egyedi TOC értékeit és az átlag értéket az egyes kísérletekre.

Ha nincs különbség a nagy és kis minta/víz arány eredményeiben, ez azt jelezheti, hogy minden extrahálható komponens tényleg extrahálva lett. Ebben az esetben a közvetlen analizis általában nem szükséges.

A maradékok egyedi tömegeit meg kell adni és a minták kiindulási tömegének százalékában kell kifejezni. Átlagokat kísérletenként kell számolni. A 100 és a talált százalék különbsége az eredeti mintában lévő oldható és extrahálható anyag százalékát képviseli.

3. JEGYZŐKÖNYVEZÉS

3.1. Vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati jegyzőkönyvben a következő információknak kell szerepelni:

3.1.1. Vizsgálati anyag

– elérhető információk a tesztanyagról (azonosság, adalékok, szennyezők, kismolekulatömegű fajta tartalom).

3.1.2. Kísérleti körülmények

– a használt eljárások és kísérleti körülmények leírása,

– az analitikai és detektálási módszerek leírása.

3.1.3. Eredmények

- oldhatóság/extrahálhatóság eredmények mg/l-ben; a különböző oldatokbeli extrakciós tesztek egyedi és átlag értékei, polimer tartalom és szennyezők, adalékok stb. szerint bontva,
- oldhatóság/extrahálhatóság eredmények mg/polimer g-ban,
- a vizes extraktumok TOC értékei, az oldott anyag tömege és a számolt százalékok, ha mérve lettek,
- az egyes minták pH-ja,
- információ a vakpróba értékekről,
- irodalmi hivatkozások a tesztanyag kémiai instabilitásról a tesztelő és az analitikai eljárás alatt, ha szükséges,
- minden, az eredmények értelmezéséhez fontos információ.

4. IRODALOMJEGYZÉK

- (1) DIN 5377 (1976) Zerkleinerung von Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.

„B” RÉSZ**MÓDSZEREK A TOXIKOLÓGIAI TULAJDONSÁGOK
MEGHATÁROZÁSÁHOZ****TARTALOMJEGYZÉK**

- B. A vizsgálati módszereknél használt szakkifejezések általános meghatározása
- B.1. Akut toxicitás trisz (orális) – Akut osztályozási rendszer
- B.1. Akut toxicitás bis (orális) – Fix dózis módszer
- B.2. Akut toxicitás (inhaláció)
- B.3. Akut toxicitás (dermális)
- B.4. Akut toxicitás (bőrirritáció)
- B.5. Akut toxicitás (szemirritáció)
- B.6. Bőrszenzibilizáció
- B.7. Ismételt adagolású (28 nap) toxicitás (orális)
- B.8. Ismételt adagolású (28 nap) toxicitás (inhaláció)
- B.9. Ismételt adagolású (28 nap) toxicitás (dermális)
- B.10. Mutagenitás – in vitro emlős kromoszóma aberráció vizsgálat
- B.11. Mutagenitás – in vivo emlős kromoszóma aberráció vizsgálat
- B.12. Mutagenitás in vivo emlős eritrocita mikronukleusz vizsgálat
- B.13/14. Mutagenitás – bakteriális reverz mutagenitási vizsgálat
- B.15. Mutagenitás – génmutáció vizsgálata *Saccharomyces cerevisiae*-ben
- B.16. Mítotikus rekombináció vizsgálat *Saccharomyces cerevisiae*-ben
- B.17. Mutagenitás – in vitro emlős sejt génmutáció vizsgálat
- B.18. DNS károsodás és reparáció – nem tervezett DNS szintézis (Unscheduled DNA synthesis, UDS) vizsgálat emlős sejtben
- B.19. In vitro emlős testvérkromatid kicserélődés (sister chromatid exchange, SCE) vizsgálat
- B.20. Nemhez kötött recesszív letárlis teszt *drosophila melanogaster*-ben
- B.21. In vitro emlős sejtranszformációs vizsgálat
- B.22. Domináns letális vizsgálat rágcsálókban
- B.23. Mutagenitás – emlős spermioconiális kromoszóma aberráció vizsgálat
- B.24. Egér folt (spot) teszt
- B.25. Öröklődő transzlokáció vizsgálat egérben
- B.26. Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat – 90 napos ismételt orális adagolású vizsgálat rágcsálókban
- B.27. Szubkrónikus orális toxicitási vizsgálat – 90 napos ismételt orális adagolású vizsgálat nem-rágcsálókban
- B.28. Szubkrónikus dermális toxicitási vizsgálat – 90 napos ismételt dermális adagolású vizsgálat rágcsálókban
- B.29. Szubkrónikus inhalációs toxicitási vizsgálat – 90 napos ismételt inhalációs adagolású vizsgálat rágcsálókban
- B.30. Krónikus toxicitási vizsgálat
- B.31. Teratogenitási vizsgálat rágcsálókban és nem-rágcsálókban
- B.32. A rákkeltő hatás vizsgálat
- B.33. A krónikus toxicitás/rákkeltő hatás kombinált vizsgálata
- B.34. Egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat
- B.35. Kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat
- B.36. Toxikokinetika
- B.37. Szerves foszforvegyületek késői neurotoxicitást okozó hatása akut expozíció után
- B.38. Szerves foszforvegyületek késői neurotoxicitást okozó hatása – 28 napos ismételt adagolású vizsgálat
- B.39. Nem programozott DNS szintézis vizsgálata (UDS-TESTZT) emlős májsejteken in vivo
- B.40. Bőrkorrózió
- B.41. Fototoxicitás – in vitro 3T3 NRU fototoxicitás próba

B. A VIZSGÁLATI MÓDSZEREKNÉL HASZNÁLT SZAKKIFEJEZÉSEK ÁLTALÁNOS MEGHATÁROZÁSA

(i) *Heveny mérgezés (akut toxicitás)*: azok az ártalmas hatások, amelyek adott időtartamon belül lépnek fel (általában 14 nap), az anyag egyszeri adagban történő beadása után.

(ii) *Nyilvánvaló (evidens) mérgezés*: a vizsgálati anyag beadása után a jól látható mérgezési tüneteket leíró általános meghatározás. Ez a leírás legyen elegendő a veszély becslésére és legyen olyan, hogy jelezze, a beadott dózis növelése esetén súlyos mérgezési tünetek kifejlődése, illetve lehetséges halálozás várható.

(iii) *Dózis*: a beadott vizsgálati anyag mennyisége. A dózis nagyságát tömegben (gramm vagy milligramm), vagy a vizsgálati anyag tömegének a vizsgált állat tömegére vonatkoztatva (pl. milligramm anyag/testtömeg kilogramm), vagy a táplálékba kevert anyag állandó koncentrációjában (ppm, vagy milligramm anyag/táplálék kilogramm) adják meg.

(iv) *Megkülönböztető dózis*: a négy adott dózisszint közül a legnagyobb, amelynek beadása még nem okoz anyagnak tulajdonítható elhullást (beleértve a humánus kiírtást is).

(v) *Adagolás*: általános szakkifejezés, ami magába foglalja a dózist, annak gyakoriságát és a beadás időtartamát.

(vi) *LD₅₀ (közepes halálos dózis)*: az adott anyag statisztikailag meghatározott egyszeri dózisa, amely a vizsgált állatok 50 százalékánál várhatóan halált okoz. Az LD₅₀ értéket a vizsgálati anyag tömegének a vizsgálati állat testtömegére vonatkoztatva adják meg (milligramm/kilogramm).

(vii) *LC₅₀ (közepes halálos koncentráció)*: az a statisztikailag meghatározott anyagkoncentráció, amely az expozíció alatt, vagy azután a vizsgált állatok 50 százalékánál meghatározott időn belül várhatóan halált okoz.

Az LC₅₀ érték a vizsgálati anyag tömegének standard levegőtérfogatra vonatkoztatott mennyisége (milligramm/liter).

(viii) *NOAEL*: a nem észlelt ártalmas hatás szintjének rövidítése, az a legnagyobb dózis, vagy expozíció, amely mellett nem észlelhetők kezeléssel kapcsolatos ártalmas hatások.

(ix) *Ismételt dózis/szubkrónikus toxicitás*: magába foglalja a kísérleti állatokon előforduló ártalmas hatásokat, amelyeket az adott vegyi anyag ismétlődő, napi adagolása, vagy expozíciója az állat várható élettartamának egy rövid szakasza alatt okoz.

(x) *Legnagyobb tolerálható dózis (MTD)*: az a legnagyobb dózis, amely a mérgezési tüneteket okoz az állatokon, de nem befolyásolja jelentősen a túlélést az alkalmazott vizsgálatban.

(xi) *Bőrrirritáció*: gyulladáshoz vezető elváltozások kialakulása a bőrben a vizsgált anyag alkalmazása után.

(xii) *Szemirritáció*: elváltozások kialakulása a szemben a vizsgált anyagnak a szem elülső felületén való alkalmazása után.

(xiii) *Bőrszenzibilizáció*: (allergiás kontakt dermatitisz) az immunrendszer által közvetített bőrreakció az adott anyagra.

(xiv) *Bőr kimaródás (korrózió)*: visszafordíthatatlan szövetkárosodás a bőrben a vizsgálati anyag 3 perc és 4 óra közötti időtartamú alkalmazása után.

(xv) *Toxikokinetika*: a vizsgálati anyag felszívódásának, eloszlásának, metabolizmusának és kiürülésének vizsgálata.

(xvi) *Felszívódás*: az a folyamat, amelynek során a beadott anyag bejut a szervezetbe.

(xvii) *Kiürülés*: az a folyamat, amelynek során a beadott anyag és/vagy annak bomlástermékei elhagyják a szervezetet.

(xviii) *Eloszlás*: az a folyamat, amelynek során a felszívódott anyag és/vagy annak bomlástermékei eloszlanak a szervezetben.

(xix) *Metabolizmus*: az a folyamat, amelynek során a szervezetben a beadott anyag szerkezete enzimatis vagy nem enzimatis reakciók következményeképpen megváltozik.

B.I. Heveny/akut – ismételt adagolású/szubkrónikus és krónikus toxicitás

Az adott anyag heveny (akut) toxikus hatásának és valamely szervre vagy a szervezetre gyakorolt mérgező hatásának az értékelése toxicitási vizsgálattal végezhető el (B.1–B.5 módszerek), amelyek alapján az egyszeri dózist követő mérgező hatás jellege előzetesen megállapítható.

Az adott anyag toxicitásától függően, a teljes LD₅₀-nel szemben valamely határérték vizsgálati módszer (limit teszt) alkalmazását tekintetbe lehet venni, bár az inhalációs vizsgálatokra határérték vizsgálati módszert nem határoztak meg, mivel nem lehetett az egyszeri expozíció inhalációs határértékét megállapítani.

Meg kell fontolni azokat a módszereket, amelyek a lehető legkevesebb állatot használják, és amelyek a lehető legjobban enyhítik az állatok szenvedését, mint például a fix dózis módszer (B.1 bisz módszer) és a heveny mérgezési osztály módszer (B.1 trisz). Az 1. szintű vizsgálatban egy másik fajon végzett vizsgálat teljessé teheti az első vizsgálatból levont következtetéseket. Ebben az esetben valamely szabványos vizsgálati módszer használható, vagy a módszer kevesebb állat felhasználásával adaptálható.

Az ismételt adagolású toxicitási vizsgálati módszer (B.7, B.8 és B.9 módszer) tartalmazza az ismételt beadás toxikus hatásának értékelését is. Az állatok alapos klinikai megfigyelése és a lehető legtöbb adat összegyűjtése különösen fontos. Ezek a vizsgálatok segítenek a célszervek, illetve a mérgező és nem mérgező dózisok meghatározásában. Ezeknek a szempontoknak a további, alaposabb vizsgálatára a hosszú időtartamú vizsgálatoknál (B.26–B.30 és B.33 módszer) lehet szükség.

B.II. Mutagenitás – genotoxicitás

A mutagenitás fogalma a sejtek vagy organizmusok genetikai anyagának mennyiségében vagy szerkezetében bekövetkezett állandó, öröklődő változások előidézésére vonatkozik. Ezek a változások, a „mutációk” érinthetnek egyetlen gént, a gének egy szakaszát, a gének egy csoportját, vagy teljes kromoszómákat. Egy teljes kromoszómára kiterjedő hatások lehetnek szerkezeti és/vagy számbeli változások.

Valamely anyag mutagén aktivitásának becslése, *in vitro* baktériumokon végzett gén (pont)mutációs (B.13/14 módszer) és/vagy emlős sejteken végzett szerkezeti kromoszóma aberráció (B.10 módszer) vizsgálatokkal történik.

Elfogadhatók az *in vivo* eljárások is, mint pl. a mikronukleusz teszt (B.12 módszer), vagy a csontvelő sejtek metafázis analízise (B.11 módszer). Amennyiben azonban nincs valamilyen ellenjavallatuk, erre a célra az *in vitro* módszerek mindenképpen előnyben részesítendők.

További mutagenitási vizsgálatok, vagy előszűrés a daganatkeltő hatásra szükséges lehet a nagyobb mennyiségben gyártott anyagoknál és/vagy a kockázatbecslésnél. Ezeket a vizsgálatokat több célból is végezhetik: az (*in vitro*) alaptesztekben kapott eredmények megerősítésére, az alaptesztekben nem vizsgált végpontok tesztelésére, és az *in vivo* vizsgálatok bevezetésére vagy kiterjesztésére.

Ezekre a célokra szolgálnak a B.15–B.25 módszerek, amelyek egyaránt magukba foglalnak *in vitro* és *in vivo* eukariota rendszereket, egyúttal lehetőséget adnak a biológiai végpontok szélesebb körének tesztelésére. Ezek a tesztek információkat nyújtanak a pontmutációkra és más végpontokra is az alaptesztekben használt baktériumoknál magasabb rendű tesztorganizmusokban.

A további mutagenitási vizsgálatok tervezésénél általános alapelv, miszerint azokat úgy kell megtervezni, hogy további lényeges információkkal szolgáljanak a kémiai anyag mutagén és/vagy karcinogén hatásáról.

Az, hogy egy adott esetben melyik vizsgálat lehet a megfelelő, számos körülménytől függ. Ilyenek a tesztanyag fizikokémiai tulajdonságai, az alap *in vitro* bakteriális és citogenetikai tesztekben kapott eredmények, a tesztanyag metabolizmusa, más toxicitási vizsgálatokban kapott eredmények, és a tesztanyag ismert felhasználási területe. Tekintettel a figyelembe veendő számos tényezőre, a tesztek kiválasztására nem lehet egy merev sémát alkalmazni.

A tesztelési stratégia néhány alapelve a 2000. évi XXV. törvényben irányelvben van lefektetve, de egyértelmű tesztelési stratégia a Kockázatbecslés dokumentum technikai ajánlásában található, amely ezzel együtt kellően rugalmas és jól alkalmazható specifikus körülményekhez is.

A további vizsgálómódszerek az alapvető genetikai végpontok szerint csoportosítva az alábbiak:

Gén (pont)mutációk vizsgálatára szolgáló módszerek:

a) Előre/oda(forward) és vissza(reverse) mutáció vizsgálata eukariota mikroorganizmusokban (*Saccharomyces cerevisiae*) (B.15 módszer)

b) Előre/oda-mutáció *in vitro* vizsgálata emlős sejtekben (B.17. módszer)

c) Nemhez kötött recesszív letális teszt *Drosophila melanogaster*-ben (B.20 módszer)

d) *In vivo* testi sejt mutáció vizsgálata, egér (bőrfolt) spot teszt (B.24 módszer)

Kromoszóma aberrációk vizsgálatára szolgáló módszerek:

a) *In vivo* citogenetikai vizsgálatok emlősökben; *In vivo* esontvelősejt metafázis vizsgálat jön elsősorban szóba, amennyiben nem szerepelt az alaptesztek között (B.11 módszer); Végezhető továbbá *in vivo* ivarsejt citogenetikai vizsgálat (B.10)

b) *In vitro* citogenetikai vizsgálat emlős sejtekben, amennyiben nem szerepelt az alaptesztek között (B.10 módszer)

c) Domináns letális vizsgálat rácsálókban (B.22 módszer)

d) Egér öröklődő transzlokáció vizsgálat (B.25 módszer)

Genotoxikus hatások – DNS hatások

A genotoxicitás a genetikai állományra kifejtett potenciálisan ártalmas hatásként határozható meg, ami nem szükségszerűen jár mutagenitással, és amit DNS károsodás indukálása jelezhet a mutagenitás közvetlen bizonyítékai nélkül. A következő, eukariota mikroorganizmusokon és emlős sejteken végezhető módszerek lehetnek alkalmasak ilyen vizsgálatokra:

a) Mitotikus rekombináció *Saccharomyces cerevisiae* (B.16 módszer)

b) DNS károsodás és reparáció – nem tervezett DNS szintézis (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) emlős sejtekben *in vitro* (B.18 módszer)

c) Testvérkromatid kicserélődés (Sister Chromatid Exchange, SCE) emlős sejtekben *in vitro* (B.19 módszer)

Alternatív módszerek a daganatkeltő hatás vizsgálatára

Vannak olyan emlős sejttanszformációs módszerek, amelyekkel vizsgálhatók valamely tesztanyag által tenyésztett sejtekben előidézett olyan morfológiai és tulajdonságbeli elváltozások, amelyek vélhetően összefüggenek az *in vivo* malignus sejttanszformációval (B.21 módszer). Több, különböző sejttípus és transzformációs kritérium használható.

Öröklődő változások kockázatának becslése emlősökben

Vannak olyan tesztek, amelyek öröklődő hatások kimutatására szolgálnak emlősökben, mint pl. a gén (pont)mutációkat detektáló egér specifikus lokusz teszt, ami az ivarsejt mutációt az első generációban mutatja ki (ez a melléklet nem tartalmazza), vagy pl. a kromoszóma aberrációkat detektáló egér öröklődő transzlokáció teszt (B.25 módszer). Ezek a tesztek valamely anyag lehetséges emberi genetikai kockázatának becslésére használhatók. Azonban tekintettel ezeknek a teszteknek a komplexitására és igen nagy állatigényére, ami különösen a specifikus lokusz teszt esetében igen magas, kivitelezésüket igen alaposan meg kell indokolni.

B.III. Daganatkeltő hatás

A daganatkeltőket feltételezett hatásmechanizmusuk alapján genotoxikus és nemgenotoxikus daganatkeltőkként lehet minősíteni.

Egy anyag genotoxikus daganatkeltő potenciáljára vonatkozó előzetes információk nyerhetők a mutagenitási/genotoxicitási vizsgálatokból. További információk nyerhetők az ismételt kezeléssel, a szubkrónikus és a krónikus toxicitási vizsgálatokból. Az ismételt kezeléssel toxicitási vizsgálat, a B.7 módszer és a hosszabb tartamú ismételt kezeléssel vizsgálatok során észlelt kórszövettani elváltozások, pl. bizonyos szövetek túltengései (hyperplasia) lehetnek még ezzel kapcsolatosak. Ezek a vizsgálatok és a toxikokinetikai információk segíthetnek a daganatkeltő kémiai anyagok azonosításában, amely még további mélyebb vizsgálatot igényelhet a karcinogenitási tesztben (B.32 módszer), vagy gyakran egy kombinált krónikus toxicitási/karcinogenitási vizsgálatban (B.33 módszer).

B.IV. Reprodukciós toxicitás

A reprodukciós toxicitás fogalmába tartozik, pl. a férfi és női nemzőképesség vagy teljesítmény csökkenése, amit mint a „fertilitásra gyakorolt hatást”, vagy a nem öröklődő ártalmas hatások előfordulása, amit mint „fejlődési toxicitást” határoznak meg, beleértve a teratogenitást és a laktáció idő tartama alatti hatásokat is.

A teratogenitást tanulmányozását, mint a fejlődési toxicitást vizsgálatok részét (B.31 módszer), elsődlegesen szájon át történő beadásmóddal végzik. Emellett a vizsgálati anyag fizikai tulajdonságaitól, illetve a humán expozíciós úttól függően más beadásmód is alkalmazható. Ezekben az esetekben, a vizsgálati módszert a 28 napos vizsgálati módszer ideillő elemeinek a figyelembevételével megfelelően adaptálni kell.

Ahol háromgenerációs reprodukciós (fertilitási) vizsgálat szükséges, ott a kétgenerációs reprodukciós vizsgálatot (B.35 módszer) ki lehet terjeszteni a harmadik generációra.

B.V. Neurotoxicitás

A neurotoxicitás többféle módon állapítható meg, pl. a központi vagy a környéki (perifériás) idegrendszer működésbeli és/vagy szerkezeti, illetve biokémiai elváltozásaival. A neurotoxicitásról az akut toxicitási vizsgálatokból lehet előzetes következtetéseket levonni. Az ismételt adagolású toxicitási vizsgálat (B.7 módszer) magába foglalja a neurotoxikus hatások értékelését és a stresszhatás alatt álló állatok gondos klinikai megfigyelését, annak érdekében, hogy a lehető legtöbb információt összegyűjtsék. A módszerek segítséget kell nyújtania a neurotoxikus vegyi anyagok azonosításához, melyek ebből a szempontból további, alaposabb vizsgálatot igényelnek. Fontos továbbá, hogy vegyék figyelembe az anyagoknak azokat a speciális neurotoxikus hatásokat kiváltó tulajdonságait, melyeket más toxicitási vizsgálatokkal nem lehet kimutatni. Megfigyelték például, hogy meghatározott foszforvegyületeknek olyan késői neurotoxikus hatása van, amely a B.37 és B.38 módszer alkalmazásával, egyszeri vagy ismételt adagolású expozícióval értékelhető.

B.VI. Immuntoxicitás

Immuntoxicitás többféle módon állapítható meg, ez lehet pl. az immunrendszer elfojtása (immunszuppresszió) és/vagy az immunrendszer érzékenységének fokozása, amely vagy túlérzékenységet, vagy kiváltott autoimmunitást okoz. Az immuntoxikus hatások értékelését az ismételt adagolású toxicitási vizsgálat (B.7 módszer) tartalmazza. A módszernek segítséget kell nyújtania azoknak az immuntoxikus vegyi anyagoknak az azonosításához, melyek ebből a szempontból további, alaposabb vizsgálatot igényelnek.

B.VII. Toxikokinetika

A toxikokinetikai vizsgálatok segítenek a toxicitási adatok értelmezésében és értékelésében. Ezek a vizsgálatok arra szolgálnak, hogy felfedjék az adott vegyi anyag sajátos toxikus hatásait és az eredmények segítséget nyújthatnak a további toxicitási vizsgálatok tervezéséhez. Azt, hogy minden esetben szükség van-e valamennyi paraméter meghatározására, nem lehet előre látni. Az összes toxikokinetikai vizsgálat (felszívódás, kiürülés, eloszlás és metabolizmus) elvégzésére csak nagyon ritkán van szükség. Egyes anyagoknál érdemes a vizsgálati sorrendet megváltoztatni, vagy a vizsgálatok egyszeri adagolással történő elvégzése már elég lehet (B.36 módszer).

A kémiai szerkezetre (SAR) és a fizikai-kémiai tulajdonságokra vonatkozó ismeretek is utalhatnak a tervezett beadásmódnál várható felszívódás jellemzőire, valamint a szöveti eloszlás és a lebomlás lehetőségeire. A toxikokinetikai paramétereikről az előzetes toxicitási és toxikokinetikai vizsgálatok is adhatnak információt.

C. A vizsgálati anyag jellemzése

A vizsgálati anyag összetételét – beleértve a főbb szennyezőanyagokat és a lényeges fizikai-kémiai tulajdonságokat, például a stabilitást – bármely toxicitási vizsgálat megkezdése előtt ismerni kell.

A vizsgálati anyag fizikai-kémiai tulajdonságai fontos tájékoztatást adnak a beadási mód megválasztásához, egyes speciális vizsgálatok tervezéséhez, valamint a vizsgálati anyag kezeléséhez és tárolásához.

A vizsgálat megkezdése előtt ki kell fejleszteni az adott anyag (amennyiben lehetséges, a főbb szennyezőkkel együtt) minőségi és mennyiségi kimutatására szolgáló analitikai módszert az adagolási közegben és a biológiai anyagban.

Az azonosításra, a fizikai-kémiai tulajdonságok meghatározására, a tisztaságra és a vizsgálati anyag viselkedésére vonatkozó összes információnak szerepelnie kell a vizsgálati jelentésben.

D. Az állatok gondozása

A környezeti feltételek szigorú ellenőrzése és az állatok megfelelő gondozása lényeges a toxicitási vizsgálatokban.

(i) Tartási körülmények

Az állatkísérletekre és a kísérleti állatok tartására szolgáló helyiségek környezeti körülményei feleljenek meg a vizsgált állatfajnak. Patkányok, egerek és tengerimalacok számára a megfelelő körülmények: 22 ± 3 °C szobahőmérséklet, 30–70 százalékos relatív páratartalom; míg nyulak számára a megfelelő körülmények: 20 ± 3 °C hőmérséklet, 30–70 százalékos relatív páratartalom.

Néhány kísérleti eljárás különösen érzékeny a hőmérsékleti hatásokra, ezekben az esetekben a vizsgálati körülményeket a vizsgálati módszer leírásában meg kell adni. Minden toxikológiai vizsgálatban ellenőrizni és rögzíteni kell a hőmérsékletet és a páratartalmat, és ezt bele kell venni a vizsgálati zárójelentésbe.

A világítás legyen mesterséges, 12 órás világos és 12 órás sötét időszakkal. A megvilágítási jellemzők adatait fel kell jegyezni és bele kell venni a vizsgálati zárójelentésbe.

Hacsak a módszer leírásában más nem szerepel, az állatokat egyenként, elkülönítve vagy kis, azonos nemű csoportokban összearva kell tartani; csoportos tartásnál egy ketrecben legfeljebb öt állat tartható.

Az állatkísérletekről készített jelentésben fontos megadni az állatcsoportok típusát és az egyes ketrecekben tartott állatok számát, az expozíció és a megfigyelés ideje alatt egyaránt.

(ii) Takarmányozási feltételek

Az alkalmazott tápnek meg kell felelnie a vizsgált állatfajra érvényes valamennyi takarmányozási követelménynek. Amikor a vizsgált anyagokat az állatok takarmányába keverve adják be, akkor a tápértéket az anyag és a táplálék összetevőinek kölcsönhatása csökkentheti. Az ilyen kölcsönhatás lehetőségét a vizsgálat eredményeinek az értelmezésénél mérlegelni kell. Hagyományos laboratóriumi takarmányozás alkalmazható korlátozás nélküli ivóvízellátással. A takarmány megválasztását befolyásolhatja, hogy abba a vizsgálati anyagot megfelelően bele lehessen keverni, ha ezt ilyen formában adagolják.

A tápban olyan szennyezések, amelyekről ismert, hogy befolyásolják a toxicitást, nem lehetnek jelen zavaró koncentrációban.

E. Az állatok jóléte

A vizsgálati módszer kidolgozásánál az állatok közérzetére megfelelő figyelmet kell fordítani. Néhány példa alább röviden le van írva, de ez a lista nem részletes. A pontos megfogalmazást és/vagy körülményeket az egyes módszerek szövegében lehet megtalálni.

Az akut orális toxicitási vizsgálatok meghatározására két választható módszer áll rendelkezésre: a „Fix dózis módszer” és a „Akut toxicitási osztály módszer”. A „Fix dózis módszer” nem alkalmazza az elhullást, mint meghatározó végpontot, és kevesebb állatra van hozzá szükség. A „Akut toxicitási osztály módszer” átlagosan 70 százalékkal kevesebb állatot használ, mint a B.1 módszer szerinti Akut orális toxicitási vizsgálat. Mindkét választható módszer szenvedéssel és fájdalommal jár, mint a klasszikus eljárás.

Az alkalmazott állatok számát a tudományosan elfogadható legkevesebbre csökkentették: a B.1 és B.3 módszerben dózisszintenként csak 5 azonos nemű állatot vizsgálnak; a börszenzibilizáció meghatározására szolgáló tengerimalac maximizációs módszernél csak 10 állatot (és csak öt állatot a negatív kontroll csoportban) használnak, az in vivo mutagenitási vizsgálatokhoz szükséges pozitív kontroll állatok számát szintén csökkentették (B.11 és B.12 módszer).

Az állatok szenvedését és fájdalmát a vizsgálatok során a lehető legkisebbre kell csökkenteni: a súlyos és tartós szenvedés és fájdalom jeleit mutató állatoknál szükség lehet a humánus kiúrtásra; olyan vizsgálati anyag dózissal, amelyekről ismert, hogy maró és irritatív tulajdonságuk miatt jelentős szenvedést és fájdalmat okoznak, nem szükséges a vizsgálatot elvégezni (B.1, B.2 és B.3 módszer).

Az értelmetlenül nagy dózissal végzett vizsgálatot a határérték vizsgálati módszer alkalmazásával el kell kerülni, nemcsak az akut toxicitási vizsgálatoknál (B.1, B.2 és B.3 módszer), hanem az in vivo mutagenitási vizsgálatoknál is (B.11 és B.12 módszer).

Az irritáció vizsgálatára bevezetett stratégia ma már lehetővé teszi a vizsgálat elhagyását vagy egyetlen állat vizsgálatára való korlátozását, ha erre elegendő tudományos bizonyíték szerezhető be.

Ilyen tudományos bizonyítékok alapjául szolgálhatnak az anyag fizikai-kémiai tulajdonságai, más, már elvégzett vizsgálatok eredményei és megfelelően hitelesített in vitro vizsgálatok eredményei. Például, ha az akut dermális toxicitási vizsgálatnál a határérték vizsgálatban (B.3 módszer) alkalmazott dózis nem okozott bőrirritációt, a bőrirritáció további vizsgálata (B.4 módszer) szükségtelen lehet. Azoknál az anyagoknál, melyek egyértelműen maró hatásúak, vagy a bőrfelszívódási vizsgálatban erős bőrirritációt okoztak, nem kell további szemirritációs vizsgálatot (B.5 módszer) végezni.

F. Alternatív vizsgálatok

Az Európai Unió tudományos célja alternatív módszerek kifejlesztése és jóváhagyása, amelyek ugyanolyan szintű ismereteket nyújtanak, mint a jelenlegi állatkísérletek, azonban kevesebb állatot használnak, kevesebb szenvedést okoznak az állatoknak vagy teljesen kiküszöbölik az állatok használatát.

Amint az ilyen módszerek elérhetők, alkalmazásukat a veszély jellemzésénél, az azt követő osztályozásnál és a veszély jelölésénél, ahol ez lehetséges, meg kell fontolni.

G. Értékelés és értelmezés

A vizsgálatok értékelésekor és értelmezésekor figyelembe kell venni azt, hogy az állaton végzett és az *in vitro* vizsgálatok eredményeit milyen mértékben lehet közvetlenül kiterjeszteni az emberre, és ezért az embereken észlelt ártalmas hatások bizonyítékait, ahol vannak, fel lehet használni a vizsgálati eredmények megerősítésére.

Ezek az eredmények az emberek egészségi állapotára gyakorolt hatásokat tekintve felhasználhatók az új és a meglévő vegyi anyagok osztályba sorolására és jelölésére, az anyagoknak az ezekkel a módszerekkel azonosított és mennyiségileg jellemzett tulajdonságaira támaszkodva. A 44/2000. (XII. 27.) EüM rendelet 3. számú melléklete az osztályozásra és jelölésre vonatkozó megfelelő kritériumai vonatkoznak a vizsgálati jegyzőkönyvnek azokra a végpontjaira is, amelyeket ezek a vizsgálati módszerek tartalmaznak.

Ezeket az eredményeket az új és a meglévő vegyi anyagoknál a kockázat becslésére is fel lehet használni, az ezeknek a céloknak megfelelő vizsgálati terveket az idevonatkozó útmutatók tartalmazzák.

H. Irodalmi hivatkozások

Ezeknek a módszereknek a legtöbbjét a Vizsgálati Irányelvek elnevezésű OECD-program keretében fejlesztették ki, és azokat a Helyes Laboratóriumi Gyakorlat alapelveivel összhangban kell alkalmazni, annak érdekében, hogy a lehető legszélesebb körben biztosítsák az „adatok kölcsönös elfogadását”.

További tájékoztatás az OECD vizsgálati irányelveiben és az egyéb helyen kiadott idevonatkozó irodalomban található.

B.1. AKUT TOXICITÁS trisz (ORÁLIS) – AKUT TOXICITÁSI OSZTÁLY MÓDSZER

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Az akut toxicitási osztály módszer mind a veszély becsléséhez, mind a veszély osztályozásához tájékoztatást nyújt.

A módszer három rögzített dózist használ, megfelelően szétválasztva, annak érdekében, hogy az anyagot a vizsgálat eredményei alapján osztályozni lehessen. Az ebben a vizsgálati módszerben megadott eljárás emellett lehetőséget ad három további rögzített dózis kiválasztására, amelyeket vagy alternatív lehetőségként alkalmaznak az adott döntési helyzetekben, vagy választható lehetőséget adnak további vizsgálatra. (Bármely) további dózis használata megfontolás tárgya lehet, amikor a vizsgálat finomítása kívánatos vagy szükségessé válik.

A módszer meghatározott induló dózisokat használ, és nem célja, hogy az LD₅₀ pontos értékét meg lehessen adni, de lehetővé teszi annak a mérgezési tartománynak a meghatározását, amelyikben elhullás várható, mivel az állatok egy részénél ebben a vizsgálatban továbbra is a halál a fő végpont. A vizsgálat eredményei lehetőséget biztosítanak a 44/2000. (XII. 27.) EüM rendelet 3. sz. melléklet szerinti kritériumok alapján történő osztályozáshoz. A folyamat lépcsőzetes jellege miatt a vizsgálat időtartama hosszabb lehet, mint a B.1-ben leírt eljárásé. Ennek a módszernek a legnagyobb előnye, hogy kevesebb állatra van szükség, mint akár a heveny mérgezés (orális) (B.1) akár a rögzített dózissal történő adagolás módszerénél (B.1 bis).

Lásd továbbá a B. rész általános bevezetését.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd a B. rész általános bevezetését.

1.3. A vizsgálati módszer alapelve

Az anyagot szájon keresztül adják a megfelelő kísérleti csoportnak, a meghatározott dózisok egyike szerint. Az anyagot lépésenkénti eljárással vizsgálják, minden lépéshez három egynemű állatot használnak. Nem szükséges előzetes vizsgálatot végezni. A következő lépést az anyag hatására az adott lépésben alkalmazott adagolás következményeképpen bekövetkező elhullás, vagy annak hiánya határozza meg, azaz:

nincs szükség további vizsgálatra

a következő lépésben azonos dózisokat adnak ellentétes nemű állatoknak

a következő lépésben a következő nagyobb vagy kisebb dózisokat adják

1.4. A vizsgálati módszer leírása

1.4.1. Előkészületek

Véletlenszerűen kiválasztott egészséges fiatal felnőtt állatokat az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölnék, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartanak, hogy alkalmazkodjanak a laboratóriumi körülményekhez. Az állatokat el lehet helyezni csoportosan nemek és adagolás szerint, de az egy ketrecben tartott állatok száma nem akadályozhatja az egyes állatok külön-külön történő megfigyelését.

A vizsgálati anyagot gyomorszondával vagy egy alkalmas kanüllel egyszeri dózisban kell az állatoknak beadni.

Ha szükséges, akkor a vizsgálati anyagot valamely alkalmas vivőszerben feloldják vagy szuszpendálják. Javasolt, hogy ha lehetséges, akkor először vizes oldat/szuszpenzió használatát mérlegeljék, ezt követően vegyék fontolóra olajos (pl. magvakból sajtolt olajjal készült) oldat/emulzió használatát, és csak ezután keressenek egyéb vivőszeres megoldást. Nem-vizes vivőszerknél a vivőszer mérgező jellegét ismerni kell, vagy ha az nem ismert, akkor azt a vizsgálat előtt meg kell határozni.

Az állatokat a kezelést megelőzően éhezteni kell (pl. patkányokat egész éjszakán át, egereket 3-4 órán át); a vizet nem szabad megvonni.

1.4.2. Vizsgálati körülmények

1.4.2.1. Vizsgálati állatok

Ellenjavaslat hiányában a patkány az előnyben részesített rágcsálófaj. A nőstényeknél egyszer sem szült és nem vemhes állat a követelmény.

A vizsgálat kezdetekor, az állatok testtömegének szórása legyen a lehető legkisebb, és az egyes nemeknél az átlagos testtömegtől való eltérés ne haladja meg a 20 százalékot.

1.4.2.2. Az állatok száma és neme

Minden lépésben három azonos nemű állatot kell használni. Az első lépésben bármilyen nemű állatok vizsgálhatók.

1.4.2.3. Dózisszintek

A kezdő dózist a következő három rögzített dózisszint közül választják ki: 25, 200 és 2000 mg/testtömeg kg. Kezdő dózisszintnek azt a szintet választják, amelyik legalább a kezelt állatok egy részénél a legnagyobb valószínűséggel halált okoz. A kezdő adagtól függően az 1. mellékletben megadott valamelyik eljárás folyamatábrája alkalmazható.

A kezdő dózis és a nem kiválasztásához minden elérhető információt figyelembe kell venni, beleértve a szerkezet-hatás összefüggésről rendelkezésre álló ismereteket. Ha az ismeretek alapján az elhullás a legnagyobb dózisszinten (2000 mg/testtömeg kg) is valószínűtlen, akkor határérték vizsgálatot kell végezni. Ha a vizsgálati anyagról nem állnak rendelkezésre ismeretek, akkor az állatok jóléte érdekében ajánlatos 200 mg/testtömeg kg kezdő dózist használni.

Egyes esetekben kívánatos lehet a három rögzített dózis (25, 200, 2000 mg/testtömeg kg) segítségével kapott ismeretek további finomítása. Ezekben az esetekben további vizsgálatok végzését három további rögzített dózisszinten (5-50-500 mg/testtömeg kg) mérlegelni lehet.

Olyan dózisoskat, amelyek ismert maró vagy erősen irritatív tulajdonságuk miatt jelentős szenvedést és fájdalmat okoznak, nem szükséges beadni.

A csoportok kezelése közötti időt a toxikus tünetek kialakulása, időtartama és súlyossága határozza meg. Az ellentétes nemű állatok kezelését, vagy a következő dózisszint alkalmazását addig késleltetik, amíg az előző kezelés utáni túlélési arányt megbízhatóan meg nem állapították.

1.4.2.4. Határérték vizsgálat (limit teszt)

2000 mg/testtömeg kg dózisszinten határérték vizsgálatot lehet végezni három állaton, mindkét nemben. Ha az anyag elhullást okoz, akkor 200 mg/testtömeg kg (vagy 500 mg/testtömeg kg) dózissal további vizsgálatot lehet végezni.

1.4.2.5. Megfigyelési idő

Az állatokat rendszerint 14 napig kell figyelni, kivéve, ha az állatokat kivonják a vizsgálatból, és az állatok jólétének érdekében humánusan kiírtják őket, vagy az állat elpusztul. Mindazonáltal, a megfigyelés időtartama nincsen mereven rögzítve, azt a toxikus tünetek, kialakulásuk időpontja és a felépüléshez szükséges idő határozza meg, így szükség esetén meg lehet hosszabbítani. Azok az időpontok, amikor a toxikus tünetek kialakulnak és megszűnnek, nagyon fontosak, különösen, ha a késői toxikus hatás is megállapítható. Minden megfigyelést módszeresen fel kell jegyezni és minden állatról külön feljegyzést kell készíteni.

1.4.3. Eljárás

Az állatok testtömegét éheztetés után, de a vizsgálati anyag beadása előtt, meg kell mérni. A vizsgálati anyag beadása után a táplálékot további 3-4 órára meg lehet vonni. Ha a dózist adott időtartamon belül részletekben adják be, szükség lehet arra, hogy az állatoknak, a beadás időtartamától függően, táplálékot és vizet adjanak.

Az egyszerre beadható folyadék legnagyobb térfogata függ a vizsgálati állat méretétől. Rágcsálóknál a beadott folyadék térfogata általában ne haladja meg az 1 ml/100 testtömeg g értéket; vizes oldatoknál azonban a 2 ml/100 testtömeg g mennyiség beadását is mérlegelni lehet. A vizsgálati anyag térfogatának a változását minden dózisszintnél az állandó térfogatra számított koncentráció beállításával kell a lehető legkisebb mértékben csökkenteni. Ha a dózist egyszerre nem lehet beadni, akkor azt 24 órán belül kisebb, részekre osztva kell megtenni.

A vizsgálati eljárás részletei az 1. mellékletben találhatók.

1.4.3.1. Általános megfigyelések

A kezelés napján legalább kétszer, vagy ha az állatoknál a kezelés hatására kialakuló tünetek ezt indokolják, még gyakrabban, és később naponta legalább egyszer gondosan meg kell figyelni az állatokat. A moribund vagy súlyos és tartós szenvedés és fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon ki kell írtani. Azokat az állatokat, amelyeket humánus megfontolásokból kiírtottak, ugyanolyan módon veszik figyelembe, mint azokat, amelyek a vizsgálat alatt hullottak el.

Azoknál az állatoknál, amelyeket emberieségből kiírtottak, illetve amelyek elpusztultak, az elhullás időpontját, amennyire pontosan csak lehet, fel kell jegyezni. További megfigyelés szükséges, ha az állatokon továbbra is megvannak a toxikus tünetek. A megfigyeléseknek tartalmazni kell a bőrön, a szőrözen, a szemeken és a nyálkahártyán észlelhető elváltozásokat, továbbá a légzési, a keringési, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, a szomatomotoros aktivitás és a viselkedés megfigyelését. A megfigyeléseknek ki kell terjedniük az esetlegesen kialakuló remegés, görcs, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és eszméletlenség megfigyelésére is.

Minden megfigyelésről és minden állatról külön feljegyzést kell készíteni.

1.4.3.2. Testtömeg

A vizsgálati anyag beadása előtt és a vizsgálat alatt legalább hetente egyszer minden állatot meg kell mérni. A testtömeg változását rögzíteni kell. A vizsgálat végén a túlélő állatokat meg kell mérni, mielőtt azokat humánus módon kiírtják.

1.4.3.3. Kórboncolás

Közvetlenül a vizsgálati anyag beadása előtt és azután legalább hetente egyszer minden állatot meg kell mérni. Minden állatnál fel kell jegyezni a makroszkópos elváltozásokat. A kóros elváltozást mutató szervek mikroszkópos vizsgálatát is érdemes megfontolni a 24 vagy több órát túlélő állatoknál, mivel az hasznos ismeretekkel szolgálhat.

2. ADATOK

Az adatokat minden állatra külön kell megadni. Emellett minden adatot táblázatos formában kell összesíteni, amely minden vizsgálati csoportnál tartalmazza az állatok számát, a toxikus tüneteket mutató állatok számát, a vizsgálat során elpusztult vagy a humánus okokból kiírtott állatok számát, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások és a reverzibilitás leírását és időbeni lefolyását, valamint a boncolási leleteket.

Az eredmények osztályozási célból történő értelmezéséhez a 2. mellékletben általános iránymutatás található.

3. JELENTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek – amennyiben lehetséges – a következő információkat kell tartalmazni:

Vizsgálati állatok

faj/törzs;

az állatok mikrobiológiai állapota (amennyiben ismert);

az állatok száma, kora és neme;

származás, tartási körülmények, takarmányozás, stb.;

az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor, majd hetente és a vizsgálat végén.

Vizsgálati körülmények

a vivőszer indoklása, ha az nem víz;

a vizsgálati anyag beadásának részletei, beleértve a dózis térfogatát és beadásának időpontját;

takarmány és a víz minőségének részletei (beleértve a típus/forrás, vízforrás);

a kezdő dózis kiválasztásának indoklása.

Eredmények

az adatok táblázatos összefoglalása nem és dózisszint szerint, minden állatra (azaz, a toxikus tüneteket mutató állatok, beleértve az elhullást, valamint a hatások jellegét, súlyosságát és időtartamát);

a toxikus tünetek megjelenésének időpontja és a reverzibilitásra vonatkozó adatok az egyes állatokon;

boncolási leletek és bármilyen kórszövetani elváltozás az egyes állatokon, ha tapasztalható.

Az eredmények megvitatása

Következtetések

4. HIVATKOZÁSOK

Ez a módszer azonos az OECD TG 423-mal.

*1. Melléklet**Vizsgálati eljárás*

1. Az 1.4.2.3. pontban foglaltak szerint kezdő dózist az kell választani, amelyiknél a legvalószínűbb az elhullás bekövetkezése, legalább az állatok egy részénél. A kezdő dózis kiválasztásához felhasználható ismeretek a következők:

fizikai-kémiai tulajdonságokra vonatkozó adatok;

szerkezet-hatás összefüggések;

minden adat más toxicitási vizsgálatokból; és

a vizsgálati anyag várható felhasználása.

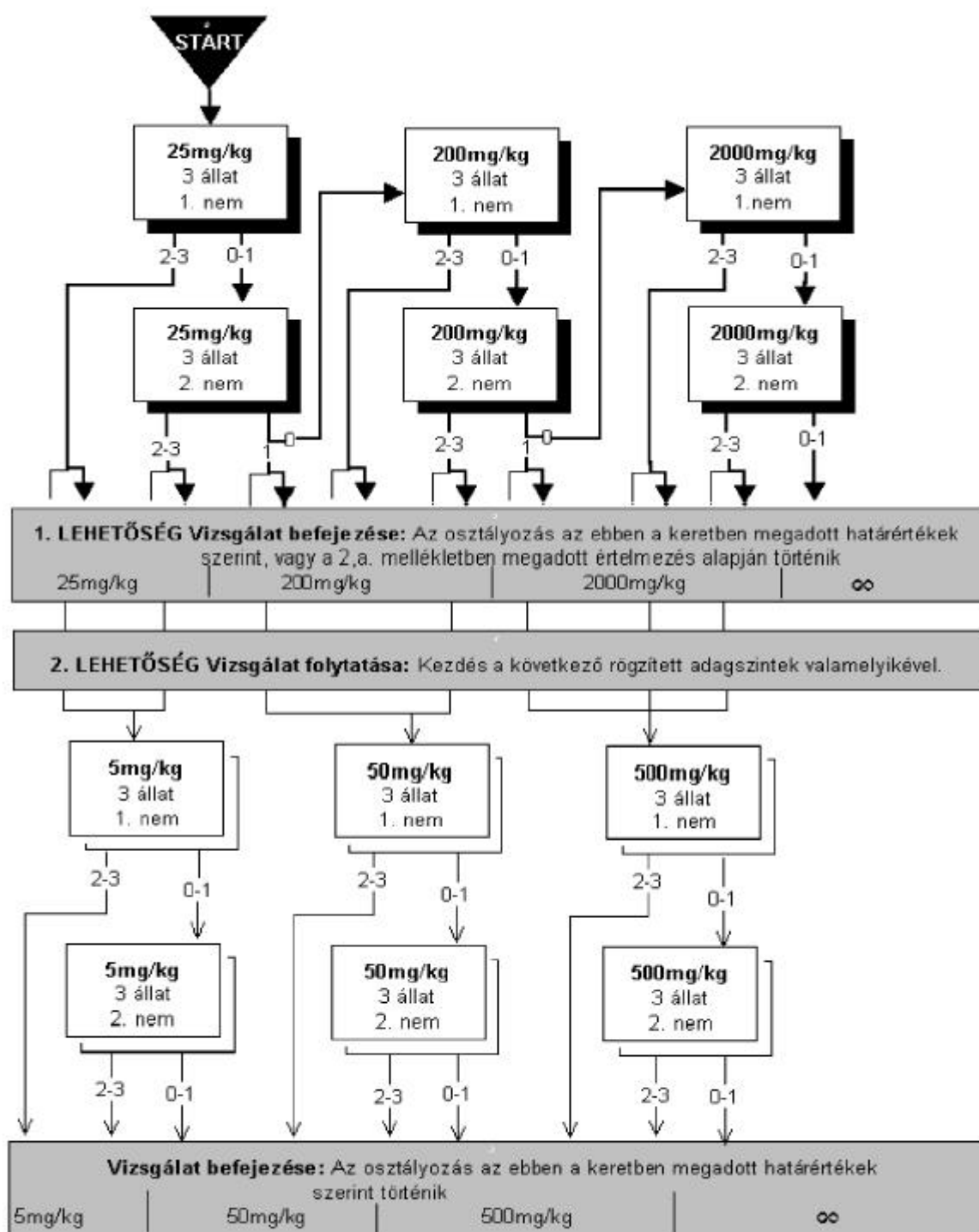
2. Amint az ebben a mellékletben meg van adva, a követendő eljárást minden kezdő dózisonál a megfelelő vizsgálati terv szemlélteti. A humánus módon kiírtott vagy elpusztult állatok számától függően a vizsgálati eljárás a megfelelő nyilak mentén halad tovább.

3. Ha 25 mg/testtömeg kg vagy 200 mg/testtömeg kg dózistól a második vizsgált nem állatai közül csak egy állat pusztul el, akkor ez rendszerint a vizsgálat befejezését jelenti. Ha azonban nem mutatkoztak mérgezési (toxikus) tünetek a másik öt állaton, a boncolás során mérlegelni kell azt, hogy az elhullást esetleg nem a vizsgálati anyag okozta. Ilyen esetben a vizsgálatot a következő nagyobb dózisszinten kell folytatni.

4. Ha 2000 mg/testtömeg kg dózis mellett nemként egy állat pusztul el, akkor az LD₅₀ értéke várhatóan nagyobb, mint 2000 mg/testtömeg kg. Mindazonáltal, mivel ez határeseti eredmény, a nemként megmaradt két állat tüneteit gondosan tanulmányozni kell, és az ezeken az állatokon észlelt különálló, feltűnő mérgezési tünetek alapján az anyagot könnyen a 2000 mg/testtömeg kg vagy az annál kisebb LD₅₀-hez tartozó osztályba lehet sorolni. Esetleg további, ugyanezen a szinten végzett vizsgálatra lehet szükség.

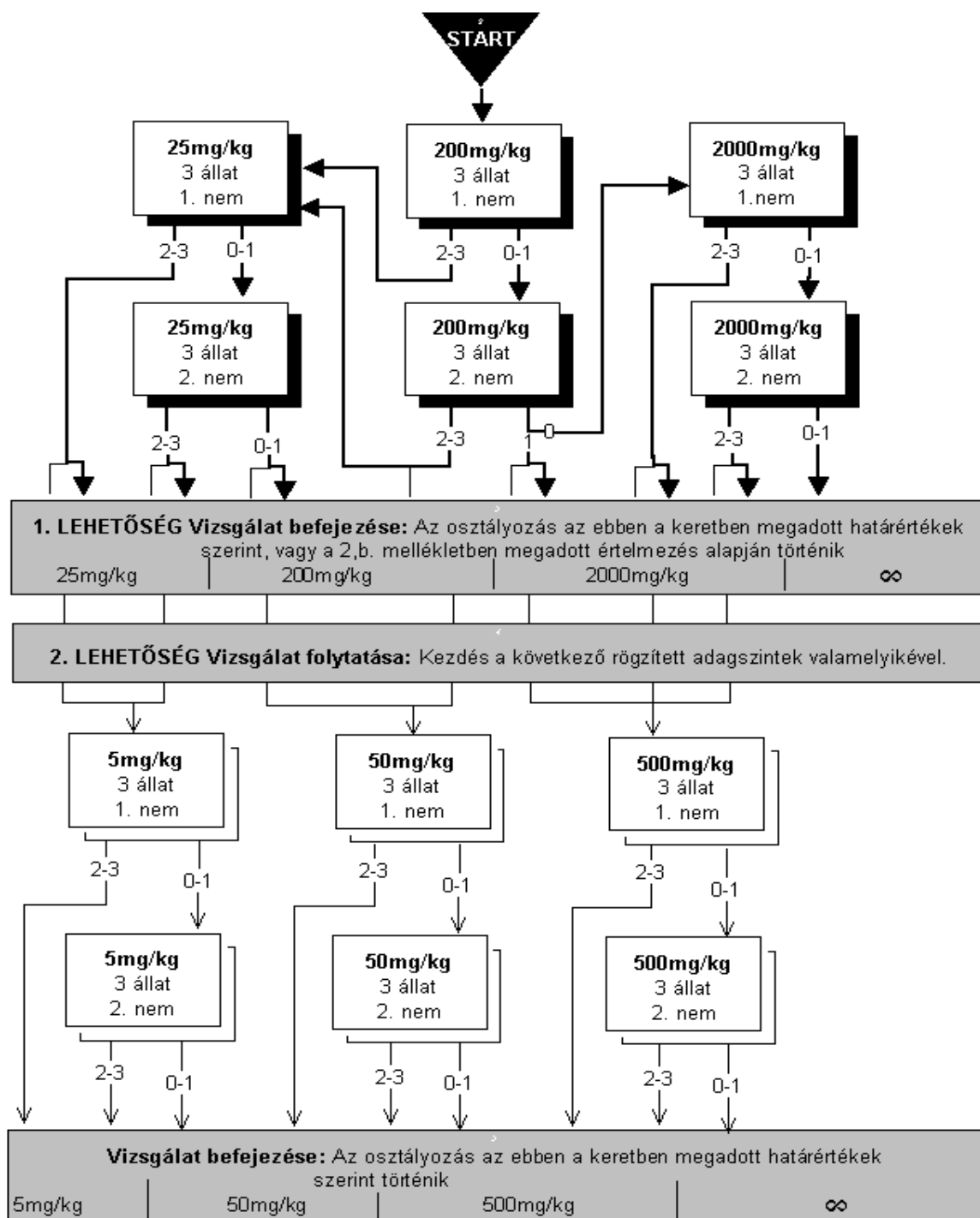
5. Az eljárás lehetővé teszi, hogy a vizsgálatokhoz további három rögzített dózist használjanak (2. választható lehetőség). Ezt a választási lehetőséget fel lehet használni az alternatív dózis megválasztásához az adott döntési helyzetben, vagy további vizsgálatokhoz az éppen folyó vizsgálat befejezése után (1. választható lehetőség). Az 1. választható lehetőség szerinti vizsgálati eljárást vastag nyilak jelzik, míg a 2. választható lehetőség szerinti vizsgálati eljárás jelölésére vékony nyilakat használtak.

a) Vizsgálati eljárás 25 mg/testtömeg kg kezdő dózissnál



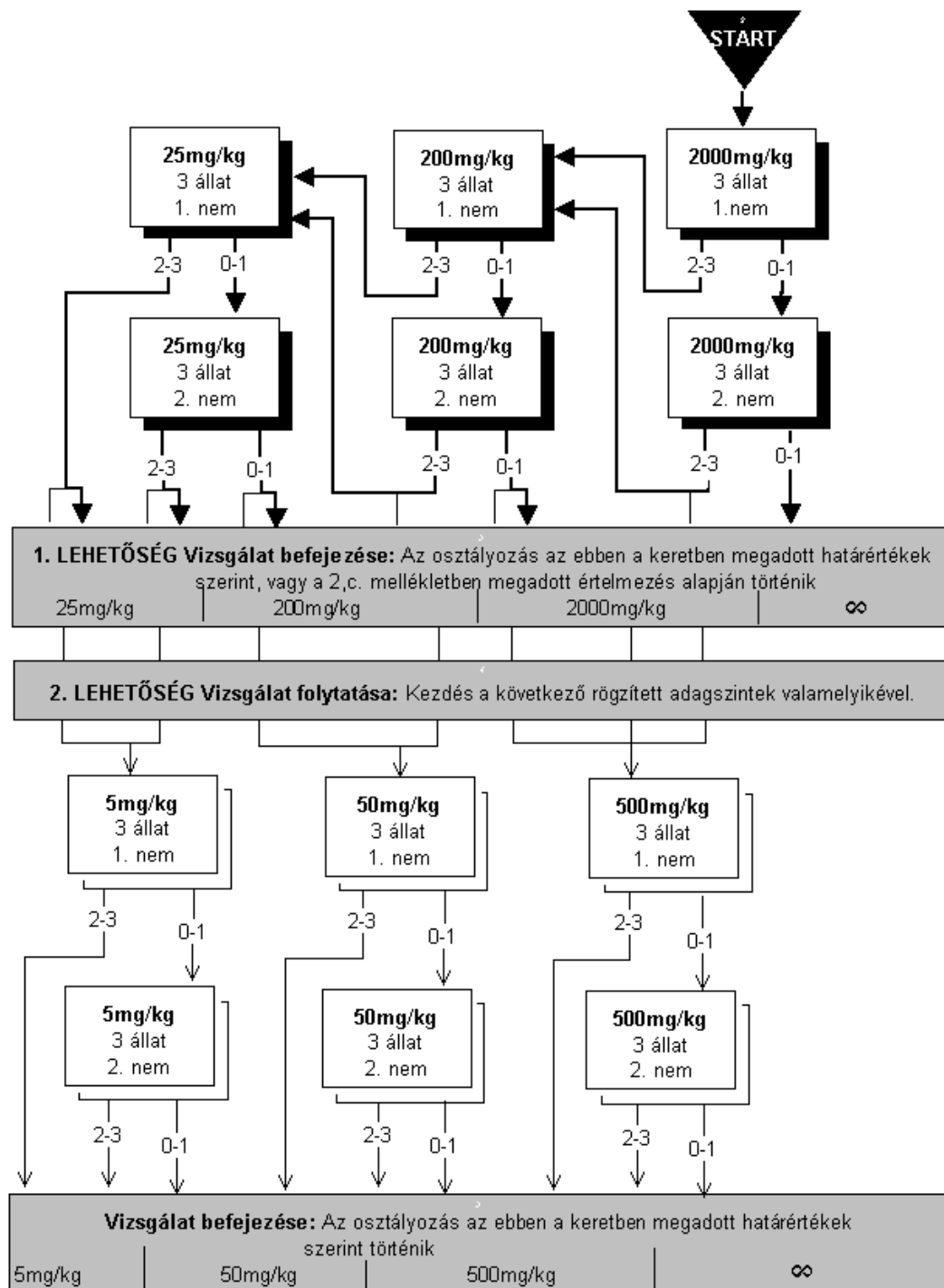
Jelmagyarázat: 0,1,2,3 a haldokló vagy elpusztult állatok száma nemenként.

b) Vizsgálati eljárás 200 mg/testtömeg kg kezdő dózissal



Jelmagyarázat: 0,1,2,3 a haldokló vagy elpusztult állatok száma nemenként.

c) Vizsgálati eljárás 2000 mg/testtömeg kg kezdő dózissnál



Jelmagyarázat: 0,1,2,3 a haldokló vagy elpusztult állatok száma nemenként.

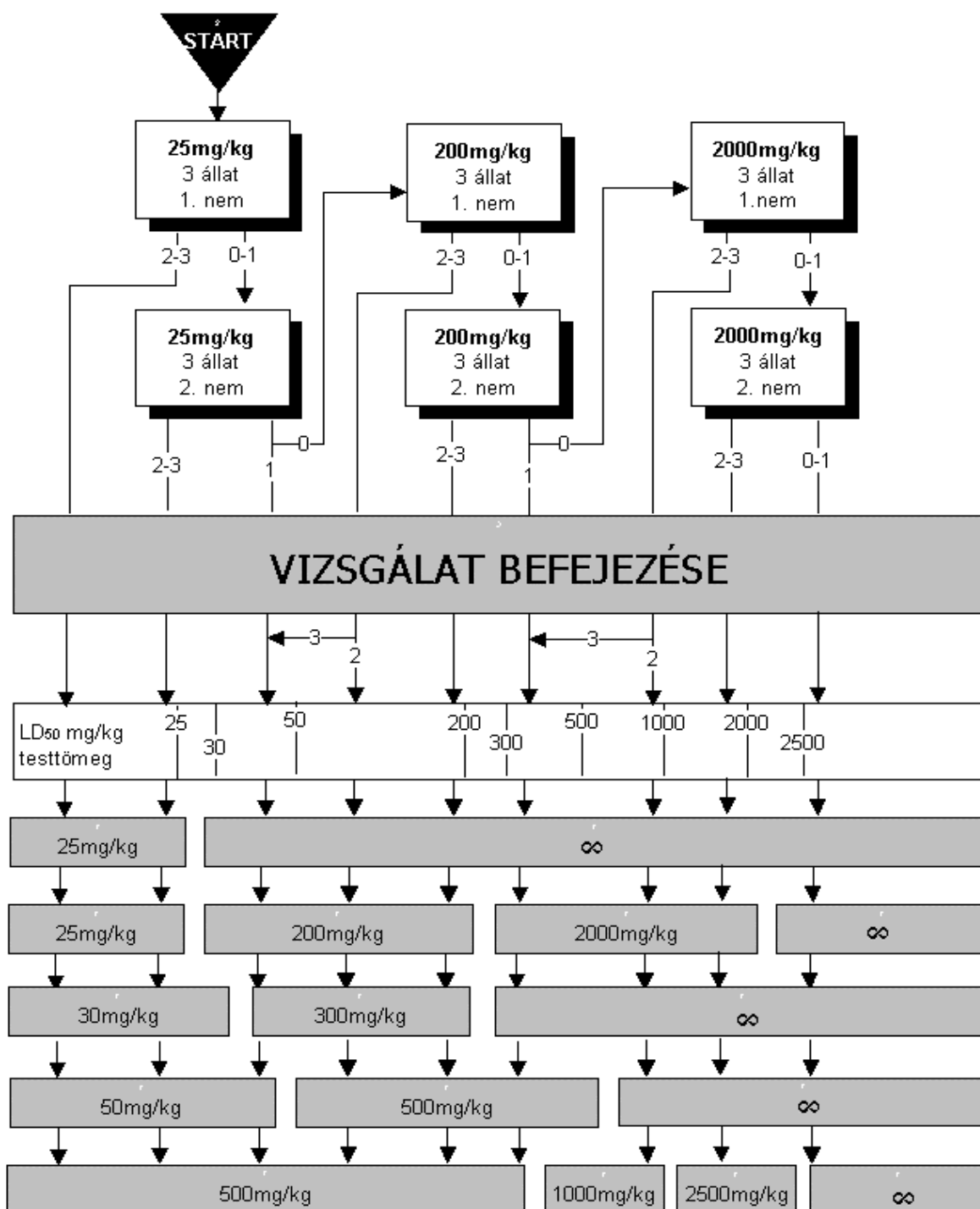
2. Melléklet

Az 1. Választható lehetőség szerinti vizsgálat eredményeinek értékelése

Az ebben a mellékletben szereplő „vizsgálat befejezése” keret alatti szürkén kitöltött keretek mutatják meg az osztályozáshoz szükséges határértékeket. Az 1. választható lehetőség szerinti vizsgálati eljárást követve a megfelelő nyilat kell követni lefelé, amíg az eléri a megfelelő szürkével kitöltött keretet.

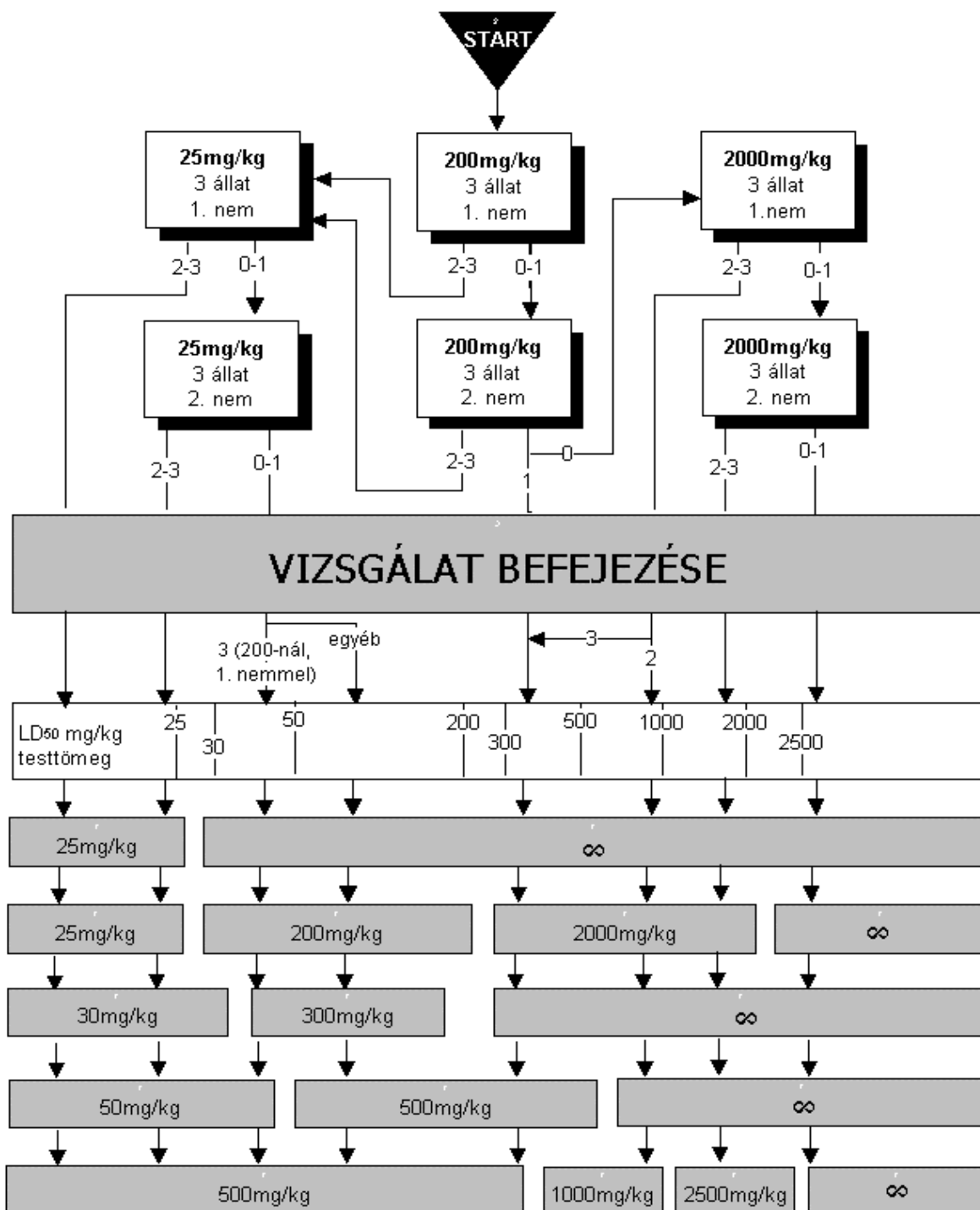
a) Az 1. választható lehetőség szerinti vizsgálat eredményeinek értékelése

Kezdő dózis: 25 mg/testtömeg kg



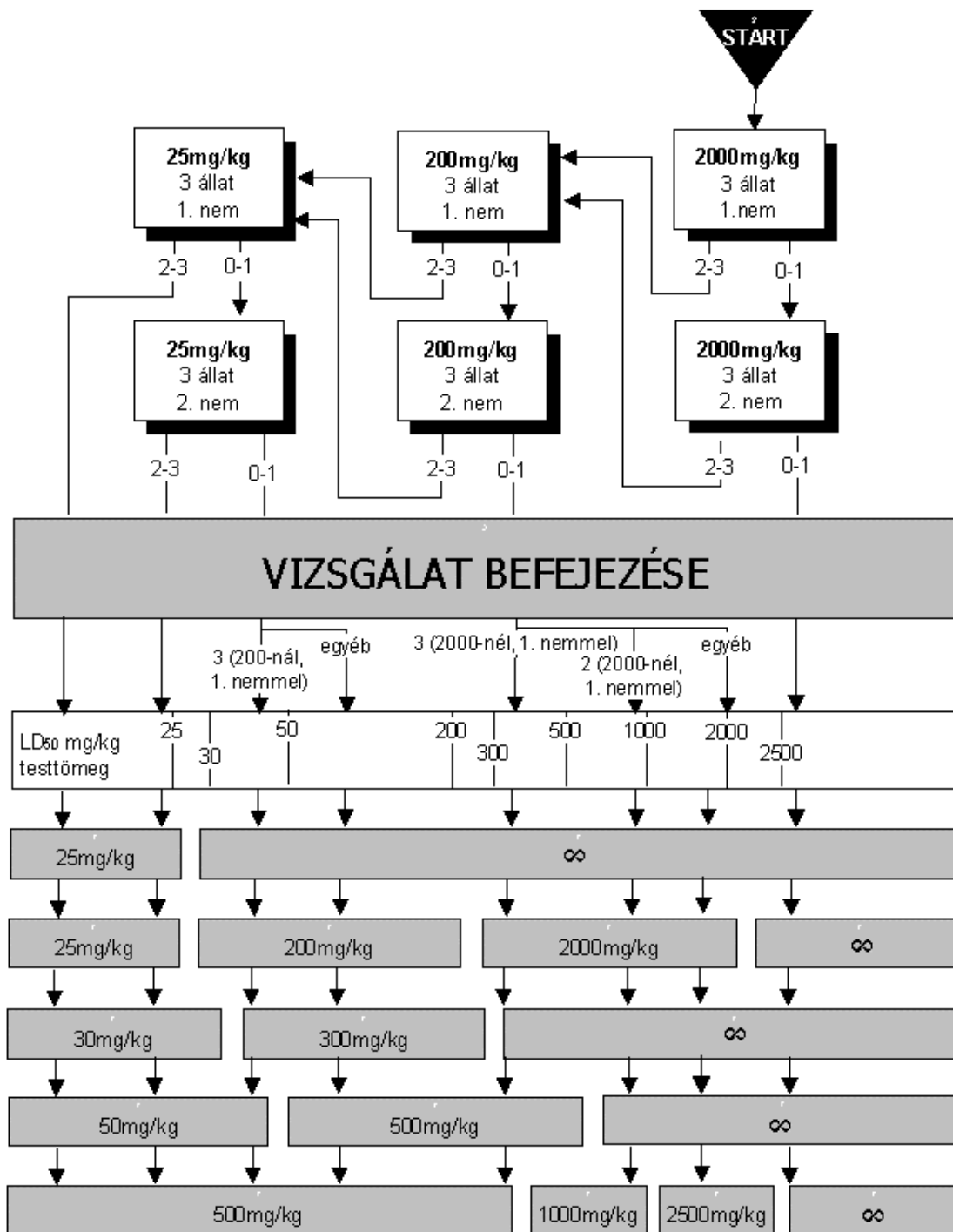
Jelmagyarázat: 0,1,2,3 a haldokló vagy elpusztult állatok száma nemenként.

b) Az 1. választható lehetőség szerinti vizsgálat eredményeinek értékelése
 Kezdő dózis: 200 mg/testtömeg kg



Jelmagyarázat: 0,1,2,3 a haldokló vagy elpusztult állatok száma nemenként.

c) Az 1. választható lehetőség szerinti vizsgálat eredményeinek értékelése
 Kezdő dózis: 2000 mg/teststőmeg kg



Jelmagyarázat: 0,1,2,3 a haldokló vagy elpusztult állatok száma nemenként.

B.1. AKUT TOXICITÁS bis (ORÁLIS) – FIX DÓZIS MÓDSZER**1. MÓDSZER****1.1. Bevezetés**

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (A).

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (B).

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Az akut orális toxicitás vizsgálat azokról a káros hatásokról nyújt információt, amelyek a vizsgált anyag egyszeri dózisának bejuttatását követően, rövid időn belül jelentkezhetnek.

A fix dózis módszer két vizsgálati fázisból áll.

Az előzetes tájékoztató vizsgálatban az azonos nemű állatoknak orálisan, gyomorszondán keresztül beadott különböző dózisok – egy adott dózist csak egy állatnál alkalmazva – hatásait szekvenciális formában vizsgálják. A tájékoztató vizsgálatból információ nyerhető a dózis-toxicitás összefüggésre, beleértve a minimális halálos dózis becslését. Az első fázisban felhasznált állatok száma szokásos esetben nem haladja meg az ötöt.

A vizsgálat fő fázisában a vizsgált anyagot az előre megállapított dóziszintek (5, 50, 500 vagy 2000 mg/kg) valamelyikében adják be orálisan gyomorszondán keresztül az öt hím és öt nőstény állatból álló csoportoknak. A dózist az előzetes tájékoztató vizsgálat eredménye alapján kell meghatározni oly módon, hogy az valószínűsíthetően „nyilvánvaló (evidens) toxicitást” (lásd az 1.2. pontot: Fogalommeghatározások) okozzon, de elhullást ne.

Az anyag beadását követően a hatásokat meg kell figyelni.

Ha az elsőnek kiválasztott dóziszint nyilvánvaló toxicitást okoz, de anyag okozta elhullást nem, nincs szükség további vizsgálatra.

Amennyiben az adott dóziszint mellett nem figyelhető meg nyilvánvaló toxicitás, úgy az anyag vizsgálatát meg kell ismételni a következő (eggyel magasabb) dóziszinten. Amennyiben elhullás előfordul, vagy a súlyos toxikus reakció miatt szükségessé válik egy vagy több állat humánus módon történő kiirtása, úgy az anyag vizsgálatát az eggyel alacsonyabb dóziszinten meg kell ismételni.

Ez az eljárás lehetővé teszi a „megkülönböztető dózis” (lásd az 1.2. pontot: Fogalommeghatározások) – azaz az előre meghatározott dóziszintek közül az a legmagasabb szint, amelynek beadása nem okoz elhullást (ideértve az állatok humánus elpusztítását) – meghatározását.

Azoknál az állatoknál, amelyeknél súlyos és tartós szenvedés, illetve fájdalom jelei figyelhetők meg, szükségessé válhat a humánus módon történő kiirtás. A maró vagy irritációt okozó anyagot nem szabad úgy alkalmazni, hogy a fokozott fájdalmat, illetve szenvedést okozzon.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása**1.6.1. Előkészületek****1.6.1.1. Kísérleti állatok**

Ellenjavallat hiányában patkány a javasolt állatfaj. Általánosan használt laboratóriumi törzseket kell használni. A vizsgálat megkezdésekor a felhasznált állatok testtömege nemenként maximum $\pm 20\%$ -kal térhet el az átlagértéktől. Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a kísérlet tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. A vizsgálat megkezdése előtt az egészséges fiatal felnőtt állatokat véletlenszerűen kiválasztva az előzetes tájékoztató vizsgálatához és a fő vizsgálatához csoportokba soroljuk. A gyakorlatban a fő vizsgálatához mindkét nemből csupán egy-egy csoport szükséges.

1.6.1.2. Dózis előkészítés és adagolás

Ahol szükséges, a vizsgált anyagot megfelelő vivőszemben kell oldani vagy szuszpendálni. Javasolt, hogy ha lehetséges először vizes oldat/szuszenzió használatát mérlegeljék, ezt követően vegyék fontolóra növényolaj használatát és csak ezt követően keressenek egyéb vivőszert. Nem-vizes vivőszereknél a vivőszer lényeges toxikus tulajdonságainak ismertnek kell lenniük, vagy azokat a vizsgálat előtt vagy során kell meghatározni. Rágcsálóknál a térfogat szokásos esetben ne legyen több 10 ml/testtömeg kg-nál, kivéve vizes oldatoknál, amikor 20 ml/testtömeg kg is beadható. Törekedni kell arra, hogy a térfogat valamennyi dóziszintnél azonos legyen, az eltérést a koncentráció változásával kell minimálisra szorítani. A vizsgálati anyag beadását megelőzően az állatokat éheztetni kell. Patkánynál ez egy éjszakán át tartson; az állatok vízzel való ellátását nem kell korlátozni. A következő napon az állatok testtömegét

meg kell mérni, majd a vizsgálati anyagot ezt követően kell egyszeri dózisban beadni, gyomorszondán keresztül. Amennyiben az egyszeri beadás nem lehetséges, úgy a dózis beadható több kisebb részletben, 24 óránál nem hosszabb időszakokra elosztva. A takarmány megvonása az anyag beadását követően további három-négy órán keresztül fenntartható. Amennyiben a dózist több kisebb részletben, egy időszakra elosztva kell beadni, az időszak hosszától függően előfordulhat, hogy az állatokat takarmánnyal és vízzel kell ellátni.

1.6.2. Eljárás

1.6.2.1. Előzetes tájékoztató vizsgálat

E vizsgálat során különböző dózisok hatásait vizsgáljuk egy-egy állaton. Általában nőstény állatokat kell használni, amennyiben nem állnak rendelkezésre adatok arról, hogy a hímek érzékenyebbek az adott anyaggal szemben. Az adagolás szekvenciálisan történik, legalább 24 óra szünetet tartva mielőtt a következő állatnak beadjuk az anyagot. A toxicitás tüneteit valamennyi állaton alaposan meg kell figyelni, legalább hét napon keresztül; ha egy állaton a hetedik napon is mérsékelt toxikus tünetek észlelhetők, akkor a megfigyelést további hét napon keresztül folytatni kell. A következő kezdeti dózisszintek jöhetnek szóba: 5, 50, 500 és 2000 mg/kg. Amennyiben az először kiválasztott dózisszint nem okoz súlyos mérgezést, a következő (eggyel magasabb) szint viszont már elhullást okoz, úgy egy vagy több megfelelően megválasztott közbülső dózisszintre is szükség lehet. Ez az eljárás lehetővé teszi adatok gyűjtését arról, hogy milyen dózisszintek okoznak toxikus tüneteket (és milyen súlyosakat), illetve melyik az a legalacsonyabb dózisszint, amely már elhullást okoz. A kezdő dózisszint megválasztásánál törekedni kell a vizsgált anyaggal rokon vegyi anyagokról rendelkezésre álló adatok figyelembevételére. Ilyen adatok hiányában az 500 mg/kg-os kezdeti dózisszint javasolt. Amennyiben a kezdő dózisszintnél toxicitásra utaló tünetek nem észlelhetők, úgy az anyag vizsgálatát a következő (eggyel magasabb) dózisszinten meg kell ismételni. Ha a 2000 mg/kg-os dózisszinten nincs elhullás, akkor az előzetes tájékoztató vizsgálat lezártnak tekintendő, és a fő vizsgálatot ezen a dózisszinten kell végezni. Amennyiben a kezdő dózis (pl. 500 mg/kg) olyan súlyos tüneteket okoz, amelyek szükségessé teszik az állat humánus módon történő kiirtását, úgy a következő állatnak ezt követően az egy szinttel kisebb dózist (pl. 50 mg/kg) kell beadni. Ha ez az állat nem pusztul el, további állatoknak megfelelően megválasztott közbülső (a fent említett rögzített dózisszintek közé eső) dózisok adhatók be. Ehhez az eljáráshoz szokásos esetben ötnél több állat várhatóan nem szükséges.

1.6.2.2. Fő vizsgálati fázis

Valamennyi dózisszint vizsgálatához legalább 10 állat (öt hím és öt nőstény) szükséges. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni.

A fix dózis eljárás egyik alapelve, hogy a vizsgálat fő fázisa során csak közepesen toxikus dózisokat használunk. A halálos dózist nem szabad beadni.

A vizsgálat során alkalmazott dózisszintet a már említett négy előre rögzített dózis – 5, 50, 500 és 2000 mg/testtömeg kg – közül kell kiválasztani. A kezdeti dózisszintet úgy kell megválasztani, hogy az valószínűsíthetően nyilvánvaló toxicitást okozzon, de anyag okozta elhullást ne (ide sorolva a humánus módon kiírtott állatokat is; a véletlen elhullásokat nem soroljuk ide, de ezeket is fel kell jegyezni). Amennyiben a kezdeti dózis nyilvánvaló toxicitást okoz, de anyag okozta elhullást nem, úgy nincs szükség további vizsgálatra. Amennyiben a kiválasztott dózisszinten nem figyelhető meg nyilvánvaló toxicitás, úgy az anyag vizsgálatát meg kell ismételni a következő (eggyel magasabb) dózisszinten. Az állatokat azonban a megfigyelési időszak végéig megfigyelés alatt kell tartani. Amennyiben súlyos mérgezés miatt egy vagy több állat humánus módon történő kiirtása szükségessé válik, vagy elhullás előfordul, úgy az anyag vizsgálatát egyvel alacsonyabb dózisszinten meg kell ismételni. Az életben maradt, és humánus kiirtást nem igénylő állatokat a teljes megfigyelési időszak végéig megfigyelés alatt kell tartani.

Az anyag beadását követően módszeres megfigyeléseket kell végezni és ezeket fel kell jegyezni; minden egyes állatról külön feljegyzést kell készíteni.

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. A megfigyelési időszakot azonban nem célszerű mereven kezelni; meghatározásakor figyelembe kell venni a toxikus reakciókat, kialakulásuk sebességét, valamint a regenerálódási időszak hosszát. Szükség esetén tehát a megfigyelési időszak meghosszabbítható. A toxicitás tüneteinek jelentkezésének és megszűnésének időpontja, valamint az elhullások időpontja lényegesek, különösen, ha a toxikus tünetek tendenciaszerűen késleltetve jelentkeznek.

Az anyag beadásának napján legalább két alkalommal, ezt követően pedig legalább naponta egyszer alapos klinikai vizsgálatot kell végezni. A nyilvánvaló fájdalom vagy súlyos szenvedés jeleit mutató állatokat humánus módon ki kell irtani. További külön megfigyelésre van szükség az anyag beadását követő első néhány napon, amennyiben az állatokon továbbra is mutatkoznak a toxicitás jelei. A vizsgálat megszakítható, ha nyilvánvalóvá válik, hogy a kiválasztott kezdő dózisszint túl magas volt.

A megfigyeléseknek ki kell terjedniük a bőr, a szőrzet, a szemek és nyálkahártyák elváltozásaira, továbbá a légző-, a keringési, az autonóm és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomato-motoros aktivitás és az állatok

viselkedésének változásaira. Külön figyelmet kell fordítani a remegés, görcsök, nyáladás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megjelenésére.

Az állatok testtömegét rövidebbel a vizsgálati anyag beadása előtt, majd a következő három napon át naponta, ezt követően pedig hetente meg kell mérni. A vizsgálat során elpusztult állatok, valamint a vizsgálat lezárásakor még életben lévő állatok testtömegét egyaránt meg kell mérni és az állatokat fel kell boncolni. Valamennyi patológiás elváltozást rögzíteni kell. Indokolt esetben a szöveteken kórszövettani vizsgálatot kell végezni.

Előfordulhat, hogy – az előző dózisszinten kapott eredményektől függően – második, sőt, kivételes körülmények között harmadik dózisszinten is el kell végezni a vizsgálatot.

Amennyiben az adott anyag 5 mg/kg testtömeg dózisszinten elhullást okoz (vagy a tájékozódó vizsgálat eredménye arra utal, hogy ezen a dózisszinten elhullást fog okozni), az adott anyag akut toxicitásának a meghatározására további vizsgálatra lehet szükség.

2. ADATOK

Az előzetes tájékozódó vizsgálatból és a fő vizsgálatból származó adatokat egyaránt táblázatos formában kell összesíteni, minden egyes alkalmazott dózisszintnél feltüntetve az állatok számát a vizsgálat megkezdésekor; a toxicitás jeleit mutató állatok számát; a vizsgálat során elpusztult vagy humánus módon kiírtott állatok számát; a toxikus hatások leírását, illetve a fő vizsgálati fázisnál azt, hogy volt-e az anyagnak nyilvánvaló toxicitást okozó hatása; a toxikus hatások időbeli lefolyását; valamint a boncolási eredményeket. A testtömeg változásokat ki kell számolni és fel kell jegyezni, amennyiben a túlélési idő több volt, mint egy nap.

Az anyag okozta fájdalom és szenvedés megszüntetése érdekében humánus módon kiírtott állatokat az anyag okozta elhullásokhoz kell sorolni.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jelentésnek – mind az előzetes tájékozódó vizsgálatról, mind a fő vizsgálatról – az alábbi adatokat kell tartalmazni:

- faj, törzs, származás (forrás), környezeti körülmények, takarmányozás, stb.;
- vizsgálati körülmények;
- dózisszintek (az esetlegesen használt vivőanyag megnevezésével, és a koncentráció feltüntetésével);
- teljes körű eredményközlés valamennyi alkalmazott dózisszintnél;
- a kezelés hatásának táblázatos összefoglalás az állatok nemének és a dózisszintek feltüntetésével [tehát a felhasznált állatok száma; testtömeg változások; a vizsgálat során elpusztult vagy kiírtott állatok száma (ha voltak); a toxicitás jeleit mutató állatok száma; a hatások jellege, súlyossága, és időtartama];
- a mérgezés időbeli lefolyása és ezek visszafordíthatósága (reverzibilitás);
- állatok elhullásának, illetve kiírtásának időpontjai az anyag beadását követően, az állatok humánus módon történő kiírtásának okai és az alkalmazott kritériumok;
- boncolási leletek;
- kórszövettani leletek (amennyiben vannak);
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése, ideértve a nyilvánvaló toxicitás jeleit, valamint a vizsgálat során meghatározott megkülönböztető dózisszintet.

3.2. Értékelés és értelmezés

Dózis	Eredmények	Értelmezés
5 mg/testtömeg kg	100%-nál kisebb túlélés	Nagyon mérgező anyagok.
	100% túlélés, de nyilvánvaló toxicitás	Mérgező anyagok.
	100% túlélés; nincs nyilvánvaló toxicitás	Lásd az 50 mg/kg dózisszintnél feltüntetett eredményeket.

Dózis	Eredmények	Értelmezés
50 mg/testtömeg kg	100%-nál kisebb túlélés	Anyagok, amelyek lehetnek mérgezőek vagy nagyon mérgezőek. Lásd az 5 mg/kg dózisonál feltüntetett eredményeket.
	100% túlélés, de nyilvánvaló toxicitás	Ártalmas vegyületek.
	100% túlélés; nincs nyilvánvaló toxicitás	Lásd az 500 mg/kg dózisonál feltüntetett eredményeket.
500 mg/testtömeg kg	100%-nál kisebb túlélés	Anyagok, amelyek lehetnek mérgezőek vagy ártalmasak. Lásd az 50 mg/kg dózisonál feltüntetett eredményeket.
	100% túlélés, de nyilvánvaló toxicitás	Anyagok, amelyeket úgy tekintünk, hogy nincs jelentős akut toxikus hatásuk.
	100% túlélés; nincs nyilvánvaló toxicitás	Lásd a 2000 mg/kg dózisonál feltüntetett eredményeket.
2000 mg/testtömeg kg	100%-nál kisebb túlélés	Lásd az 500 mg/kg dózisonál feltüntetett eredményeket.
	100% túlélés nyilvánvaló toxicitással vagy anélkül	Anyagok, amelyeknek nincs jelentős akut toxikus hatásuk.

Lásd még az Általános Bevezetés B. részét (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (H).

B.2. AKUT TOXICITÁS (INHALÁCIÓ)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Hasznos lehet, ha az anyag részecskeméret-eloszlásáról, gőznyomásáról, olvadáspontjáról, forráspontjáról, lobbanáspontjáról, illetve esetleges robbanásveszélyességéről előzetes információkkal rendelkezünk.

Lásd még az Általános Bevezetés B. részét (A).

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (B).

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Az anyagokkal a kísérleti állatok több csoportján fokozatosan növekvő koncentrációkkal meghatározott ideig tartó expozíciós vizsgálatot végeznek, csoportonként egy koncentrációt használva. Ezt követi a hatások, illetve az elhullások megfigyelése. A vizsgálat időtartama alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni. A vizsgálat befejezésekor a még életben lévő állatokat szintén fel kell boncolni.

Azoknál az állatoknál, amelyeknél súlyos és tartós szenvedés, illetve fájdalom jelei figyelhetők meg, szükségessé válhat a humánus módon történő kiírtás. A maró vagy irritatív tulajdonságú anyagot nem szabad olyan módon alkalmazni, hogy az erős fájdalmat vagy szenvedést okozzon.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat megkezdését megelőzően legalább öt napig a kísérlet tartási körülményei között kell tartani. A vizsgálat megkezdése előtt az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kiválasztva kell a megfelelő számú csoportokba sorolni. Szimulált expozícióra csak akkor van szükség, ha ezt az alkalmazott expozíciós berendezés típusa indokolja.

Szilárd vizsgálati anyagok vizsgálatánál a megfelelő részecskeméret eléréséhez szükség lehet az anyag mikronizálására.

Szükség esetén megfelelő vivőszer adható a vizsgálati anyaghoz, biztosítandó a vizsgálati anyag megfelelő koncentrációját a légtérben; ilyen esetben vivőszerrel exponált kontroll csoportot kell használni. Amennyiben az adagolás megkönnyítésére vivőszert vagy egyéb segédanyagot használnak, úgy ezeket úgy kell megválasztani, hogy tudható legyen róluk, hogy nem okoznak toxikus tüneteket.

Erre a célra megfelelő történelmi kontroll adatok használhatók.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

1.6.2.1. Kísérleti állatok

Ellenjavallat hiányában a patkány az előnyben részesített állatfaj. Általánosan használt laboratóriumi törzseket kell használni. A vizsgálat megkezdésekor az állatok testtömege nemenként maximum $\pm 20\%$ -kal térhet el az átlagértéktől.

1.6.2.2. Az állatok száma és neme

Minden egyes koncentrációszinthez legalább tíz rágcsáló (öt hím és öt nőstény) használata szükséges. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni.

Megjegyzés: rágcsálóknál magasabb rendű állatokon végzett akut toxicitási vizsgálatoknál megfontolandó kevesebb állat használata. A dózisoskat körültekintően kell megállapítani, és mindent el kell követni annak érdekében, hogy ne lépjük túl a közepesen toxikus dózisoskat. Ilyen vizsgálatokban a halálos dózist nem szabad beadni.

1.6.2.3. Expozíciós koncentrációk

Az expozíciós koncentrációkat megfelelő számban – legalább három alkalmazása szükséges –, és egymáshoz képest úgy kell meghatározni, hogy a vizsgálati csoportokban a toxikus hatások és elhullások megfelelően széles skálán jelenjenek meg. Az így nyert adatoknak elegendőnek kell lenniük a koncentráció/elhullás görbe megszerkesztéséhez, és – amennyiben lehetséges – az LC₅₀ érték elfogadható meghatározásához.

1.6.2.4. Határérték vizsgálat (limit teszt)

Ha öt hím és öt nőstény állatot 4 órán keresztül 20 mg/l gázzal, illetve 5 mg/l aeroszollal vagy szilárd részecskékkel exponálnak (vagy ahol ez nem lehetséges a vizsgálati anyag fizikai vagy kémiai tulajdonságai miatt,

ideértve a robbanóképességet is, a vizsgálatot a maximálisan elérhető koncentrációval kell végezni) és ez nem okoz a vizsgálati anyaggal összefüggésbe hozható elhullást 14 napon belül, további vizsgálatra nincs szükség.

1.6.2.5. Az expozíció időtartama

Az expozíció időtartama négy óra.

1.6.2.6. Berendezés

Az állatok vizsgálatához olyan berendezés kell, amelyikben állandó dinamikus levegőáramlással tizenkétszeres légcseré biztosítható annak érdekében, hogy az expozíciós légtérben legyen megfelelő az oxigéntartalom, és a vizsgálati anyag egyenletes eloszlása megfelelő legyen. Ha kamrát használnak, azt úgy kell megtervezni, hogy abban a vizsgálati állatok a lehető legkisebb mértékben zsúfolódjanak össze, és amelyik a lehető legjobban biztosítja a feltételeket a vizsgálati anyag belégzéséhez. A kamra légtérének a stabilitása érdekében általános szabály, hogy a vizsgálatához használt állatok összterfogatata ne haladja meg a kamra térfogatának 5%-át. Száj-orr, csak fej, és teljes test egyedi kamrás expozíció egyaránt alkalmazható; az első két módszer elősegíti, hogy a vizsgálati anyag egyéb úton csak minimális mennyiségben juthasson be a szervezetbe.

1.6.2.7. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. A megfigyelési időszakot azonban nem célszerű mereven kezelni; meghatározásakor figyelembe kell venni a toxikus reakciókat, kialakulásuk sebességét, valamint a gyógyulási időszak hosszát. Szükség esetén tehát a megfigyelési időszak meghosszabbítható. A toxicitási tünetek megjelenésének és megszűnésének időpontja, valamint az elhullások időpontja lényeges, különösen, ha az elhullások tendenciaszerűen következnek be.

1.6.3. Eljárás

Röviddel az expozíció előtt az állatok testtömegét meg kell mérni. Az expozíció időtartama négy óra. Az expozíció a kijelölt berendezés és a megfelelő vizsgálati anyagkoncentráció alkalmazásával történik, az egyenletes kamrakoncentráció beállása után. A kiegyenlítőidőnek rövidnek kell lennie. A vizsgálat alatt a hőmérsékletet 22 ± 3 °C-on kell tartani. Törekedni kell a relatív páratartalom 30% és 70% közötti tartására, de bizonyos esetekben (pl. egyes aeroszolok vizsgálatánál) előfordulhat, hogy ez nem valósítható meg. Enyhe negatív nyomás (≤ 5 vízmm) fenntartásával a kamrában meg lehet akadályozni a vizsgált anyag kiszivárgását a környezetbe. Az expozíció időtartama alatt az állatoknak takarmány és víz nem adható. A vizsgálati légtér előállítására és monitorozására megfelelő rendszereket kell használni. A rendszernek a lehető legrövidebb idő alatt biztosítania kell a stabil expozíciós körülményeket. A kamrának olyannak kell lennie és úgy kell működtetni, hogy az anyag egyenletes eloszlása az expozíciós légtérben fenntartható legyen.

Az alábbiakat kell mérni vagy monitorozni:

a) A levegőáramlás sebességét (folyamatosan).

b) A vizsgált anyagnak a légzési zónában mért tényleges koncentrációját, az expozíció során legalább háromszor (bizonyos expozíciós légtereknél – pl. nagy koncentrációjú aeroszoloknál – ennél gyakoribb monitorozásra van szükség). Az expozíció időtartama alatt a koncentráció nem ingadozhat több mint $\pm 15\%$ -kal az átlagértékhez képest. Egyes aeroszoloknál azonban előfordulhat, hogy a koncentráció ilyen mértékű ellenőrzése nem valósítható meg; ilyen esetekben szélesebb sáv is elfogadható. Aeroszoloknál olyan gyakorisággal kell részecske méret meghatározást végezni, amilyen gyakran szükséges (vizsgálati csoportonként legalább egyszer).

c) A hőmérsékletet és a páratartalmat, folyamatosan, ha lehetséges.

Az expozíció közben, és azt követően az állatokat rendszeresen meg kell figyelni és ezt rögzíteni kell; minden egyes állatról külön feljegyzést kell készíteni. Az első napon gyakran kell megfigyelni az állatokat. Minden egyes munkanapon legalább egyszer alapos klinikai vizsgálatot kell végezni; egyéb vizsgálatokat naponta kell végezni, továbbá megfelelő lépéseket kell tenni annak érdekében, hogy a lehető legkevesebb legyen a vizsgálat értékelése szempontjából elvesztett állat, ilyen pl. az elpusztult állatok boncolása vagy hűtése, illetve a gyenge vagy moribund állatok elkülönítése vagy feláldozása. A megfigyeléseknek ki kell terjedniük a bőr, a szőrzet, a szemek és nyálkahártyák elváltozásaira, továbbá a légző-, a keringési, az autonóm és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomatomotoros aktivitás és a viselkedés változásaira. Külön figyelmet kell fordítani a légzési funkciókra, a remegés, görcsök, nyáladás, hasmenés, letargia, alvás és kóma előfordulására. Az elhullás időpontját a lehető legpontosabban kell rögzíteni. Az egyes állatok testtömegét az expozíciót követően hetente, illetve az elhullás időpontjában meg kell mérni.

A vizsgálat során elpusztult állatokat, valamint a vizsgálat lezárásakor még életben lévő állatokat egyaránt fel kell boncolni. A boncolásnál külön figyelmet kell fordítani a felső és alsó légutak esetleges elváltozásaira. Valamennyi patológiás elváltozást rögzíteni kell. Indokolt esetben a szöveteken kórszövetetani vizsgálatot kell végezni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összesíteni, minden egyes vizsgálati csoportnál feltüntetve az állatok számát a vizsgálat megkezdésekor, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxicitás egyéb jeleit mutató állatok számát, a toxikus hatások leírását, valamint a boncolások eredményeit. A testtömeg változásokat ki kell számolni és rögzíteni kell, amennyiben az állat egy napnál tovább marad életben. Az anyag okozta fájdalom és szenvedés megszüntetése érdekében humánus módon kiírtott állatokat az anyag okozta elhullásokhoz kell sorolni. Az LC₅₀ értékét valamely elfogadott módszerrel kell meghatározni. Az adatok értékelésekor ki kell térni az állatok expozíciója és az összes rendellenesség – ideértve a viselkedési és klinikai rendellenességeket, patológiai elváltozásokat, testtömeg változásokat, elhullást, és valamennyi egyéb toxikus hatást – előfordulási gyakoriságára, illetve súlyossága közötti esetleges összefüggésekre.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jelentésnek az alábbi adatokat kell tartalmazni:

– faj, törzs, származás (forrás), környezeti körülmények, takarmányozás, stb.;

– vizsgálati körülmények: az inhalációs berendezés leírása, beleértve a kialakítását, típusát, méreteit, a levegőforrást, az aeroszolok előállítására használt rendszert, a légkondicionálás módszerét, valamint a kísérleti állatok elhelyezésének módját a vizsgálati kamrában, amennyiben használtak ilyet. Ismertetni kell a hőmérséklet, a páratartalom, valamint az aeroszolok koncentrációjának és részecskeméret-eloszlásának mérésére használt berendezéseket.

Expozíciós adatok

Ezeket táblázatos formában kell összesíteni, megadva az átlagértékeket, a szórás mértékét (pl. standard deviáció), továbbá – amennyiben lehetséges – az alábbi adatokat:

a) az inhalációs berendezésen átmenő levegő áramlási sebessége;

b) a levegő hőmérséklete és páratartalma;

c) a névleges (nominális) koncentráció (az inhalációs berendezésbe adagolt vizsgálati anyag teljes mennyisége osztva a levegő térfogatával);

d) az alkalmazott vivőszert, amennyiben ilyet használtak;

e) a légzési zónában mért tényleges koncentrációk;

f) a tömegfelelő aerodinamikai átmérő (Mass Median Aerodynamic Diameter, MMAD), és a geometrikus standard deviáció (GSD);

g) a kiegyenlítőidő időtartama (az állandó koncentráció beállításához szükséges idő);

h) az expozíciós időszak; ez az alábbiakat tartalmazza:

– a hatásra vonatkozó adatok az állatok neme és expozíciós szint szerint összesítve (tehát a vizsgálat során elpusztult vagy kiírtott állatok száma, a toxicitás jeleit mutató állatok száma, az exponált állatok száma);

– az elhullás időpontja az expozíció alatt vagy azt követően, az állatok humánus módon történő kiírtásának oka és az alkalmazott kritériumok;

– valamennyi megfigyelés;

– a megfigyelési időszak végén meghatározott LC₅₀ érték mindkét nemnél (feltüntetve a meghatározáshoz használt módszert);

– az LC₅₀ érték 95%-os megbízhatósági határai (amennyiben megadhatók);

– a dózis/elhullás görbe és meredeksége (amennyiben a meghatározás módszere ezt lehetővé teszi);

– boncolási leletek;

– kórszöveti leletek (amennyiben vannak);

– az eredmények megvitatása (külön figyelmet kell fordítani annak elemzésére, hogy az állatok humánus módon történő kiírtása a vizsgálat során milyen hatással lehetett a számított LC₅₀ értékére);

– az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (H).

B.3. AKUT TOXICITÁS (DERMÁLIS)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (A).

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (B).

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot fokozatosan növekvő dózisokban helyezzük a bőrre, több kísérleti állatcsoporton, csoportonként egy dózist használva. Ezt követi a hatások, illetve az elhullások megfigyelése. A vizsgálat időtartama alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni. A vizsgálat befejezésekor a még életben lévő állatokat szintén fel kell boncolni.

Azoknál az állatoknál, amelyeknél súlyos és tartós szenvedés, illetve fájdalom jelei figyelhetők meg, szükség lehet humánus módon történő kiirtásukra. Maró vagy irritatív tulajdonságai miatt erős fájdalmat és szenvedést okozó anyagot nem szabad olyan módon alkalmazni, hogy az erős fájdalmat vagy szenvedést okozzon.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a vizsgálatnál használt ketrecekben, és a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. A vizsgálat megkezdése előtt az egészséges fiatal felnőtt állatokat véletlenszerűen kiválasztva a kezelési csoportokba soroljuk. Megközelítőleg 24 órával a vizsgálat megkezdése előtt a szőrzetet nyírással vagy borotválással el kell távolítani az állatok törzsének háti oldaláról. Nyírás vagy borotválás közben ügyelni kell arra, nehogy olyan bőrsérülést okozunk, ami a felszívódást befolyásolhatja. Ahhoz, hogy a vizsgálati anyagot a bőrre lehessen helyezni, a testfelület legalább 10%-át szőrteleníteni kell. Az olyan szilárd anyagok vizsgálatánál, melyeket szükség esetén poríthatnak, a vizsgálati anyagot, annak érdekében, hogy jól tapadjon a bőrhöz, vízzel, vagy valamely alkalmas vivőszerral meg kell nedvesíteni. A vivőszernél figyelembe kell venni a vivőszernek a vizsgálati anyag bőrbehatoló képességére gyakorolt hatását. A folyékony anyagokat általában hígítás nélkül alkalmazzák.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

1.6.2.1. Kísérleti állatok

Felnőtt patkányok vagy nyulak használhatók. Egyéb fajoknál a választást indokolni kell. Általánosan használt laboratóriumi törzseket kell használni. A vizsgálat megkezdésekor az állatok testtömege nemenként maximum $\pm 20\%$ -kal térhet el a megfelelő átlagértéktől.

1.6.2.2. Az állatok száma és neme

Minden egyes dózisszinthez legalább öt állatra van szükség. Valamennyinek azonos neműnek kell lennie. Nőtényeknél egyszer sem szült és nem vemhes állatokat kell használni. Amennyiben adatok állnak rendelkezésre arról, hogy valamelyik nem egyedei határozottan érzékenyebbek, úgy ilyen nemű állatokat kell használni.

Megjegyzés: rágcsálóknál magasabbrendű állatokon végzett akut toxicitási vizsgálatoknál kevesebb állat használata megfontolandó. A dózisokat körültekintően kell megállapítani, és mindent el kell követni annak érdekében, hogy ne lépjük túl a közepesen toxikus dózisokat. Ilyen esetekben nem szabad a halálos dózist alkalmazni.

1.6.2.3. Dózisszintek

A dózisszinteket megfelelő számban – legalább háromra van szükség – és egymáshoz képest úgy kell meghatározni, hogy a vizsgálati csoportokban a toxikus hatások és a halálozási arányok megfelelően széles skálán jelenjenek meg. A dózisszintek meghatározásakor figyelembe kell venni az anyag esetleges irritatív vagy maró hatását. Az így nyert adatoknak elegendőnek kell lenniük a dózis/hatás görbe megszerkesztéséhez, és – amennyiben lehetséges – az LD₅₀ érték elfogadható meghatározásához.

1.6.2.4. Határérték vizsgálat (limit teszt)

Határérték vizsgálatot lehet végezni egyetlen dózisszinten, minimum 2000 mg/testtömeg kg dózissal egy öt hím és öt nőstényt tartalmazó csoporton, a fent ismertetett eljárás szerint.

1.6.2.5. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszaknak legalább 14 napnak kell lennie. A megfigyelési időt azonban nem célszerű mereven kezelni; meghatározásakor figyelembe kell venni a toxikus reakciókat, azok kialakulási sebességét, valamint a regeneráció időtartamát. Szükség esetén tehát a megfigyelési időszak meghosszabbítható. A toxicitási tünetek megjelenésének és megszűnésének időpontja, időtartama, valamint az elhullások időpontja lényeges, különösen, ha az elhullások tendenciaszerűen késleltetve következnek be.

1.6.3. Eljárás

Az állatokat egyenként kell a ketrecben tartani. A vizsgálati anyagot egyenletesen kell felhelyezni a teljes testfelület kb. 10%-át kitevő bőrfelületre. Erősen toxikus anyagoknál a kezelt bőrfelület lehet némileg kisebb is, de a kijelölt bőrfelületet a lehető legnagyobb mértékben be kell fedni lehetőség szerint minél vékonyabban és egyenletesebben a vizsgálati anyaggal.

A vizsgált anyagot porózus gézkötés és nem-irritáló ragtapasz segítségével kell a bőrön tartani a 24 órás expozíciós időszakon keresztül. Emellett a vizsgálati felületet megfelelő módon be kell fedni, hogy a gézkötés és a vizsgálati anyag a bőrön maradjon és az állatok a vizsgálati anyagot ne nyelhessék le.

A vizsgálati anyag lenyelésének megakadályozására az állat mozgása megfelelő eszközzel korlátozható, de az állat teljes immobilizálása nem ajánlatos. Az expozíciós időszak végén a megmaradt vizsgálati anyagot lehetőség szerint vízzel vagy egyéb megfelelő módon el kell a bőrrel távolítani.

A megfigyelt tüneteket rendszeresen fel kell jegyezni; minden egyes állatról külön feljegyzést kell készíteni. Az első napon gyakran kell az állatokat megfigyelni.

Minden egyes munkanapon legalább egyszer alapos klinikai vizsgálatot kell végezni; egyéb vizsgálatokat naponta kell végezni, továbbá megfelelő lépéseket kell tenni annak érdekében, hogy az állatveszteség a vizsgálat értékelése szempontjából minimális legyen, ilyen pl. az elpusztult állatok boncolása vagy hűtése, illetve a gyenge vagy moribund állatok elkülönítése vagy feláldozása.

A megfigyeléseknek ki kell terjedniük a szőrzet, a kezelt bőrfelület, a szemek és nyálkahártyák elváltozásaira, továbbá a légző-, a keringési-, az autonóm és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomato-motoros aktivitás és a viselkedés változásaira. Külön figyelmet kell fordítani a remegés, görcsök, nyáladzás, hasmenés, letargia, alvás és kóma megfigyelésére. Az elhullás időpontját a lehető legpontosabban rögzíteni kell.

A vizsgálat során elpusztult állatokat, valamint a vizsgálat lezárásakor még életben lévő állatokat egyaránt fel kell boncolni. Valamennyi kóros elváltozást rögzíteni kell. Indokolt esetben a szöveteken kórszövettani vizsgálatot kell végezni.

A toxicitás meghatározása ellenkező nemű állatokon.

A vizsgálat egyik nem állatain történő elvégzése után az adott anyagot egy öt állatból álló, ellenkező nemű állatcsoporton kell vizsgálni, hogy megállapítsák, hogy az ehhez a nemhez tartozó állatoknál nem észlelhető-e határozottan fokozott érzékenység a vizsgálati anyaggal szemben. Bizonyos esetekben kevesebb állat felhasználása indokolható. Amennyiben elegendő adat áll rendelkezésre arról, hogy a már vizsgált nem állatai határozottan érzékenyebbek az adott anyaggal szemben, úgy az ellenkező nemű állatok vizsgálata elhagyható.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összesíteni, minden egyes vizsgálati csoportnál feltüntetve az állatok számát a vizsgálat megkezdésekor, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxicitás egyéb jeleit mutató állatok számát, a toxikus hatások leírását, valamint a boncolási leleteket. Az állatok testtömegét röviddel a vizsgálati anyag alkalmazása előtt meg kell mérni és fel kell jegyezni, majd e műveletet hetente, illetve az elhullás időpontjában meg kell ismételni. A testtömegváltozásokat ki kell számolni és rögzíteni kell, amennyiben az állat egy napnál tovább marad életben. Az anyag okozta fájdalom és szenvedés megszüntetése érdekében humánus módon kiírtott állatokat az anyag okozta elhulláshoz kell sorolni. Az LD₅₀ értékét valamely elfogadott módszerrel kell meghatározni.

Az adatok értékelésének tartalmaznia kell az anyag és az expozíció között fennálló összefüggéseket (ha van ilyen összefüggés), valamennyi kóros tünet előfordulásának gyakoriságát és súlyosságát, beleértve a viselkedési rendellenességeket és a klinikai tüneteket, a durva károsodásokat, a testtömegváltozást és valamennyi egyéb toxikus tünetet.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jelentésnek az alábbi adatokat kell tartalmazni:

– faj, törzs, származás (forrás), környezeti körülmények, takarmányozás, stb.;

– vizsgálati körülmények (beleértve a bőrfelület megtisztításának módját, illetve az alkalmazott kötés típusát: zárt vagy nyitott);

- dózisszintek (az esetlegesen alkalmazott vivőszert megnevezésével és a koncentráció feltüntetésével);
- a vizsgálatban használt állatok neme;
- a toxikus hatásra vonatkozó adatok az állatok neme és dózisszint szerint összesítve (tehát a vizsgálat során elpusztult vagy kiírtott állatok száma, a toxicitás jeleit mutató állatok száma, az exponált állatok száma);
- az elhullás időpontja a vizsgálati anyag alkalmazása után, az állatok humánus módon történő kiírtásának okai és az alkalmazott kritériumok;
- valamennyi megfigyelés;
- a 14. napon meghatározott LD₅₀ érték a teljes vizsgálatnál használt nem állatainál, feltüntetve a meghatározáshoz használt módszert;
- az LD₅₀ érték 95%-os megbízhatósági határai (amennyiben megadhatók);
- dózis/elhullás görbe és meredeksége, amennyiben a meghatározás módszere ezt lehetővé teszi;
- boncolási leletek;
- kórszöveti leletek (amennyiben vannak);
- ellenkező nemű állatokon esetlegesen végzett vizsgálatok eredményei;
- az eredmények megvitatása (külön figyelmet kell fordítani annak elemzésére, hogy az állatok humánus módon történő kiírtása a vizsgálat során milyen hatással lehetett a számított LD₅₀ értékére);
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (H).

B.4. AKUT TOXICITÁS (BŐRIRRITÁCIÓ)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (A).

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (B).

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Előzetes megfontolások

Az adott anyagról rendelkezésre álló valamennyi információt alaposan mérlegelni kell, el kell kerülni az anyagok olyan módon történő vizsgálatát, ami előreláthatóan súlyos tüneteket okoz. Az alábbi adatok segíthetnek eldönteni, hogy teljes vizsgálat, egyetlen állaton végzett vizsgálat, vagy a vizsgálat mellőzése indokolt:

(i) Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reakcióképesség. Erősen savas vagy lúgos kémhatású anyagokat (amelyek pH értéke 2, vagy annál kisebb, illetve 11,5, vagy annál nagyobb) nem feltétlenül kell primer bőrirritációra vizsgálni, amennyiben maró hatás várható. Az alkáli vagy savtartalmakat szintén figyelembe kell venni.

(ii) Amennyiben megfelelően hitelesített in vitro vizsgálatokból meggyőző bizonyítékok állnak rendelkezésre arról, hogy az adott anyag súlyos tüneteket okoz, a teljes vizsgálat elvégzésére nincs feltétlenül szükség.

(iii) Az akut toxicitási vizsgálatok eredményei. Amennyiben az adott anyaggal a határérték vizsgálati módszerrel (2000 mg/testtömeg kg) már végeztek akut dermális toxicitási vizsgálatot és ennek során nem volt megfigyelhető bőrirritáció, úgy a bőrirritáció további vizsgálata nem feltétlenül szükséges. Ezen felül nem szükséges olyan anyagokat vizsgálni, amelyekről ismert, hogy bőrön keresztül felszívódva nagyon mérgezőek.

A vizsgálati anyagot egyszeri dózisban kell felhelyezni több kísérleti állat bőrére; mindegyik állat egyben saját kontrolljaként szolgál. Az irritáció mértékét meghatározott idő után kell leolvasni és értékelni, és emellett a hatások teljes értékeléséhez részletesebb leírást is kell róla adni. Ahhoz, hogy az észlelt hatások visszafordíthatóságát teljes mértékben megítéljék, a megfigyelés időtartamának megfelelően hosszúnak kell lenni.

Azoknál az állatoknál, amelyeknél súlyos és tartós szenvedés, illetve fájdalom jelei figyelhetők meg, szükségessé válhat humánus módon történő kiírtásuk.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészületek

A vizsgálat megkezdése előtt kb. 24 órával meghatározott mennyiségű szőrt nyírással vagy borotválással kell eltávolítani az állatok háti oldaláról. Nyírás vagy borotválás közben ügyelni kell arra, hogy ne okozunk bőrsérülést az állaton. A vizsgálatához csak egészséges és ép bőrfelületű állatokat szabad használni.

Egyes nyúltörzseken sűrű szőrzetből álló szigetecskék figyelhetők meg, amelyek az év bizonyos időszakaiban fokozottan szembetűnővé válnak. Ne alkalmazzuk a vizsgált anyagokat e sűrű szőrzettel fedett területeken.

A szilárd halmazállapotú anyagok vizsgálatánál (amelyeket szükség esetén poríthatnak) a vizsgálati anyagot, annak érdekében, hogy jobban tapadjon a bőrhöz, vízzel, vagy valamely alkalmas vivőszerrel meg kell nedvesíteni. A vivőszer használatánál figyelembe kell venni, hogy az milyen mértékben befolyásolja a vizsgálati anyag bőrirritatív hatását. A folyékony anyagokat általában hígítás nélkül alkalmazzuk.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

1.6.2.1. Kísérleti állatok

Bár több emlősfaj használható a vizsgálatához, a javasolt faj az albínó nyúl.

1.6.2.2. Az állatok száma

Amennyiben *in vitro* vizsgálatok eredményei, vagy egyéb megfontolások alapján feltételezhető, hogy az anyag nekrozist okozhat (tehát maró hatású), úgy egyetlen állaton végzett vizsgálat megfontolandó. Ha e vizsgálat során nem tapasztalható maró hatás, akkor a vizsgálatot legalább két további állattal kell kiegészíteni.

A teljes vizsgálatához legalább három egészséges felnőtt állat szükséges. Külön kezeletlen kontroll állatcsoportra nincs szükség. A nem egyértelmű hatások tisztázására további állatokra szükség lehet.

1.6.2.3. Dózisszint

Ellenjavallat hiányában a vizsgálati bőrterületre 0,5 ml folyadékot, vagy 0,5 g szilárd vagy félszilárd anyagot kell helyezni. A vizsgálatban minden állatnál a szomszédos kezeletlen bőrterületek a kontrollok.

1.6.2.4. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszak hosszát nem kell mereven rögzíteni és úgy kell meghatározni, hogy a megfigyelt hatások visszafordíthatósága (reverzibilitás) vagy visszafordíthatatlansága (irreverzibilitás) teljes mértékben értékelhető legyen, de szokásos esetben nem kell, hogy meghaladja az anyag alkalmazását követő 14 napot.

1.6.3. Eljárás

Az állatokat egyenként kell a ketrecben tartani. A vizsgált anyagot kisméretű (kb. 6 cm² kiterjedésű) bőrfelületre kell helyezni és gézdarabbal le kell fedni és nem-irritáló ragtapasszal kell rögzíteni. Folyadékoknál és bizonyos pasztáknál előfordulhat, hogy a vizsgált anyagot a gézdarabra kell helyezni, és a gézdarabot ezt követően kell a kijelölt bőrfelületre helyezni. A gézdarabot az expozíció idejére megfelelő zárt vagy félzárt kötéssel kell rögzíteni. Meg kell akadályozni, hogy az állat hozzáférhessen a gézdarabhoz és lenyelje vagy belélegezze a vizsgált anyagot.

Az expozíció végén a vizsgálati anyag maradékait vízzel vagy megfelelő oldószerrel lehetőség szerint el kell távolítani a bőrről, oly módon, hogy ez ne befolyásolja a kialakult bőrreakciót, vagy ne okozzon bőrsérülést.

Az expozíció időtartama szokásos esetben négy óra. Amennyiben gyanítható, hogy az anyag nekrozist okoz (azaz maró hatású lehet), úgy az expozíció időtartamát csökkenteni kell (pl. egy órára vagy három percre). Ilyenkor a vizsgálat első menetben elvégezhető egyetlen állat felhasználásával, amelyre – amennyiben a vizsgálati anyag akut dermális toxikus tulajdonságai ezt nem zárják ki – egyszerre három gézdarabot helyezünk fel. Az első gézdarabot három perc elteltével vesszük le. Amennyiben nem észlelhető súlyos bőrreakció, a második gézdarabot egy óra múlva vesszük le. Ha az ebben a fázisban a megfigyelések arra utalnak, hogy a négyórás expozíció indokolt és ez humánus módon kivitelezhető, akkor a harmadik gézdarabot négy óra múlva vesszük le, és a bőrreakciókat súlyosságuk szerint értékeljük. Ez utóbbi esetben (ha tehát a négyórás expozíció kivitelezhető volt) a vizsgálatot legalább két állattal ki kell egészíteni, kivéve, ha ez humánus módon nem végezhető el (pl. ha a négyórás expozíciót követően nekrozis figyelhető meg). Amennyiben a háromperces vagy az egyórás expozíciót követően súlyos bőrreakció (pl. nekrozis) figyelhető meg, úgy a vizsgálatot azonnal félbe kell szakítani. Bizonyos esetekben hosszabb expozíciós idő is indokolt lehet, pl. a várható emberi felhasználás, illetve expozíció alapján.

1.6.3.1. Megfigyelés és értékelés

A géz levétele után először 60 perc, majd 24, 48 és 72 óra múlva kell az állatokon az eritéma és az ödéma megjelenését megfigyelni, és a bőrirritációt a reakciók súlyossága szerint az 1. Táblázatban foglaltaknak megfelelően kell értékelni és feljegyezni. Amennyiben a reverzibilitást 72 óra múlva sem lehet teljes bizonyossággal megállapítani, további megfigyelésekre lehet szükség. Az irritáció megfigyelése mellett valamennyi súlyos elváltozást – mint például a maró hatást (korrózió, a bőr visszafordíthatatlan roncsolódása) – és egyéb toxikus hatást részletesen le kell írni.

A kétes, illetve a bőrnek a vizsgálati anyaggal történt elszíneződése miatt elfedett bizonytalan reakciók, illetve tünetek tisztázására kórszövettani vizsgálatot, bőrredővastagság-mérést, vagy egyéb megfelelő vizsgálatot lehet végezni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összesíteni, minden egyes állatnál feltüntetve az eritéma és ödéma súlyossága szerinti értékelést a teljes megfigyelési időszakra vonatkoztatva. Valamennyi súlyos elváltozást, az irritáció mértékét és jellegét, a visszafordíthatóságot (reverzibilitás) vagy korróziót, és minden egyéb toxikus hatást fel kell jegyezni.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jelentésnek az alábbi adatokat kell tartalmazni:

- faj, törzs, származás (forrás), környezeti feltételek takarmányozás, stb.;
- vizsgálati körülmények (beleértve a vegyi anyag lényeges fizikai-kémiai tulajdonságait, a bőrfelület előkészítésének és megtisztításának módját, illetve az alkalmazott kötés típusát: zárt vagy félzárt);
- az irritáció tüneteinek táblázatos összesítése valamennyi állatnál és valamennyi megfigyelési időszakban (pl. a géz eltávolítását követő 1, 24, 48 és 72 órában, stb.);
- valamennyi megfigyelt súlyos elváltozás – beleértve a korróziót – leírása;
- a megfigyelt irritáció mértékének és jellegének az ismertetése, illetve az esetleges kórszövettani leletek;
- a bőrirritáción kívül minden egyéb toxikus hatás leírása;
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (H).

Függelék

A bőrreakciók fokozatai

Eritéma és pörkképződés	Pontérték
Nincs eritéma	0
Nagyon enyhe eritéma (alig észrevehető)	1
Jól körvonalazott eritéma	2
Közepes vagy súlyos eritéma	3
Súlyos eritéma (céklavörös szín) vagy pörkképződés (mélybe hatoló sérülések), amelyek az eritéma értékelését akadályozzák	4
Ödémaképződés	
Nincs ödéma	0
Nagyon enyhe ödéma (alig észrevehető)	1
Enyhe ödéma (a terület szélei a tapintható kiemelkedések miatt jól meghatározottak)	2
Közepes ödéma (a szélek kb. 1 mm-re kiemelkednek)	3
Súlyos ödéma (több mint 1 mm-es kiemelkedés, és az expozíciós területet meghaladó kiterjedés)	4

B.5. AKUT TOXICITÁS (SZEMIRRITÁCIÓ)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (A).

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (B).

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Előzetes megfontolások

Az adott anyagról rendelkezésre álló valamennyi információt alaposan mérlegelni kell, hogy elkerüljék az anyagok olyan körülmények között történő vizsgálatát, amelyek előreláthatóan súlyos reakciókat válthatnak ki. Ebből a szempontból az alábbi adatok lehetnek hasznosak:

(i) Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reakcióképesség. Erősen savas vagy lúgos kémhatású anyagokat (pl. amelyek pH értéke 2, vagy annál kisebb, illetve 11,5, vagy annál nagyobb) nem feltétlenül kell vizsgálni, amennyiben súlyos elváltozások várhatóak. Az alkáli vagy savtartalmakat szintén figyelembe kell venni.

(ii) Megfelelően hitelesített alternatív vizsgálatok eredményei. Azokkal az anyagokkal, amelyekről kimutatták, hogy potenciálisan maró hatásúak vagy kifejezett irritációt okoznak, a továbbiakban nem kell szemirritációs vizsgálatot végezni, mivel feltételezzük, hogy ezek az anyagok súlyos elváltozásokat idéznének elő a szemben.

(iii) Bőrirritációs vizsgálatok eredményei. Azokkal az anyagokkal, amelyek a bőrirritációs vizsgálatban egyértelmű kimaródást vagy súlyos bőrirritációt okoztak, a továbbiakban nem kell szemirritációs vizsgálatot végezni, mivel feltételezzük, hogy ezek az anyagok súlyos tüneteket okoznának a szemben is.

A vizsgált anyagot egyszeri dózisban kell alkalmazni a kísérleti állatok egyik szemén; az állatok másik, nem kezelt szeme a kontroll. Az irritáció mértékét meghatározott időközönként értékelni és osztályozni kell, és emellett további leírást is kell róla adni, hogy a hatást összességében lehessen értékelni. A megfigyelések időtartamának megfelelő hosszúnak kell lenni ahhoz, hogy a megfigyelt hatások visszafordíthatósága (reverzibilitása) vagy visszafordíthatatlansága (irreverzibilitása) teljes mértékben elemezhető legyen.

Azoknál az állatoknál, amelyeknél súlyos és tartós szenvedés, illetve fájdalom jelei figyelhetők meg, szükségessé válhat humánus módon történő kiírtásuk.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészületek

A vizsgálat megkezdésétől számított 24 órán belül a vizsgálatra előzetesen kiválasztott valamennyi kísérleti állat mindkét szemét meg kell vizsgálni. Nem szabad olyan állatokat használni, amelyeknél szemirritáció, a szem valamilyen hibája, vagy szaruhártya-sérülés állapítható meg.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

1.6.2.1. Kísérleti állatok

Bár eddig már többféle kísérleti állatot használtak, egészséges felnőtt albínó nyulak használata ajánlott.

1.6.2.2. Az állatok száma

Ha kifejezett hatások várhatóak, megfontolandó a vizsgálat egyetlen állaton történő elvégzése. Amennyiben az itt ismertetett módszerrel végzett vizsgálat szerint egyetlen nyúlra végzett vizsgálatban az anyag erős irritációt (visszafordítható hatás) okoz, vagy maró hatású (visszafordíthatatlan hatás) a szemben, úgy az anyaggal nem feltétlenül szükséges további állatokon szemirritációs vizsgálatot végezni. Néha azonban, bizonyos kérdések tisztázására további vizsgálatok elvégzése további állatokon indokolt lehet.

Az egyetlen állaton végzett vizsgálatról eltekintve, a vizsgálatához legalább három állatot kell használni. A nem egyértelmű hatások tisztázására szükség lehet további állatokra is.

1.6.2.3. Dózisszint

Folyadékok vizsgálatához 0,1 ml-es dózist használunk. Szilárd anyagok, paszták, és szemcsés anyagok vizsgálatára kb. 0,1 ml térfogatú, vagy 0,1 g tömegű (az alkalmazott dózist minden esetben fel kell jegyezni) mennyiség szükséges. Amennyiben a vizsgált anyag szilárd halmazállapotú vagy szemcsés, úgy finom porrá kell törni. A szemcsés anyagok térfogatát finom tömörítés után – pl. a mérőedény finom üttögetésével – kell megmérni.

Pumpás spray vagy túlnyomásos aeroszolos palackokban lévő anyagoknál a folyadékot ki kell szórni a palackból, 0,1 ml-nyit összegyűjteni, majd a folyadékoknál leírtak szerint kell a szembe juttatni.

1.6.2.4. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszak hosszát nem kell mereven rögzíteni és úgy kell meghatározni, hogy a megfigyelt hatások visszafordíthatósága vagy visszafordíthatatlansága teljes mértékben elemezhető legyen, de szokásos esetben nem kell, hogy meghaladja az anyag alkalmazását követő 21 napot.

1.6.3. Eljárás

Az állatokat egyenként kell a ketrecben tartani. A vizsgált anyagot az állatok egyik szemének kötőhártya zsákjába kell helyezni, miután az alsó szemhéjat finoman elhúztuk a szemgolyótól. Ezután a szemhéjakat kb. egy másodpercig finoman összefogjuk, hogy az anyag kiszivárgását megakadályozzuk. Az állatok másik, nem kezelt szeme a kontroll.

Ha feltételezhető, hogy az anyag erős fájdalmat okozhat, úgy a vizsgálati anyag alkalmazása előtt helyi érzéstelenítés végezhető. A helyi érzéstelenítő típusát, koncentrációját, és az alkalmazás időpontját körültekintően kell megválasztani, hogy használata ne gyakoroljon lényeges befolyást a vizsgált anyag által kiváltott reakciókra. Az állat másik, kontroll gyanánt szolgáló szemét hasonlóképpen érzésteleníteni kell.

A vizsgálati állatok szeméit az anyag alkalmazása után legalább 24 óráig nem szabad kiöblíteni. 24 óra elteltével az öblítés megfontolható, amennyiben az indokolt.

Egyes, e vizsgálat alapján irritatív hatású anyagoknál indokolt lehet további vizsgálatok elvégzése olyan nyulakon, amelyeknek a szeméit röviddel az anyag alkalmazása után kiöblítjük. Ilyen esetekben három nyúl felhasználása javasolt. Fél perccel az anyag alkalmazása után a nyulak szeméit fél percig öblítjük, olyan mennyiségű vízzel és olyan folyási sebesség mellett, hogy az ne okozzon sérülést.

1.6.3.1. Megfigyelés és értékelés

Az állatok szeméit 1, 24, 48 és 72 óra elteltével kell megvizsgálni. Ha a szemén 72 óra után nincsenek szemkárosodásra utaló elváltozások, a vizsgálatot le lehet zárni. A szaruhártyára kiterjedő vagy egyéb szemképleteken tartósan fennálló irritációnál az elváltozások előrehaladásának és a reverzibilitás vagy irreverzibilitás nyomonkövetésére további megfigyelésre van szükség. A szaruhártya, a szivárványhártya és a kötőhártya megfigyelése mellett az összes egyéb megfigyelt elváltozást fel kell jegyezni és bele kell foglalni a vizsgálati jelentésbe. A szemreakcióknak a súlyosság szerinti értékelését (táblázat) minden egyes vizsgálatkor rögzíteni kell. (A szemreakcióknak a súlyosság szerinti értékelését többféleképpen lehet értelmezni. A vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyeléseket végző és értelmező személyek munkájának megkönnyítésére szemirritációkkal foglalkozó illusztrált útmutatót lehet használni.)

A reakciók tanulmányozásához binokuláris nagyító, kézi réslámpa, biomikroszkóp, vagy egyéb megfelelő eszköz vehető igénybe. A 24 óra elteltével megfigyelt tünetek rögzítése után a nyúl, vagy nyulak szeme fluorescein alkalmazásával tovább vizsgálható.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összesíteni, minden egyes állatnál feltüntetve az irritációs értékeket a meghatározott megfigyelési időpontokban. Bele kell foglalni a jelentésbe az irritáció mértékének és jellegének, illetve a megfigyelt súlyos elváltozásoknak a leírását, továbbá a szemet érintő hatásokon kívül minden egyéb hatást.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jelentésnek az alábbi adatokat kell tartalmazni:

- állatok adatai (faj, törzs, származás (forrás), környezeti körülmények, takarmányozás, stb.);
- vizsgálati körülmények (beleértve a vegyi anyag lényeges fizikai-kémiai tulajdonságait);
- az irritációra vagy maró hatásra vonatkozó adatok táblázatos összesítése valamennyi állatnál és valamennyi megfigyelési időpontban (pl. 1, 24, 48 és 72 óra);
- valamennyi megfigyelt súlyos elváltozás leírása;
- az irritáció vagy maró hatás mértékének és jellegének részletes ismertetése, beleértve a szaruhártya érintett területének leírását, valamint a visszafordíthatóságot;
- az 1, 24, 48 és 72 óra elteltével végzett irritáció értékeléséhez alkalmazott módszer leírása (pl. kézi réslámpa, biomikroszkóp, fluorescein festés);
- nem a szemet érintő helyi hatások ismertetése;
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. *Értékelés és értelmezés*

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (G).

4. *HIVATKOZÁSOK*

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (H).

*Függelék**A szemelváltozások fokozatai**Szaruhártya*

Homályosság: a homály mértéke (leolvasást a legsűrűbb területről végezzük)	
Fekélyesedés vagy homály nem észlelhető:	0
Szórványos vagy diffúz homályos területek (a megszokott csillogás enyhe tompulásán kívül), a szivárványhártya (írisz) részletei tisztán láthatóak:	1
Könnyen kivehető áttetsző terület, a szivárványhártya részletei enyhén homályosak: Gyöngyházfényű terület, a szivárványhártya részletei láthatóak, a pupilla mérete alig határozható meg:	2
	3
Nem átlátszó szaruhártya, a szivárványhártya egyáltalán nem látható:	4

Szivárványhártya (írisz)

Normális:	0
Kifejezetten mélyebb redők, vérbőség, duzzanat, mérsékelt vérbőség vagy belövelltség a szaruhártya körül, vérbőség, vagy belövelltség, ezek közül bármelyik, vagy ezek bármilyen kombinációja, a szivárványhártya még reagál a fényre (a lassú reakció pozitívnak minősül):	1
Fényre nincs reakció, vérzés, súlyos roncsolódás (ezek közül bármelyik):	2

Kötőhártyák

Vörösödés (a szemhéj vagy szegélyező kötőhártyájának legsúlyosabb elváltozása, a kontroll szemhez viszonyítva)	
Normális vérerek:	0
Egyes vérerek egyértelműen vérteltek (belövelltek):	1
Diffúz, bíborvörös szín, az egyes vérerek nehezen kivehetőek:	2
Diffúz, marhahússra emlékeztető vörös szín:	3

Kemózis: szemhéjak és/vagy pislogóhártyák

Nincs duzzanat:	0
Bármilyen, a normálist meghaladó duzzanat (beleértve a pislogóhártyákat):	1
Nyilvánvaló duzzanat a szemhéjak részleges kifordulásával:	2
Duzzanat kb. félig zárt szemhéjakkal:	3
Duzzanat több mint félig zárt szemhéjakkal:	4

B.6. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Megjegyzések:

Azok az érzékeny és arra alkalmas vizsgálati módszerek, melyek azoknak az anyagoknak a meghatározására szolgálnak, melyeknek embereken potenciális bőrszenzibilizáló hatásuk van, fontosak a toxicitás közegészségügyi szempontoknak megfelelő osztályozásához.

Egyetlen olyan vizsgálati eljárás sincs, amelyikkel valamennyi, az embereket veszélyeztető összes potenciális bőrszenzibilizáló anyagot megbízhatóan meg lehet határozni, és amelyik minden anyag vizsgálatára alkalmas.

Az anyag fizikai tulajdonságait, beleértve a bőrön való áthatolás képességét és egyéb tényezőket is, a módszer kiválasztásánál meg kell fontolni.

Tengerimalacokon két vizsgálati módszert dolgoztak ki: az egyik az adjuvánt használó vizsgálat, amelyikben az allergiás állapot kialakulását a vizsgálati anyag Freund Komplet Adjuvánsban (Freunds Complete Adjuvant, FCA) történő feloldásával vagy elosztatásával segítik elő, a másik vizsgálatához nem kell adjuváns.

Az adjuvánt felhasználó vizsgálatok valószínűleg élethűbbek az adott anyag emberek bőrén túlérzékenységet okozó hatásának az előrejelzésére, mint azok a módszerek, amelyek nem alkalmazzák az FCA-t, ezért ezeket a módszereket előnyben részesítik.

A Tengerimalac Maximizációs Módszer (Guinea-Pig Maximisation Test, GMPT) széleskörűen alkalmazott adjuvánt használó vizsgálati módszer. Bár az adott anyag lehetséges szenzibilizáló hatásának a megállapítására számos más módszer is alkalmazható, a GPMT a javasolt, mint adjuváns típusú módszer.

Az adjuvánt nem alkalmazó vizsgálatok (amelyek közül a leginkább a Buehler-teszt javasolt) az általános vélemény szerint sok vegyi anyag csoportnál kevésbé érzékenyek.

Egyes esetekben megfelelő indokok lehetnek az inkább a bőrre történő alkalmazással járó Buehler-teszt választásához, mint a bőrbe történő adagolással járó GPMT módszer választása. A Buehler-teszt használatához tudományos indoklást kell adni.

Ebben a módszerben a GPMT és a Buehler-teszt is le van írva. Más módszer is használható, ha az jóváhagyott és tudományosan megalapozott.

Amennyiben valamely elismert szűrővizsgálat pozitív eredményt ad, a vizsgálati anyagot potenciális allergénnek kell tekinteni, és tengerimalacokon további vizsgálatot nem szükséges végezni. Azonban, ha az ilyen vizsgálat negatív eredménnyel zárul, tengerimalacokon az itt leírt eljárás szerinti vizsgálatot el kell végezni.

Lásd továbbá a B. rész általános bevezetését.

1.2. Fogalommeghatározások

Bőrszenzibilizáció: (allergiás kontakt dermatitisz): az anyag hatására kialakuló, az immunrendszer által közvetített bőrreakció. Embereknél a válasz jellemző tünetei: viszketés, eritéma, ödéma, kiütés, ciszta, hólyag, vagy ezek valamilyen kombinációja. Más fajoknál a válaszok különbözhetnek, és esetleg csak eritéma és ödéma látható.

Indukciós expozíció: kísérleti eljárás, amikor a kísérlet alanyát kiteszik az adott vizsgálati anyag hatásának, azzal a céllal, hogy túlérzékenységet okozzanak.

Indukciós időszak: legalább egyhetes időszak az indukciós expozíció után, mialatt a túlérzékeny állapot kialakulhat.

Kiváltó expozíció (challenge): kísérleti eljárás, amikor az előzetesen kezelt kísérleti alanyt az indukciós időszak után kiteszik a vizsgálati anyag hatásának, hogy megállapítsák, túlérzékeny módon reagál-e.

1.3. Referencia anyagok

A kísérleti eljárás érzékenységét és megbízhatóságát minden hat hónapban meg kell határozni olyan anyagok felhasználásával, amelyeknek ismert gyenge vagy közepes szenzibilizáló hatásuk van.

Ha a vizsgálatot megfelelően végzik, adjuvánt használó módszernél legalább 30 százalékban, adjuvánt nem használó módszernél pedig legalább 15 százalékban jelentkeznie kell a gyenge/közepes válasznak.

A következő anyagok alkalmazása javasolt:

CAS-szám	EINECS-szám	EINECS-megnevezés	közismert név
101-86-0	202-983-3	α -hexil-cinnamaldehyd	α -hexil-cinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (merkaptó-benzotiazol)	kaptax
94-07-7	202-303-5	benzokain	nordkain

Lehetnek olyan körülmények, hogy más referencia anyagok is használhatók, ha azokat megfelelően megindokolják és megfelelnek a fenti követelményeknek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati állatokat először a vizsgálati anyag bőrbe történő beadásával (intradermális alkalmazás) és/vagy a bőrfelszínre helyezve (epidermális alkalmazás) exponálják (indukciós expozíció). A 10–14 napos pihentetési időszak után (indukciós időszak), amely alatt az immunválasz kifejlődhet, a vizsgálati állatok megkapják a kiváltó dózist. A kiváltó (challenge) expozíció hatására kialakuló bőrreakciók kiterjedtségét és mértékét összehasonlítják azokkal a kontroll állatokkal, amelyek színleg ugyanilyen indukciós és kiváltó kezelést kaptak.

1.5. A vizsgálati módszerek leírása

Ha a vizsgálati anyag eltávolítása szükséges, akkor azt vízzel, vagy megfelelő oldószerral kell végezni anélkül, hogy az a meglévő tüneteket módosítaná vagy az epidermiszt megsértené.

1.5.1. Tengerimalac Maximizációs Módszer (GPMT)

1.5.1.1. Előkészületek

Egészséges fiatal felnőtt albínó tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagynak alkalmazkodni a laboratóriumi körülményekhez. A vizsgálat előtt a véletlenszerűen kiválasztott állatokat kezelési csoportokba sorolják. A szőrzet eltávolítását vágással, borotválással vagy esetleg kémiai szőrtelenítéssel végzik, az alkalmazott vizsgálati eljárástól függően. Gondosan el kell kerülni, hogy a bőr megsérüljön. Az állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén és végén megméri.

1.5.1.2. Vizsgálati körülmények

1.5.1.2.1. Vizsgálati állatok

Általánosan használt laboratóriumi törzstenyészethez tartozó albínó tengerimalacokat használnak.

1.5.1.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény állatok egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy egyszer sem szült és nem vemhes legyen.

Legkevesebb 10 állatot kell használni a kezelt csoportban és legkevesebb 5 állatot a kontroll csoportban. Ha kevesebb, mint 20 tengerimalacot használtak a vizsgálati csoportban és kevesebb mint 10-et a kontroll csoportban, valamint nem lehet azt a következtetést levonni, hogy a vizsgált anyag szenzibilizáló hatása, akkor a vizsgálati állatok számát legalább 20-ra, a kontroll csoportban lévő állatok számát legalább 10-re növelve, további kiegészítő vizsgálat elvégzése kifejezetten ajánlatos.

1.5.1.2.3. Dózisszintek

Az indukciós kezeléseknél használt vizsgálati anyag koncentrációja legyen szisztemásan jól tolerálható és a lehető legnagyobb ahhoz, hogy a gyengétől a közepes mértékig terjedő bőrreakciót okozzon. A kiváltó kezelésnél alkalmazott koncentráció legyen a legnagyobb, bőrirritációt még nem okozó dózis. Ha szükséges, akkor a megfelelő koncentrációk két vagy három állaton végzett elővizsgálattal megállapíthatók. Megfontolandó az FCA-val kezelt állatok e célra való felhasználása.

1.5.1.3. Eljárás

1.5.1.3.1. Indukció

0-dik nap – kezelt csoport

Három pár 0,1 ml térfogatú injekciót adnak a bőrbe az előzőleg szőrtelenített válltájékra, olyan módon, hogy minden párból egy a középvonal egyik, egy a másik oldalára esik.

1. injekció: 1:1 keverék (v/v) FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat.

2. injekció: a vizsgálati anyag, megfelelő vivőszerben, a kiválasztott koncentrációban.

3. injekció: a vizsgálati anyag a kiválasztott koncentrációban, FCA/víz vagy fiziológiás sóoldat 1:1 elegyében (v/v) keverve.

A harmadik kezelésnél a vízben oldható anyagokat feloldják a vizes fázisban, mielőtt az FCA-val összekevernék. A vizes fázis hozzáadása előtt a zsírban oldódó, illetve az oldhatatlan anyagokat FCA-ban eloszlatják. A vizsgálati anyag végső koncentrációja megegyezik a 2. befecskendezésnél alkalmazottal.

Az 1. és a 2. injekciót egymáshoz és a fejhez közel adják be, míg a harmadikat a vizsgálati terület farok felé eső részén kell beadni.

0-dik nap – kontroll csoport

Három pár 0,1 ml térfogatú injekciót adnak be a bőrbe, ugyanarra a helyre, mint a kezelt csoport állatainál.

1. injekció: 1:1 (v/v) FCA/víz keveréke, vagy fiziológiás sóoldat.

2. injekció: hígítatlan vivőszer.

3. injekció: 50% vivőszer (m/v) FCA/víz, vagy fiziológiás sóoldat 1:1 keverékében (v/v).

5–7. nap – kezelt és kontroll csoport

Körülbelül 24 órával a bőr felületén történő indukciós kezelés megkezdése előtt, ha az anyag nem okozott bőrirritációt, a vizsgálati területet a szőrzet levágása és/vagy borotválása után 0,5 ml 10 százalékos nátrium-lauril-szulfát vazelines elegyével kezelik, annak érdekében, hogy helyi irritációt okozzanak.

6–8. nap – kezelt csoport

A kezelt területet ismét megtisztítják a szőrzettől. Egy szűrőpapírt (2x4 cm) átitatnak az alkalmas vivőszerbe kevert vizsgálati anyaggal, felhelyezik az intradermálisan kezelt felületre, melyet zárt kötéssel 48 órára lefednek. A vivőszer kiválasztását indokolni kell. A szilárd anyagokat finomra porítják, és a megfelelő vivőszerrel elegyítik. A folyadékok hígítás nélkül is alkalmazhatóak, ha ez megfelelő.

6–8. nap – kontroll csoport

A kezelt területet ismét megtisztítják a szőrzettől. Csak a vivőszert ugyanilyen módon helyezik fel a vizsgálati területre és 48 órára zárt kötéssel lefedik.

1.5.1.3.2. Kiváltás (challenge)

20–22. nap – kezelt és kontroll csoport

A kezelt és a kontroll állatok oldalán a szőrt eltávolítják. A vizsgálati anyagot tartalmazó mintát vagy kamrácskát az állatok törzsének egyik oldalára helyezik, és ha ez indokolt, a csak vivőszert tartalmazó mintát vagy kamrácskát a törzs másik oldalára is felhelyezik. A mintákat 24 órára zárt kötéssel lefedik.

1.5.1.3.3. Megfigyelés és értékelés: kezelt és kontroll csoport

– hozzávetőleg 21 órával a minta eltávolítása után a kiváltási kezelés felületét megtisztítják, a szőrt levágják és/vagy leborotváltják, és ha szükséges, kémiai szőrtelenítést végeznek;

– megközelítőleg 3 órával később (hozzávetőleg 48 órával a kiváltási kezelés után) a bőrreakciókat leolvassák és súlyosságuk szerint a függelékben megadott szempontok szerint értékelik;

– megközelítőleg 24 óra múlva második értékelést is végeznek (72 óra) és ezt is feljegyzik.

Javasolt a kezelt és a kontroll állatok vakon történő értékelése.

Ha szükség van arra, hogy az első kiváltás eredményeit egyértelműbbé tegyék, akkor a második kiváltást (azaz újbóli kiváltást) meg lehet fontolni, indokolt esetben új kontroll csoport beiktatásával, hozzávetőleg egy héttel az első kiváltás után. Az újbóli kiváltást az eredeti kontroll csoporton is el lehet végezni.

A bőrreakciókat és minden nem várt elváltozást, beleértve a szisztémás reakciókat, amit az indukciós és a kiváltó kezelés okozott, le kell olvasni és a Magnusson/Kligman által megadott szempontoknak megfelelően, súlyosságuk szerint értékelve fel kell jegyezni (lásd: Függelék). Egyéb eljárások (pl. kórszövettani vizsgálatok, a bőrredő vastagságának a mérése) is végezhetőek, hogy a kétes reakciókat tisztázzák.

1.5.2. Buehler-vizsgálat

1.5.2.1. Előkészületek

Egészséges fiatal felnőtt albíno tengerimalacokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodni. A vizsgálat előtt az állatokat véletlenszerűen kiválasztva kezelési csoportokba sorolják. A szőrzet eltávolítását, az alkalmazott vizsgálati eljárástól függően vágással, borotválással vagy esetleg kémiai szőrtelenítéssel végzik. Gondosan el kell kerülni, hogy a bőrön sérüléseket okozzanak. Az állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén és a végén megméri.

1.5.2.2. Vizsgálati körülmények

1.5.2.2.1. Vizsgálati állatok

Általánosan használt laboratóriumi törzstenyészethez tartozó albíno tengerimalacokat használnak.

1.5.2.2.2. Az állatok száma és neme

Hím és nőstény állatok egyaránt használhatók. A nőstényeknél követelmény, hogy sohasem szült és nem vemhes legyen.

A kezelt csoportban legkevesebb 20 állatot, a kontroll csoportban pedig legkevesebb 10 állatot használnak.

1.5.1.2.3. Dózisszintek

A vizsgálati anyag koncentrációja minden indukciós kezelésnél legyen az a lehető legnagyobb koncentráció, amelyik csak mérsékelt, de semmi esetre sem rendkívül erős irritációt okoz. A kiváltási expozíciónál használt koncentráció legyen a lehető legnagyobb, irritációt még nem okozó koncentráció. Amennyiben szükséges, akkor a megfelelő koncentrációk két vagy három állaton végzett elővizsgálattal meghatározhatók.

Vízben oldódó vizsgálati anyagoknál vivőszernek a víz, vagy bőrirritációt nem okozó, felületaktív anyagok híg oldata megfelel. Más vizsgálati anyagoknál az indukcióhoz 80% etanol/víz, míg a kiváltáshoz acetont ajánlott.

1.5.2.3. Eljárás

1.5.2.3.1. Indukció

0-dik nap – kezelt csoport

A tengerimalacok törzsének egyik oldalán a szőrt lenyírják. A mintát át kell itatni a megfelelő vivőszerbe kevert vizsgálati anyaggal (a vivőszer kiválasztását indokolni kell, és ha a célnak megfelel, a vizsgálati anyagok hígítás nélkül is alkalmazhatóak).

A vizsgálati területre helyezett vizsgálati mintát fedőréteggel vagy megfelelő kamrácskával lezárják, majd zárt kötéssel 6 órára a bőrhöz rögzítik.

A vizsgálati minta legyen lezárható. Erre a célra kör alakú vagy kb. 4–6 cm² területű szögletes gézpárna alkalmas lehet. A lezárt minta megóvására a mozgás megfelelő eszközzel történő korlátozása javasolt. Ha pólyát alkalmaznak, akkor további expozícióra lehet szükség.

0-dik nap – kontroll csoport

Az állatok egyik oldalán a szőrt lenyírják. A vivőanyaggal történő kezelés azonos módon történik, mint a vizsgálati anyaggal kezelt csoportnál. A vizsgálati területre helyezett vizsgálati mintát fedőréteggel vagy megfelelő kamrácskával lezárják, majd zárt kötéssel 6 órára a bőrhöz rögzítik. Ha bizonyítható, hogy a vizsgálatban színlelt kezelésű kontroll csoportra nincs szükség, akkor természetes kontroll csoport is használható.

6–8. és 13–15. nap – kezelt és kontroll csoport

A 0-dik napon alkalmazott eljárás szerint kell eljárni, ugyanazon a kezelt felületen (szőrvágás, ha szükséges) ugyanazon a szőrtelenített területen a 6–8. napon és megismételve a 13–15. napon.

1.5.2.3.2. Kiváltás (challenge)

27–29. nap – kezelt és kontroll csoport

Az állatok kezeletlen oldaláról mind a kezelt, mind a kontroll csoportban lenyírják a szőrt.

A kezelések a szőrtelenített bőrfelületen történnek a vizsgálati anyag legnagyobb irritációt nem okozó koncentrációjával.

A megfelelő mennyiségű – irritációt még nem okozó legnagyobb koncentrációjú – vizsgálati anyagot tartalmazó lezárt mintát vagy kamrácskát mind a kezelt, mind a kontroll állatoknál a törzs hátsó kezeletlen részére helyezik.

Amennyiben indokolt, a csak vivőszert tartalmazó mintát vagy kamrácskát mind a kezelt, mind a kontroll állatok törzsének elülső kezeletlen felületére helyezik. A mintákat vagy a kamrácskákat megfelelő kötéssel 6 órára a bőrhöz rögzítik.

1.5.2.3.3. Megfigyelés és értékelés:

- a kötés eltávolítása után hozzávetőleg 21 órával a kiváltás kezelési felületét megtisztítják a szőrtől;
- hozzávetőleg 3 órával később (körülbelül 30 órával a kiváltási kezelés után) a bőrreakciókat értékelik és feljegyzik a függelékben megadott fokozati skála szerint;
- hozzávetőleg 24 órával a 30 órás megfigyelés után (nagyjából 54 órával a kiváltási kezelés után) a bőrreakciókat ismét értékelik és feljegyzik.

Javasolt a kezelt és a kontroll állatok vakpróbában történő értékelése.

Ha szükséges az első kiváltási kezelés okozta eredmények pontosítása, akkor nagyjából egy héttel ezután második kiváltási kezelést (azaz újbóli kiváltást) végeznek, szükség esetén új kontroll csoporttal. Az újbóli kiváltási kezelést az eredeti kontroll csoporttal is el lehet végezni.

A bőrreakciókat és minden nem várt elváltozást, beleértve a szisztémás reakciókat, amelyek az indukciós és a kiváltási kezelések okoznak, meg kell figyelni és a Magnusson/Kligman-féle fokozati skála szerint értékelni kell (l. a Függelék). A kétséges reakciók tisztázására egyéb eljárásokat (pl. szövettani vizsgálatok, a bőrredő vastagságmérése) is lehet használni.

2. ADATOK (GPMT ÉS BUEHLER)

Az adatokat táblázatos formában kell összesíteni, ami minden állatnál tartalmazza az egyes megfigyelések alkalmával észlelt bőrreakciókat.

3. JELENTÉS (GPMT ÉS BUEHLER)

Ha a tengerimalac vizsgálat előtt szűrővizsgálatot végeznek, akkor a vizsgálat leírását vagy a hivatkozást [pl. helyi nyirokcsomó vizsgálati módszer (LLNA), egér fülödema vizsgálat (MEST)], beleértve az eljárás részleteit is, meg kell adni a kapott eredményekkel és a vizsgálatnál használt referencia anyaggal együtt.

Vizsgálati jelentés (GPMT ÉS BUEHLER)

Az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor.

A vizsgálati jelentésnek – amennyiben lehetséges – a következő információkat kell tartalmazni:

Vizsgálati állatok:

- az alkalmazott tengerimalac törzs;
- az állatok száma, kora és neme;
- származás, tartási körülmények, takarmányozás, stb.

Vizsgálati körülmények:

- a kezelt vizsgálati terület előkészítésének módja;
- a kezelésnél használt minta anyagának és a minta felhelyezésének a módja;
- az elővizsgálat eredménye, a vizsgálatban alkalmazott indukciós és kiváltó koncentrációk indoklásával;
- a vizsgálati anyag előkészítésének, alkalmazásának és eltávolításának részletei;
- a vivőszer kiválasztásának indoklása;
- a vivőszer és a vizsgálati anyag koncentrációja az indukciós és a kiváltó kezelésnél, és az indukciónál és a kiváltásnál felhasznált teljes anyagmennyiség.

Eredmények:

- a vizsgálat érzékenysége és megbízhatóságának a legutolsó ellenőrzése (1. az 1.3. pontot), beleértve az anyagra, a koncentrációra és a vivőszerre vonatkozó adatokat is;
- egyedi adatok minden egyes állatra, a reakciók súlyosság szerinti értékelésére használt rendszer szerint;
- a megfigyelt elváltozások természetének és fokának beszámoló jellegű leírása;
- bármely kórszövettani lelet.

Az eredmények megvitatása.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

Ez a módszer analóg az OECD TG 406-tal.

Függelék

Táblázat: Magnusson/Kligman-féle skála a kiváltási reakciók értékelésére

Pont		
0	=	nincs látható változás
1	=	különálló vagy foltos eritéma
2	=	mérsékelt és összefüggő eritéma
3	=	élénk eritéma és duzzanat

B.7. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAP) TOXICITÁS (ORÁLIS)**1. MÓDSZER****1.1. Bevezetés**

Lásd a B. rész általános bevezetését.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd a B. rész általános bevezetését.

1.3. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot szájon keresztül adják be a kísérleti állatoknak naponta, fokozatosan emelkedő dózisokban. Minden csoportnál egy dózisszintet használnak 28 napon keresztül. Az adagolás időszaka alatt az állatokat gondosan figyelik, beleértve a toxikus tünetek megfigyelését is. A vizsgálat ideje alatt elpusztult, illetve a kiírtott állatokat felboncolják, a vizsgálat befejezése után a túlélő állatokat szintén kiírtják és felboncolják.

Ez a módszer nagyobb hangsúlyt fektet az idegrendszeri hatásokra mint más speciális végpontra, és a lehető legtöbb információ megszerzése érdekében kiemeli az állatok gondos klinikai megfigyelésének a szükségességét. A módszerrel azonosítani kell a neurotoxikus hatással rendelkező anyagokat, ami további alaposabb, ilyen irányú vizsgálatot indokolhat. Mindezek mellett a módszer utalhat az immunológiai és a reprodukciós szervekre kifejett toxikus hatásokra is.

1.4. A vizsgálati módszer leírása**1.4.1. Előkészületek**

Egészséges fiatal felnőtt állatokat véletlenül kiválasztva kezelt, illetve kontroll csoportba sorolnak. A ketrecek úgy kell elhelyezni, hogy a ketrec elhelyezéséből adódó lehetséges hatások a lehető legkisebbek legyenek. Az állatokat

az egyedi azonosíthatóság céljából megjelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a ketrecükben tartják, hogy a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodjanak.

A vizsgálati anyagot gyomorszondán át, a táplálékkal vagy az ivóvízzel adják be. A szájon keresztüli beadásmód a vizsgálat céljától és az anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ.

Ha szükséges, a vizsgálati anyagot valamely erre alkalmas vivőszerben feloldják vagy eloszlatják. Amennyiben lehetséges, ajánlatos, hogy először vizes oldat/szuszpenzió készítését vegyék számításba, majd olajos oldat/emulzió következik (pl. növényolaj), és más vivőszer csak ezután jön szóba. Amennyiben a vivőszer nem víz, akkor ismerni kell a vivőszer esetleges mérgező hatását. A vizsgálati anyag stabilitását a vivőszerben meg kell határozni.

1.4.2. Vizsgálati körülmények

1.4.2.1. Vizsgálati állatok

A patkány az előnyben részesített rágcsáló faj, de más rágcsálót is lehet használni. Általánosan használt, laboratóriumi törzsekől származó fiatal felnőtt állatokat kell használni. A nőstényeknél követelmény, hogy egyszer sem szült és nem vemhes legyen. Az adagolást az elválasztás után a lehető leghamarabb, de mindenképpen az állatok kilenches kora előtt kell megkezdeni.

A vizsgálat kezdetekor az állatok testtömegének az átlagtól való eltérése legyen a lehető legkisebb, és az egyes nemeknél ez ne haladja meg a 20 százalékot.

Ha az ismételt adagolású vizsgálatot a hosszabb időtartamú vizsgálat előzetes vizsgálatként végzik, akkor lehetőség szerint mind a két vizsgálatot ugyanabból a fajtából és családból származó állatokkal kell végezni.

1.4.2.2. Az állatok száma és neme

Minden dózisszintnél legalább 10 állatot (5 hím és 5 nőstényt) kell használni. Ha közbenső kiértékeléseket terveznek, akkor az állatok számát meg kell növelni a tervezett közbenső kiértékelések számával, még a vizsgálat befejezése előtt.

Ezenkívül 28 napon át a legmagasabb dózisszinten egy 10 állatból álló (5 állat nemenként) kísérő csoportot is lehet kezelni, hogy a 14 napos utómegfigyelés alatt a toxikus hatások reverzibilitását, tartósságát vagy a késői toxikus hatások előfordulását meg lehessen figyelni. Ehhez egy 10 állatot tartalmazó (5 állat nemenként) kontroll csoportra is szükség van.

1.4.2.3. Dózisszintek

Szokásosan 3 kezelt csoportot és egy kontroll csoportot kell használni. A vizsgálati anyaggal való kezelés kivételével a kontroll csoportban lévő állatokat ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Ha vivőszert használnak a vizsgálati anyag beadásához, akkor a kontroll csoportnak a vivőszert a legnagyobb alkalmazott térfogatban kell adagolni.

Ha egyéb adatok alapján nem várható hatás az 1000 mg/testtömeg kg/nap dózis beadása után, akkor határérték vizsgálatot (limit-teszt) lehet végezni. Ha nem állnak rendelkezésre megfelelő adatok, akkor az alkalmazni kívánt dózisos meghatározására dózistartomány kereső elővizsgálatot lehet végezni.

A dózisszintek megállapításánál figyelembe veszik a vizsgálati vagy azzal rokon anyagok rendelkezésre álló toxikológiai és (toxiko)kinetikai adatait. A legmagasabb dózisszintet úgy kell megválasztani, hogy az toxikus tüneteket okozzon, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést. Ezután a dózisszinteket fokozatosan csökkenteni kell, hogy megállapítsák a dózisos és az azokra kapott reakciók vagy a legalacsonyabb dózisszint és a nem észlelhető káros hatás szintje (NOAEL) közti összefüggést. Kétszerestől négyszeresig terjedő különbségek általában alkalmasak a csökkenő dózisszintek megállapítására, és egy negyedik vizsgálati csoport beiktatása is gyakran tanácsos, nagyon nagy dózisszintbeli különbség (pl. több mint tízszeres) alkalmazásával.

A takarmánnyal vagy ivóvízzel beadandó anyagoknál fontos, hogy a vizsgálati anyag adott mennyiségei ne befolyásolják a természetes táplálkozást és a vízháztartást. Ha a vizsgálati anyagot a takarmányba keverve adják be, akkor vagy állandó koncentrációt (ppm) használnak a takarmányra vonatkoztatva, vagy állandó dózisszintet alkalmaznak, amit az állatok testtömegére számítva adnak meg; az eltérő módszert jelezni kell. A gyomorszondán keresztül beadott anyagnál a dózist mindennap azonos időben kell beadni, és szükség szerint úgy kell megállapítani, hogy a dózisszint az állat testtömegére vonatkoztatva állandó maradjon.

Ahol az ismételt adagolású vizsgálatot a hosszú időtartamú vizsgálat elővizsgálatként végzik, ott mindkét vizsgálatban ugyanolyan adagolási módot kell használni.

1.4.2.4. Határérték vizsgálat (limit teszt)

Ha az ebben az eljárásban leírt módszer szerint az egyetlen dózisszinten végzett vizsgálatot legalább 1000 mg/testtömeg kg/nap dózissal végezték, vagy az ezzel egyenértékű mennyiséget a takarmányba keverve, vagy az ivóvízzel adták be (a testtömegre számítva), és ez nem okozott észlelhető toxikus tüneteket, továbbá a hasonló szerkezetű anyagok vizsgálatából származó adatok szerint mérgező hatásra nem kell számítani, akkor a három dózisszinten végzett teljes vizsgálat nem feltétlenül szükséges. Kivételesen határérték vizsgálat végezhető akkor, ha a humánexpozíció magasabb dózisszinten végzett vizsgálatot igényel.

1.4.2.5. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszak 28 nap. A kísérő csoportban lévő állatokat, amelyekkel további megfigyeléseket terveznek, még legalább 14 napig kell kezelés nélkül tartani, hogy a késői toxikus hatások előfordulását vagy tartósságát, vagy a felépülést a mérgezésből megfigyeljék.

1.4.3. Eljárás

Az állatoknak a vizsgálati anyagot naponta kell adagolni, a hét mindegyik napján, összesen 28 napig; a heti ötnapos adagolást külön meg kell indokolni. Ha a vizsgálati anyagot a gyomorba adják, akkor azt egyszeri dózisban kell beadni, gyomorszonda vagy alkalmas nyelőcső szonda segítségével. Az egyszerre beadható folyadék legnagyobb mennyisége a vizsgálati állat méretétől függ. A térfogat ne haladja meg az 1 ml/100 testtömeg g mennyiséget; kivéve a vizes oldatokat, amelyek 2 ml/100 testtömeg g mennyiségben is beadhatók. Az irritatív vagy maró hatású anyagokat kivéve, amelyeknél a töménység növelése általában a hatások súlyosbodásához vezet, a térfogatok közti eltérést a koncentráció esetenkénti beállításával a lehető legkisebbre kell csökkenteni, hogy minden dózisonk állandó legyen a térfogata.

1.4.3.1. Általános megfigyelések

A klinikai tüneteket mindennap, naponta legalább egyszer és lehetőleg ugyanazon időpont(ok)ban kell megfigyelni, tekintetbe véve az adagolás után várható hatás csúcspontjának az idejét. Az állatok általános állapotáról feljegyzéseket kell készíteni. Naponta legalább kétszer minden állatot meg kell figyelni, hogy nem betegek-e vagy nem pusztultak-e el. A haldokló (moribund) állatokat és súlyosan szenvedő, vagy fájdalommal küszködő állatokat el kell különíteni, humánusan ki kell írtani, majd fel kell boncolni.

Egyszer, az első expozíció előtt (az állatot önmagához hasonlítják), és azután hetente legalább egyszer, minden állaton részletes klinikai vizsgálatot kell végezni. Ezeket a vizsgálatokat az állat saját ketrecén kívül, standard körülmények között kell végezni, lehetőleg minden alkalommal ugyanabban az időben. A megfigyeléseket gondosan fel kell jegyezni, lehetőleg pontozásos értékelő rendszer segítségével, amelyet a vizsgáló laboratórium világosan meghatároz. Arra kell törekedni, hogy a vizsgálati körülmények csak minimális mértékben változzanak és a megfigyeléseket lehetőség szerint olyanok végezzék, akik az alkalmazott kezelést nem ismerik. A megfigyeléseknek ki kell térniük a bőr, szőrzet, szemek, nyálkahártya elváltozásaira, a váladékképzésre és a kiválasztásra, valamint a vegetatív tünetekre (pl. könnyezés, a szőrzet állapota, pupillaméret, szokatlan légzés), de nem korlátozódhatnak csupán ezekre. A járásban, a testtartásban bekövetkezett változásokat, valamint a kezelés alkalmával észlelt reakciókat, továbbá a klónusos és tónusos görcsöket, sztereotípiákat (pl. túlzott vakarózás, ismétlődő körbeszaladgálás) vagy a rendellenes viselkedést (pl. öncsonkítás, hátrafelé járás) szintén fel kell jegyezni.

A megfigyelés negyedik hetében vizsgálni kell a különböző ingerekkel (pl. hang-, látás- és proprioceptív ingerek) kiváltott reakciókat, az izomerőt és a motoros aktivitást. Az alkalmazható vizsgálatok további részletei az irodalomban találhatóak (lásd B. rész Általános Bevezetés).

Ha a megfigyelés negyedik hetében a vizsgálatot az azt követő szubkrónikus (90 napos) vizsgálat előzetes vizsgálatoként végzik, a funkciók megfigyelését el lehet hagyni. Ebben az esetben a szervezet funkcióinak az ellenőrzését az útvizsgálatok során kell végezni. Másrészt a szervezet funkcióinak a megfigyelése az ismételt adagolású vizsgálatban elősegíti a dózisok kiválasztását az azt követő szubkrónikus vizsgálatához.

Kivételes esetekben a szervezet funkcióinak a megfigyelését azoknál a csoportoknál el lehet hagyni, amelyeknél olyan erős toxikus tünetek jelentkeznek amelyek a funkcionális teljesítményt jelentősen befolyásolják.

1.4.3.2. Testtömeg és táp-/vízfogyasztás

Hetente legalább egyszer minden állat testtömegét meg kell mérni. A táp- és vízfogyasztást hetente legalább egyszer kell megmérni. Amennyiben a vizsgálati anyagot az ivóvízzel adják be, akkor hetente legalább egyszer az ivóvíz fogyasztását is mérni kell.

1.4.3.3. Hematológia

A vizsgálati időszak végén a következő hematológiai vizsgálatokat kell elvégezni: hematokrit, hemoglobin-koncentráció, vörösvértest-szám, fehérvérsejt-szám és minőségi vérkép, vérlemezke-szám (trombocitaszám) és a véralvadási idő mérése.

A vérmintákat meghatározott helyről kell venni, közvetlenül az állatok kiírtása előtt, vagy aközben, és megfelelő körülmények között kell tárolni.

1.4.3.4. Klinikai kémia

A szövetekre, és különösen a vesékre és a májra gyakorolt jelentősebb toxikus tünetek felderítésére minden állatnál meg kell határozni a klinikai kémiai paramétereket abból a vérből, melyet az állatoktól közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt, vagy a vizsgálat alatt az állatok kiírtásakor (kivéve a moribund, vagy az időközben valamilyen közbejött ok miatt kiírtott állatokat) vettek. A vérvétel előtt ajánlatos az állatokat éjszaka koplaltatni¹. A vérszérum és a vérplazma vizsgálata magába foglalja a nátrium, a kálium, a glükóz, a teljes koleszterin, a karbamid, a kreatinin, a teljes fehérje és albumin, valamint legalább két májfunkciót jelző enzim (pl. az alanin aminosztransferáz, aszpartát aminosztransferáz,

¹ Ajánlatos az éjszakai koplalás számos méréshez a vérsavóban (szérum) és vér folyadékban (plazma), főképpen a glükóz tekintetében. A fő oka ennek a javaslatnak a megnövekedett szórás – ami elkerülhetetlen a koplaltatás hiánya esetén – elfedi a kisebb hatásokat, és megnehezíti az eredmények értékelését. Másrészt azonban, az éjszakai koplaltatás kölcsönhatásban lehet az állatok általános anyagcserejével, és különösen az etetéses vizsgálatoknál zavarhatja a vizsgálati anyag napi bevitelét. Ha alkalmazzák az éjszakai koplaltatást, akkor a klinikai biokémiai meghatározásokat a vizsgálat 4. hetében végzett, a szervezet működésével kapcsolatos (funkcionális) megfigyelések után végzik.

alkáli-foszfátáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz és szorbitol dehidrogenáz) meghatározását. További (máj vagy egyéb eredetű) enzimek és az epesavak mérése bizonyos esetekben hasznos ismereteket adhat.

A vizsgálat utolsó hetében, időre mért vizeletgyűjtéssel, lehetőség van a következő vizeletparaméterek meghatározására: külső megjelenés, térfogat, ozmolalitás, vagy sűrűség, pH, fehérje, glükóz, és vér/vérsejtek.

Emellett megfontolható az általános szöveti károsodásra utaló szérummutatók vizsgálata. Más vizsgálatokat is el kell végezni, ha a vizsgálati anyagnak ismert vagy feltételezhető hatása van az azokhoz kapcsolódó anyagcsere-folyamatokra; ilyen pl. a kalcium, a foszfát, a triglicerid, egyes hormonok, a methemoglobin és a kolinészteráz aktivitás mérése. Ezek szükségességét az egyes osztályokba sorolt anyagok szerint, vagy alkalmankénti megfontolás alapján határozzák meg.

Általánosságban rugalmasságra van szükség, ami az állat és az adott anyag megfigyelt és/vagy várt hatásaitól függ.

Ha a történelmi adatok nem alkalmasak, akkor az adagolás megkezdése előtt meg kell fontolni a hematológiai és klinikai kémiai paraméterek meghatározását.

1.4.3.5. Kórboncolás

Minden állaton teljes, részletes kórboncolást kell végezni, ami a test külső felületének, minden nyílásnak, illetve a koponya, a mellkas és a hasüreg, valamint azok tartalmának gondos vizsgálatából áll. Minden állat máját, veséit, mellékveséit, heréit, mellékheréit, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét – ahol lehet – megtisztítják az azt körülvevő szövetektől, és meg kell mérni azok nedves tömegét a kivágás után, a száradás elkerülése érdekében olyan hamar, amilyen hamar csak lehet.

A szövetek típusának és a tervezett kórszövettani vizsgálatnak megfelelő fixálószerben a következő szöveteket kell megőrizni: a jelentősebben sérült részeket, az agyat (jellemző részeket, mint pl. a nagyagy, a kisagy, a nyúltagyi híd), a gerincvelőt, a gyomrot, a vékony- és vastagbelet (beleértve a Peyer plakkokat), a májat, a veséket, a mellékveséket, a lépét, a szívét, a csecsemőmirigyét, a pajzsmirigyét, a légsöveget és a tüdőt (utóbbit először megtöltik a tartósítószerrel, és úgy merítik alá), az ivarmirigyeket, a járulékos nemi szerveket (pl. a méhet, a prosztátát), a húgyhólyagot, nyirokcsomókat (lehetőleg egy nyirokcsomót, ami a beadás útvonalába esik, és a szisztémás hatások megtétele miatt egy másik nyirokcsomót a beadás útvonalától távol), perifériás ideget (ülőideg, vagy sípcsonti ideg), lehetőleg az izom közvetlen közeléből, valamint a csontvelő egy részét (vagy helyette frissen nyert csontvelőt). A klinikai és egyéb megfigyelések más szövetek vizsgálatának a szükségességére is utalhatnak. Továbbá minden olyan szervet meg kell őrizni, amely az anyag ismert tulajdonságai alapján lehetséges célszervnek vélhető.

1.4.3.6. Kórszövettani vizsgálatok

Mind a kontroll, mind a nagy dózissal kezelt csoportban minden állat megőrzött szervein és szövetein teljes körű kórszövettani vizsgálatot kell végezni. Ezeket a vizsgálatokat kiterjeszthetik minden más dóziscsoportra, ha kezelésnek tulajdonítható elváltozást észlelnek a nagy dózissal kezelt csoportban.

Minden kóros elváltozást meg kell vizsgálni.

Ha kísérő csoportot használnak, akkor abban csak azokon a szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatokat végezni, amelyeken a kezelt csoportban elváltozást észleltek.

2. ADATOK

Az adatokat minden állatra külön kell megadni. Emellett minden adatot táblázatos formában összesíteni kell, amely minden vizsgálati csoportnál tartalmazza az alkalmazott állatok számát a vizsgálat elején, a vizsgálat alatt elpusztult vagy humánus megfontolásokból kiírtott állatok számát, a mérgezési tüneteket mutató állatok számát, a megfigyelt toxikus tünetek leírását, beleértve az egyes toxikus hatások megjelenésének időpontját, időtartamát és súlyosságát, a megbetegedett állatok számát, az elváltozások típusát és az elváltozást mutató állatok százalékos arányát.

Amennyiben lehetséges, akkor a számértékkel megadott eredményt megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel értékelni kell. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell kiválasztani.

3. JELENTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek – amennyiben lehetséges – a következő információkat kell tartalmazni:

Vizsgálati állatok:

- alkalmazott faj/törzs;
- az állatok száma, kora és neme;
- származás, tartási körülmények, takarmány stb.;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetekor, majd hetente és a vizsgálat végén.

Vizsgálati körülmények:

- a vivőszer választás indoklása, ha az nem víz;
- a dózisszint megválasztásának indoklása;
- a vizsgálati anyag beadási formája, a takarmányba keverés előkészítésének részletei, az elért koncentráció, a készítmény stabilitása és homogenitása;
- a vizsgálati anyag beadására vonatkozó adatok;
- átszámítás a vizsgálati anyagnak a takarmányban/ivóvízben lévő koncentrációjáról (ppm) a tényleges dózissra (mg/testtömeg kg/nap), ha ez alkalmazható;
- a takarmány és az ivóvíz minőségére vonatkozó adatok.

Eredmények:

- testtömeg/testtömeg változások;
- tápfogyasztás és vízfogyasztás, ha lehetséges;
- a toxikus hatásra vonatkozó adatok nemeként és dózisszintenként, beleértve a toxikus tüneteket;
- a klinikai tünetek természete, súlyossága és időtartama (reverzibilisek-e vagy nem);
- a szenzoros funkciók, az izomerő és motoros aktivitás vizsgálati adatai;
- hematológiai vizsgálatok a megfelelő normál értékekkel;
- klinikai biokémiai vizsgálatok, a megfelelő normál értékekkel;
- testtömeg a kiírtáskor és a szervek tömege;
- boncolási leletek;
- minden kórszövettani elváltozás részletes leírása;
- a felszívódásra vonatkozó adatok, ha vannak;
- az eredmények statisztikai feldolgozása, ha szükséges.

Az eredmények megvitatása.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

Ez a módszer analóg az OECD TG 407-tel.

B.8. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAP) TOXICITÁS (INHALÁCIÓ)**1. MÓDSZER****1.1. Bevezetés**

Hasznos lehet, ha az anyag részecske méret eloszlásáról, göznyomásáról, olvadáspontjáról, forráspontjáról, lobbanáspontjáról, illetve esetleges robbanásveszélyességéről előzetes információink vannak. Lásd még az Általános Bevezetés B. részét (A).

1.2. Fogalom meghatározások

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (B).

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Több csoport kísérleti állatot naponta meghatározott ideig exponáljuk a vizsgálati anyaggal, fokozatosan növekvő koncentrációkat használva, csoportonként egy koncentrációt használva, 28 napon keresztül. Amennyiben vivőszert használunk a vizsgálati anyag megfelelő koncentrációjának az előállításához a légtérben, úgy vivőszer kontroll csoportot is használni kell. Annak érdekében, hogy a toxicitás tüneteit észlelni lehessen, az állatokat a kezelés időszaka alatt naponta figyelni kell. A vizsgálati időszak alatt elhullt állatokat fel kell boncolni. A vizsgálat befejezésekor a még életben lévő állatokat szintén fel kell boncolni.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat megkezdését megelőzően legalább öt napig a kísérlet tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. A vizsgálat megkezdése előtt az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kiválasztva a megfelelő csoportokba kell sorolni. Szükség esetén a vizsgálati anyaghoz megfelelő vivőszert lehet adni, hogy meg lehessen teremteni a megfelelő vizsgálati anyagkoncentrációt a légtérben. Amennyiben az adagolás megkönnyítésére vivőszert vagy egyéb segédanyagot használnak, úgy azt annak az ismeretében kell tenni, azoknak nincs toxikus hatásuk. Megfelelő történelmi adatok felhasználhatók, ha alkalmasak.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

1.6.2.1. Kísérleti állatok

Ellenjavallat hiányában a patkány az előnyben részesített állatfaj. Általánosan használt laboratóriumi törzsekhez tartozó egészséges fiatal állatokat kell használni.

A vizsgálat megkezdésekor az állatok testtömege nemenként maximum $\pm 20\%$ -kal térhet el a megfelelő átlagértéktől.

1.6.2.2. Az állatok száma és neme

Minden egyes vizsgálati csoportban legalább tíz állat (öt hím és öt nőstény) szükséges. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni. Amennyiben állatok vizsgálat közbeni kiirtását tervezik, úgy az alkalmazott állatok számát meg kell növelni a vizsgálat befejezése előtt kiírtani tervezett állatok számával. Ezenkívül egy tíz (nemenként öt-öt) állatból álló kiegészítő csoport kezelhető a magas koncentrációsinten 28 napon át, majd a kezelést követően 14 napig megfigyelés alatt tartható a toxikus hatások visszafordíthatóságának, tartósságának, illetve késleltetett jellegének a megfigyelésére. Egy tíz (nemenként öt-öt) állatból álló kontroll kiegészítő csoportra is szükség van.

1.6.2.3. Expozíciós koncentráció

Legalább három különböző koncentrációra, és ha vivőszert használnak, külön vivőszert kontrollra (a legnagyobb vivőszert koncentrációban) is szükség van. A kontroll állatokat – a vizsgálati anyaggal történő kezelést leszámítva – a vizsgálati csoportokban lévő állatokkal teljesen megegyező módon kell kezelni. A legnagyobb koncentrációt úgy kell megállapítani, hogy az toxikus hatásokat okozzon, de elhullást ne, vagy csak kevés esetben. A legkisebb koncentrációt úgy kell megállapítani, hogy az ne okozzon toxicitásra utaló tüneteket. Amennyiben a humán expozícióra használható becslés áll rendelkezésre, úgy a legkisebb koncentrációnak ennél nagyobbak kell lennie. A középső koncentrációnak ideális esetben csak minimális megfigyelhető toxikus tüneteket kellene okozni. Amennyiben egynél több közbülső koncentrációt használnak, úgy ezeket egymáshoz képest úgy kell megállapítani, hogy a toxikus hatás lépcsőzetesen fokozódjon. A kis és közbülső koncentrációkkal exponált csoportokban, illetve a kontroll csoportban az elhullások előfordulási gyakoriságának kicsinek kell lenni, hogy az eredményeket megfelelően értékelni lehessen.

1.6.2.4. Az expozíció időtartama

A napi expozíció időtartama hat óra, de az esetleges speciális követelmények miatt az expozíció időtartama ettől eltérhet.

1.6.2.5. Berendezés

Az állatokat olyan berendezésben kell vizsgálni, amelyikben állandó dinamikus levegőáramlással tizenkétszeres légcseré biztosítható annak érdekében, hogy az oxigéntartalom megfelelő, s az anyag eloszlása a légtérben egyenletes legyen. Ha belélegeztető kamrát használnak, azt úgy kell megtervezni, hogy abban a vizsgálati állatok a lehető legkisebb mértékben zsúfolódjanak össze és a feltételek legyenek a lehető legjobbak a vizsgálati anyag belégzéséhez. A kamra légterének stabilitása érdekében általános szabályként a vizsgálati állatok össztérfogata ne haladja meg a kamra térfogatának 5%-át. Száj-orr, csak fej, és egyedi teljes test kamrás expozíció egyaránt alkalmazható; az első két módszer elősegíti, hogy a vizsgálati anyag egyéb úton csak minimális mennyiségben jusson be a szervezetbe.

1.6.2.6. Megfigyelési időszak

A kísérleti állatokat a teljes kezelési és felépülési időszak alatt naponta meg kell figyelni, hogy a toxicitás jeleit észlelni lehessen. Az elhullások időpontját, valamint a toxicitás tüneteinek megjelenési és megszűnési idejét fel kell jegyezni.

1.6.3. Eljárás

Az állatokat a vizsgálati anyaggal naponta kell exponálni, hetente öt vagy hét alkalommal, 28 napon keresztül. Az utómegfigyelés céljából esetlegesen alkalmazott kiegészítő csoport állatait további 14 napig kell kezelés nélkül tartani, hogy a mérgezésből való felépülést, illetve a toxikus hatás tartósságát nyomon lehessen követni. A vizsgálat során a hőmérsékletet 22 ± 3 °C-on kell tartani. Arra kell törekedni, hogy a relatív páratartalom 30% és 70% között legyen, de bizonyos esetekben (pl. egyes aeroszolk vizsgálatánál) előfordulhat, hogy ez nem valósítható meg. Enyhe negatív

nyomás (≤ 5 mm víz) fenntartásával a kamrában megakadályozható a vizsgált anyag kiszivárgása a környezetbe. Az expozíció alatt táp és víz nem adható az állatoknak.

Az analitikai koncentráció ellenőrzésére megfelelő dinamikus inhalációs rendszert kell használni. A megfelelő expozíciós koncentráció beállításához elővizsgálat javasolt. A levegőáramlást úgy kell beállítani, hogy ezáltal biztosítani lehessen a légtér homogenitását az expozíciós kamrában. A rendszerben a stabil expozíciós körülményeket a lehető legrövidebb idő alatt kell elérni.

Az alábbi változókat kell mérni vagy monitorozni:

a) A levegőáramlás sebességét (folyamatosan);

b) A vizsgálati anyagnak a légzési zónában mért tényleges koncentrációját. A napi expozíció időtartama alatt a koncentráció nem ingadozhat több mint $\pm 15\%$ -kal az átlagértékhez képest. Egyes aeroszoloknál azonban előfordulhat, hogy a koncentráció ilyen mértékű beállása nem valósítható meg; ilyen esetekben szélesebb koncentráció tartomány is elfogadható. A vizsgálat teljes időtartama alatt a napi koncentrációkat olyan állandó szinten kell tartani, amennyire csak lehet. Aeroszoloknál vizsgálati csoportonként legalább hetente egyszer részecske méret meghatározást kell végezni;

c) A hőmérsékletet és a páratartalmat, folyamatosan, ha lehetséges.

Az expozíció közben, és azt követően az állatokat rendszeresen meg kell figyelni és ezt rögzíteni kell; minden egyes állatról külön feljegyzést kell készíteni. Valamennyi állatot naponta meg kell figyelni és a toxicitásra utaló tüneteket rögzíteni kell, beleértve megjelenésük időpontját, súlyosságukat és időtartamukat. A megfigyeléseknek ki kell terjedniük a bőr, a szőrzet, a szemek és nyálkahártyák elváltozásaira, továbbá a légző-, a keringési-, az autonóm és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomato-motoros aktivitás és a viselkedés változásaira. Az állatok testtömegét hetente meg kell mérni, és szintén javasolt az állatok tápfogyasztásának hetente történő mérése. Az állatokat rendszeresen figyelni kell, hogy a vizsgálatból ne essenek ki olyan okok miatt, mint pl. kannibalizmus, a szövetek autolízise vagy az állatok elkeveredése. A vizsgálat végén a kiegészítő csoportok állatait kivéve valamennyi kezelt csoport életben maradt állatait fel kell boncolni. A haldokló (moribund), valamint a súlyos szenvedés illetve fájdalom jeleit mutató állatokat ki kell emelni a csoportból, humánus módon ki kell írtani, majd fel kell boncolni.

A vizsgálati időszak végén valamennyi állaton – beleértve a kontroll állatokat is – az alábbi vizsgálatokat kell elvégezni:

(i) hematológia, beleértve legalább a hematokrit, hemoglobinn koncentráció, vörösvértestszám, fehérvérsejtszám és minőségi vérkép, valamint az alvadási képesség meghatározását;

(ii) klinikai kémia vizsgálatok, beleértve a máj- és vesefunkció legalább egy paraméterét: szérumban alanin-aminotranszferáz (korábbi nevén glutamát piruvát-transzamináz), szérumban aszpartát aminotranszferáz (korábbi nevén glutamát oxálecetsav transzamináz), karbamid nitrogén, albumin, vér kreatinin, össz-bilirubin és szérumban összfehérje mérését;

A megfelelő toxikológiai elemzéshez szükség lehet még a kalcium, foszfor, klorid, nátrium, kálium, éhgyomri glükóz értékének, illetve a lipidek, hormonok, sav/bázis egyensúly, methemoglobin és kolinészteráz aktivitás meghatározására. Az észlelt hatások további vizsgálatára szükség esetén további klinikai kémiai vizsgálatok végezhetők.

1.6.3.1. Boncolás

A vizsgálatban résztvevő valamennyi állatot fel kell boncolni. Legalább a máj, a vesék, a mellékvesék, a tüdő és a herék tömegét kell megmérni nedves állapotban a boncolást követő lehető legrövidebb időn belül, hogy a kiszáradást el lehessen kerülni. A szerveket és szöveteket (a légutak, máj, vesék, lép, herék, mellékvesék, szív, és valamennyi egyéb szerv, amelyen kóros elváltozások vagy méretváltozás figyelhető meg) az esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljából megfelelő fixálószerben kell megőrizni. A tüdőt épségben kell kiemelni, tömegét meg kell mérni, majd a tüdőszerkezet megóvása érdekében megfelelő fixálószerrel kell kezelni.

1.6.3.2. Kórszövettani vizsgálat

A nagy koncentrációval exponált csoport és a kontroll csoport(ok) állatainál a fixált szerveken és szöveteken szövettani vizsgálatot kell végezni. Azokat a szerveket és szöveteket, amelyeken a legnagyobb koncentrációval exponált csoport állatainál vizsgálati anyagnak tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, valamennyi kisebb koncentrációval exponált csoportnál is meg kell vizsgálni. Az esetlegesen alkalmazott kiegészítő csoportok állatainál is kell szövettani vizsgálatot végezni, külön figyelmet fordítva azokra a szervekre és szövetekre, amelyeken a többi kezelt csoportnál is észlelték az elváltozásokat.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összesíteni, minden egyes vizsgálati csoportnál feltüntetve az állatok számát a vizsgálat megkezdésekor, valamint a különböző típusú elváltozásokat mutató állatok számát.

Valamennyi eredményt megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer alkalmazható.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jelentésnek az alábbi adatokat kell tartalmazni:

- faj, törzs, származás (forrás), környezeti körülmények, takarmányozás, stb.;
- vizsgálati körülmények.

Az expozícióhoz használt berendezés leírása, beleértve a kialakítását, típusát, méreteit, a levegőforrást, az aeroszolok előállítására használt rendszert, a légkondicionálás módszerét, a távozó levegő kezelését, valamint a kísérleti állatoknak a vizsgálati kamrában – amennyiben ilyen alkalmaznak – történő elhelyezésének módját. Le kell írni a páratartalom, valamint az aeroszol koncentráció stabilitása és részecske méret eloszlás meghatározására használt berendezéseket.

Expozíciós adatok:

Ezeket táblázatos formában kell összesíteni, megadva az átlagértékeket, és a szórás mértékét (pl. standard deviáció), továbbá – amennyiben lehetséges – az alábbi adatokat:

- a) az inhalációs berendezésen egységnyi idő alatt átáramló levegő mennyisége;
 - b) a levegő hőmérséklete és páratartalma;
 - c) a névleges (nominális) koncentráció (az inhalációs berendezésbe adagolt vizsgálati anyag teljes mennyisége osztva a levegő térfogatával);
 - d) a segédanyag természete, amennyiben ilyet használtak;
 - e) a légzési zónában mért tényleges koncentráció;
 - f) a tömegfelelő aerodinamikai átmérő (MMAD), és a geometrikus standard deviáció (GSD);
- a toxikus tünetekre vonatkozó adatok az állatok neme és a koncentráció szerint;
 - az elhullás időpontja a vizsgálat alatt vagy a továbbélő állatok kiirtásának időpontja;
 - a toxikus vagy egyéb hatások leírása; hatástalan szint;
 - valamennyi abnormális tünet megfigyelésének időpontja, és az ezt követő időbeli lefolyása;
 - a tápfogyasztásra és testtömegre vonatkozó adatok;
 - az alkalmazott hematológiai vizsgálatok és a vizsgálati eredmények;
 - az alkalmazott klinikai kémiai vizsgálatok és a vizsgálati eredmények;
 - boncolási leletek;
 - valamennyi kórszövettani lelet részletes leírása;
 - az eredmények megfelelő statisztikai értékelése, ahol lehetséges;
 - az eredmények megvitatása;
 - az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (H).

B.9. ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ (28 NAP) TOXICITÁS (DERMÁLIS)

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (A).

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (B).

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot naponta, fokozatosan növekvő dózisokban helyezzük a csoportokba sorolt kísérleti állatok bőrére, 28 napon keresztül, csoportonként egy dózist használva. A vizsgálat ideje alatt a toxikus tüneteket az állatokon

naponta meg kell figyelni. A vizsgálat alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni. A vizsgálat befejezésekor a még életben lévő állatokat szintén fel kell boncolni.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a kísérlet tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. A vizsgálat megkezdése előtt az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kiválasztva kezelési és kontroll csoport(ok)ba kell sorolni. Röviddel a vizsgálat megkezdése előtt a szőrzetet le kell nyírni a kísérleti állatok törzsének háti oldaláról. Borotválás is használható, de ezt kb. 24 órával a vizsgálat megkezdése előtt kell megtenni. A nyírást vagy borotválást általában kb. hetente meg kell ismételni. A szőrzet nyírása vagy borotválása közben ügyelni kell arra, nehogy bőrsérülést okozzunk. A szőrzetet a vizsgálati anyag felhelyezéséhez a testfelület legalább 10%-áról el kell távolítani. A szőrtelenítendő terület nagyságának, illetve a befedés méreteinek a meghatározásakor figyelembe kell venni az állat testtömegét. Szilárd halmazállapotú anyagok vizsgálatánál – amelyeket szükség esetén poríthatnak – a vizsgálati anyagot vízzel, vagy egyéb megfelelő vivőszerezrel megfelelően nedvesíteni kell, hogy minél jobban tapadjon a bőrhöz. A folyékony anyagokat általában hígítás nélkül alkalmazzuk. A vizsgált anyagot naponta, hetente öt vagy hét napon át helyezzük a bőrre.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

1.6.2.1. Kísérleti állatok

A vizsgálatához felnőtt patkányok, nyulak vagy tengerimalacok egyaránt használhatók. Egyéb faj is használható, de ebben az esetben a választást indokolni kell.

A vizsgálat megkezdésekor az állatok tömege nemenként maximum $\pm 20\%$ -kal térhet el a megfelelő átlagértéktől.

1.6.2.2. Az állatok száma és neme

Minden egyes dózisszinthez legalább tíz egészséges bőrű állat (öt hím és öt nőstény) szükséges. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni. Amennyiben állatok vizsgálat közbeni kiírtását tervezik, úgy az alkalmazott állatok számát meg kell növelni a vizsgálat befejezése előtt kiírtani tervezett állatok számával. Ezenkívül egy tíz (nemenként öt-öt) állatból álló kiegészítő csoport kezelhető a magas dózisszinten 28 napon át, majd a kezelést követően 14 napig megfigyelés alatt tartható a toxikus hatások visszafordíthatóságának, tartósságának, illetve késleltetett jellegének a megfigyelésére. Ilyenkor egy tíz (nemenként öt-öt) állatból álló kiegészítő kontroll csoportot is be kell iktatni.

1.6.2.3. Dózisszintek

Legalább három dózisszintre, valamint egy kontrollra vagy vivőszerez kontrollra is szükség van, amennyiben vivőszert használunk. Az expozíció időtartama naponta legalább hat óra kell hogy legyen. A vizsgálati anyagot naponta ugyanabban az időpontban kell a bőrre helyezni, és a dózist időnként (hetente vagy kéthetente) módosítani kell, hogy a dózis az állat testtömegéhez képest állandó maradjon. A kontroll állatokat – a vizsgálati anyaggal történő kezelést leszámítva – a vizsgálati csoportokban lévő állatokkal teljesen megegyező módon kell kezelni. Amennyiben a kezelés megkönnyítésére vivőszert használnak, úgy a kontroll állatokra ugyanúgy fel kell helyezni a vivőszert, mint a kezelt állatokra, és ugyanannyi vivőszert kell kapniuk, mint a legmagasabb dózisszinten kezelt csoport állatai. A legmagasabb dózisszintet úgy kell megállapítani, hogy az toxikus hatásokat okozzon, de elhalást ne, vagy csak kevés esetben, míg a legalacsonyabb dózisszintet úgy, hogy az ne okozzon toxicitásra utaló tüneteket. Amennyiben a humán expozícióról használható becslés áll rendelkezésre, úgy a legalacsonyabb dózisszintnek ennél magasabbnak kell lennie. A középső dózisszinten ideális esetben csak minimális, enyhe toxikus tünetek jelentkezhetnek. Amennyiben egynél több közbülső dózisszintet használnak, úgy ezeket egymáshoz képest úgy kell megállapítani, hogy a toxikus hatás lépcsőzetesen fokozódjon. Az alacsony és közbülső dózisszinteken kezelt csoportokban, illetve a kontroll csoportokban az elhullások előfordulási gyakoriságának kicsinek kell lennie, annak érdekében, hogy az eredményeket megfelelően értékelni lehessen.

Amennyiben a vizsgált anyag súlyos bőrirritációt okoz, úgy a koncentrációkat csökkenteni kell, és ez azzal járhat, hogy a magas dózisszintnél az egyéb toxikus tünet kevesebb lesz, vagy azok egyáltalán nem jelentkeznek. Továbbá, ha a bőr súlyosan károsodott, akkor előfordulhat, hogy a vizsgálatot meg kell szakítani, és kisebb koncentrációkkal új vizsgálatot kell indítani.

1.6.2.4. Határérték vizsgálat (limit teszt)

Amennyiben az előzetes vizsgálatban az 1000 mg/kg, vagy a lehetséges humán expozíciót számításba vevő nagyobb dózis, ha van ilyen adat, nem okoz toxikus tüneteket, további vizsgálat nem szükséges.

1.6.2.5. Megfigyelési időszak

A kísérleti állatokon a toxicitási tüneteket naponta meg kell figyelni. Az elhullások időpontját, valamint a toxicitási tünetek jelentkezésének és megszűnésének az idejét fel kell jegyezni.

1.6.3. Eljárás

Az állatokat egyenként kell a ketrecben tartani. Az állatokat naponta kell kezelni a vizsgálati anyaggal, ideális esetben hetente hét alkalommal, 28 napon keresztül. Az utómegfigyelés céljából esetlegesen használt kiegészítő csoportokban lévő állatokat további 14 napig kell kezelés nélkül tartani, hogy a mérgezés utáni gyógyulást, illetve a toxikus hatás tartósságát meg lehessen figyelni. Az expozíció időtartama naponta legalább hat óra kell hogy legyen.

A vizsgálati anyagot egyenletesen kell felhelyezni a teljes testfelület kb. 10%-át kitevő bőrfelületére. Erősen toxikus anyagoknál a kijelölt bőrfelület lehet némileg kisebb is, de a lehető legnagyobb mértékben le kell fedni, lehetőség szerint minél vékonyabb és egyenletesebb anyagréteggel.

Az expozíció alatt a vizsgálati anyagot porózus gézkötéssel és nem-irritáló ragtapasszal kell a bőrhöz rögzíteni. Emellett a gézkötés és a vizsgálati anyag rögzítésére, illetve, hogy a vizsgálati anyag lenyelését megakadályozzák, a vizsgálati felületet megfelelő módon be kell fedni. A vizsgálati anyag lenyelését az állat mozgását korlátozó megfelelő eszközzel meg lehet akadályozni, de az állat teljes immobilizálása nem ajánlott. Mint választható alternatíva, az ún. „nyakörv védelmi eszköz” jön számításba.

Az expozíciós időszak végén a megmaradt vizsgálati anyagot vízzel vagy más megfelelő módon lehetőség szerint el kell távolítani a bőrről.

Valamennyi állatot naponta figyelni kell és fel kell jegyezni a toxicitási tüneteket, beleértve megjelenésük időpontját, súlyosságukat és időtartamukat. A megfigyeléseknek ki kell terjedniük a bőr, a szőrzet, a szemek és nyálkahártyák elváltozásaira, továbbá a légző-, a keringési-, az autonóm és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomato-motoros aktivitás és a viselkedés változásaira. Az állatok testtömegét hetente meg kell mérni, és szintén javasolt az állatok tápfogyasztásának hetente történő mérése. Az állatok rendszeres megfigyelése azért is szükséges, hogy lehetőség szerint megakadályozzuk az állatoknak a vizsgálat alatti elvesztését olyan okok miatt, mint például a kannibalizmus, a szövetek autolízise, vagy az elkeveredés. A vizsgálat végén, a kiegészítő csoportok állatait kivéve, valamennyi kezelt csoport életben maradt állatait fel kell boncolni. A haldokló (moribund) állatokat, valamint a súlyos szenvedés illetve fájdalom jeleit mutató állatokat ki kell emelni, humánus módon ki kell írtani, majd fel kell boncolni.

A vizsgálati periódus végén valamennyi állaton – beleértve a kontroll állatokat is – az alábbi vizsgálatokat kell elvégezni:

1. hematológia, beleértve legalább a hematokrit, hemoglobinn koncentráció, vörösvértestszám, fehérvérsejtszám és minőségi vérkép, valamint az alvadási képesség mérését;

2. klinikai kémia, beleértve a máj- és vesefunkció legalább egy paraméterét: szérumban alaninaminotranszferáz (korábbi nevén glutamát piruvát-transzamináz), szérumban aszpartát aminotranszferáz (korábbi nevén glutamát oxálcetsav transzamináz), karbamid nitrogén, albumin, kreatinin, össz-bilirubin és szérumban összfehérje;

A megfelelő toxikológiai elemzéshez szükség lehet még a kalcium, foszfor, klorid, nátrium, kálium, éhgyomri glükóz értékének, illetve a lipidek, hormonok, sav/bázis egyensúly, methemoglobin és kolinészteráz aktivitás meghatározására. A hatások további vizsgálatára szükség esetén további klinikai kémiai vizsgálatok végezhetők.

1.6.4. Kórboncolás

A vizsgálatban résztvevő valamennyi állatot fel kell boncolni. Legalább a máj, a vesék, a mellékvesék és a herék tömegétboncolást követő lehető legrövidebb időn belül – a kiszáradás elkerülésére még nedves állapotban – meg kell mérni. A szervek és szövetek, azaz a normál és kezelt bőr, a máj, vese, lép, herék, mellékvesék, szív, és célszervek (azaz valamennyi egyéb szerv, amelyen kóros elváltozás vagy méretváltozás figyelhető meg, az esetleges későbbi kórszövettani vizsgálathoz megfelelő közegben fixálni kell.

1.6.5. Kórszövettani vizsgálat

A nagy dózissal kezelt csoport és a kontroll csoport állatainál a fixált szerveken és szöveteken szövettani vizsgálatot kell végezni. Azokat a szerveket és szöveteket, amelyeknél a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál a vizsgált anyagnak tulajdonítható elváltozások figyelhetők meg, valamennyi kisebb dózissal kezelt csoportnál is meg kell vizsgálni. Az esetleges kiegészítő csoportok állatainál szintén szövettani vizsgálatot kell végezni, külön figyelmet fordítva azokra a szervekre és szövetekre, amelyeken a többi kezelt csoportnál elváltozásokat észleltek.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összesíteni, minden egyes vizsgálati csoportnál feltüntetve az állatok számát a vizsgálat megkezdésekor, valamint a különböző típusú elváltozásokat mutató állatok számát.

Valamennyi eredményt megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer alkalmazható.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jelentésnek az alábbi adatokat kell tartalmazni:

- az állatokra vonatkozó adatok (faj, törzs, származás (forrás), környezeti feltételek takarmányozás, stb.);
- vizsgálati körülmények (beleértve a fedőkötés típusát: zárt vagy nem zárt);
- dóziszintek (az esetlegesen használt vivőszer megnevezésével) és koncentrációk;
- hatástalan szint, amennyiben lehetséges;
- a toxikus hatásra vonatkozó adatok az állatok neme és dóziszint szerint összesítve;
- az elhullás időpontja a vizsgálat során, vagy, a továbbélő állatok kiirtásának időpontja;
- toxikus vagy egyéb hatások;
- valamennyi kóros tünet megfigyelésének időpontja, és ezt követő időbeli lefolyása;
- tápfogyasztásra és testtömegre vonatkozó adatok;
- alkalmazott hematológiai vizsgálatok és az eredmények;
- alkalmazott klinikai kémiai vizsgálatok és az eredmények;
- boncolási leletek;
- valamennyi kórszövettani lelet részletes leírása;
- az eredmények megfelelő statisztikai feldolgozásával kapott adatok (amennyiben vannak);
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd az Általános Bevezetés B. részét (H).

B.10. MUTAGENITÁS – *IN VITRO* EMLŐS KROMOSZÓMA ABERRÁCIÓ VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 473, *In vitro* emlős kromoszóma aberráció vizsgálat (1997) másolata.

1.1. Bevezetés

Az emlős *in vitro* kromoszóma aberráció vizsgálat azoknak a tesztanyagoknak a kimutatására szolgál, amelyek szerkezeti kromoszóma aberrációk előidézésére képesek emlős sejtenyészetekben (1) (2) (3). A szerkezeti aberrációk két típusúak lehetnek, kromoszóma és kromatid típusúak. A kémiai mutagének többsége kromatid típusú aberrációkat indukál, de kromoszóma típusú aberrációk is előfordulnak. A poliploidia megemelkedése jelezheti, hogy a tesztanyag képes számbeli aberrációk előidézésére. Ezt a módszert azonban nem a számbeli aberrációk kimutatására dolgozták ki, és rutinszerűen nem is használják erre a célra. A kromoszóma mutációk és más hasonló jelenségek számos emberi genetikai betegség okozói, és alapvető bizonyítékok vannak rá, hogy a kromoszóma mutációk és a hasonló jelenségek által az onkogénekben és a tumor szuppresszor génekben okozott változások szerepet játszanak az emberi és a kísérletes rákok kialakulásában.

Az *in vitro* kromoszóma aberráció teszt végezhető megállapodott sejtvonalakon, sejt törzseken, vagy primér sejt kultúrákon. A sejteket a növekedési készség, a kariotípus stabilitása, a kromoszómaszám, a kromoszómák alaki változatossága, és a kromoszóma aberrációk spontán gyakorisága alapján választják ki.

Az *in vitro* kivitelezett tesztek esetében általában egy külső (forrásból származó) metabolikus aktivációra van szükség. Az *in vitro* metabolikus aktivációs rendszerek azonban képtelenek tökéletesen utánozni az emlős *in vivo* körülményeket. Gondosan kerülni kell azokat a körülményeket, amelyek (téves) pozitív eredményre vezetnek, de nem valódi mutagén hatás révén; okozhatják pl. a pH és ozmolalitás változások, vagy a kifejezett citotoxikus hatás (4)(5).

Ezt a vizsgálatot a lehetséges emlős mutagének és karcinogének szűrésére használják. Számos vegyület amelyik ebben a tesztben pozitív, emlősben daganatkeltő, de nincs teljes korreláció az *in vitro* kromoszóma aberráció vizsgálat eredménye és a karcinogenitás között. A korreláció függ az adott kémiai osztálytól, és egyre több bizonyíték van rá, hogy azok a daganatkeltők, amelyek ezzel a teszttel nem mutathatók ki, nem közvetlen DNS károsító hatás révén, hanem más mechanizmussal fejtik ki hatásukat.

Lásd még: Általános bevezetés B. rész

1.2. Fogalmi meghatározások

Kromatid típusú aberráció: szerkezeti kromoszóma károsodás, ami egy kromatid törésében, vagy a kromatidok közötti törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú aberráció: szerkezeti kromoszóma károsodás, ami a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Endoreduplikáció: olyan folyamat, amikor egy S fázis után a sejt nem osztódik, hanem egy új S fázis indul, ami 4, 8, 16...kromatidból álló kromoszómák kialakulására vezet.

Gap: egy kromatid szélességénél rövidebb nem-festődő szakasz a kromoszómán, a disztális kromatid rész(ek) legfeljebb minimális tengelyeltéréssel.

Mitotikus index: egy sejtpopulációban lévő összes sejtben belüli a metafázisban lévő sejtek aránya; az adott populáció proliferációjának a mértékét jelzi.

Számbeli aberráció: eltérés a sejtekre jellemző normális kromoszómaszámtól.

Poliploidia: a haploid kromoszómaszám (n) egészszámu, de nem diploid (2n) megsokszorozódása (3n, 4n, stb.).

Szerkezeti aberráció: a sejtosztódás metafázisában mikroszkóppal megfigyelhető kromoszóma szerkezeti változások, mint a deléciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli, vagy kromoszómák közötti átrendeződések.

1.3. A teszt módszer alapelve

A sejteket megkezelik a tesztanyaggal metabolikus aktivációval és anélkül is. Az expozíció után egy előre meghatározott időpontban metafázis blokkoló szerrel (pl. colchicinnel vagy Colcemiddel[®]) kezelnek, a sejteket begyűjtik, kromoszóma preparátumot készítenek, megfestik, és a metafázisú sejteket kromoszóma aberrációra vizsgálják.

1.4. A teszt módszer leírása

1.4.1. Előkészítendő anyagok

1.4.1.1. Sejtek kiválasztása

Számos sejt vonal, törzs vagy primer sejttenyészet, beleértve az emberi sejteket is használható (pl. kínai hörcsög fibroblasztok, emberi vagy más emlős perifériás limfociták).

1.4.1.2. Tápfolyadékok és tenyésztési körülmények

Megfelelő tápfolyadékokat és inkubációs körülményeket (tenyésztő edények, CO₂ koncentráció, hőmérséklet és páratartalom) kell biztosítani a tenyészetek fenntartására. Megállapodott sejt vonalakat és törzseket rendszeresen ellenőrizni kell a modális kromoszómaszám stabilitására és mycoplasma fertőzöttségre. Fertőzött tenyészet nem használható. Ismerni kell a normális sejt ciklus időt és az alkalmazandó tenyésztési körülményeket.

1.4.1.3. A tenyészetek előkészítése

Megállapodott sejt vonalakat és törzseket: a sejteket a törzstenyészetekből felszaporítják, leültetik tápfolyadékba olyan sejtszámmal, hogy a sejtek begyűjtése előtt a tenyészetek ne ériék el a konfluens állapotot, és 37 °C-on inkubálják.

Limfociták: egészséges donoroktól nyert, alvadásgátlóval (pl. heparinnal) kezelt teljes vért, vagy szeparált limfocitákat, mitogént (pl. phytohaemagglutinin) tartalmazó tápfolyadékba juttatják, és 37 °C-on inkubálják.

1.4.1.4. Metabolikus aktiváció

A sejteket exponálni kell a kísérleti anyaggal egy megfelelő metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában is. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorokkal kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amit enziminducérral – mint amilyen az Aroclor 1254 (6)(7)(8)(9) vagy a fenobarbiturát és béta-naftoflavon kombinációja (10)(11)(12) – kezelt rágcsálók májából készítenek.

A posztmitokondriális frakciót általában 1–10 tf% koncentráció tartományban használják a végtér fogatban. A metabolikus aktiváció körülményei függhetnek a tesztelendő kémiai anyag osztályától. Bizonyos esetekben indokolt lehet egynél több posztmitokondriális frakció koncentrációt beállítani.

A fejlesztések között megemlíthető a genetikailag módosított sejt vonalakat előállítás, amelyekben olyan specifikus aktivációs enzimek nyilvánulnak meg (expresszálódnak), amelyek endogén aktivációs készséget biztosíthatnak a sejteknek. A sejt vonal kiválasztását szakmailag indokolni kell (pl. a citokróom P450 izoenzim relevanciája a tesztanyag metabolizmusával).

1.4.1.5. A tesztanyag előkészítése

A szilárd tesztanyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni, szükség esetén hígítani. A folyékony tesztanyagokat lehet közvetlenül és/vagy hígítás után adni a tesztrendszerhez. Frissen preparált tesztanyagot kell adni. Kivételt csak akkor lehet tenni, amikor a stabilitásra vonatkozó adatok megengedik a tárolást.

1.4.2. Kísérleti körülmények

1.4.2.1. Oldószer/vivőanyag

Az oldószer/vivőanyag nem lehet rá gyanús, hogy képes kémiai reakcióba lépni a tesztanyaggal, és nem befolyásolhatja a sejtek túlélését és az S9 aktivitását. Amennyiben nem a jól ismert oldószerek/vivőanyagok valamelyikét használják, a választott oldószer/vivőanyag kompatibilitását adatokkal kell igazolni. Ajánlott, hogy amennyiben lehetséges, vizes oldószer/vivőanyag használata kerüljön mindenekelőtt megfontolásra. Amennyiben a tesztanyag vízben bomlik, vízmentes szerves oldószert kell használni. A víz molekuláris szűrővel távolítható el.

1.4.2.2. Dózisszintek (expozíciós koncentrációk)

A legmagasabb dózist megszabó kritériumok közül a citotoxicitás, az oldékonyság a tesztrendszerben, valamint a pH-ban és az ozmolalításban bekövetkező változások igényelnek megfontolást.

A citotoxicitást a fő kísérletben meg kell határozni metabolikus aktivációval és anélkül is, megfelelő mutatókat használva a sejtek integritására és növekedésére, mint amilyen a benőttesség (konfluencia) mértéke, az életképes sejtek száma és a mitotikus index. Az oldékonyságot és a citotoxicitást egy előkísérletben célszerű meghatározni.

Legalább 3 értékelhető koncentrációt kell beállítani. Ha az anyag citotoxikus, a koncentráció tartomány terjedjen a maximálistól a már csak kissé, vagy egyáltalán nem toxikusig; ez rendszerint azt jelenti, hogy a koncentrációk maximum kettő és négyzetgyök tíz közé eső faktorral különbözzenek egymástól. A sejtek begyűjtésekor a legnagyobb koncentrációnak jelentősen (50%-osnál jobban) csökkentenie kell a benőttesség mértékét, a sejtszámot, vagy a mitotikus indexet. A mitotikus index csak egy indirekt mutatója a citotoxikus/citosztatikus hatásnak és függ a kezelés óta eltelt időtől. Ugyanakkor a mitotikus index elfogadható a szuszpenziós kultúrák esetén, ahol más módszerek a toxicitás meghatározására munkaigényesek és nem praktikusak. A sejtciklus kinetikára vonatkozó adatok, mint az átlagos generációs idő (average generation time, AGT) kiegészítő információként használható. Ugyanakkor az AGT egy átfogó/általános átlag, ami nem mindig mutatja ki a megkésített szubpopulációkat, ezért akár már egy kis megnyúlása az AGT-nek, kifejezett késedelemre vezethet az aberrációk kimutatására optimális időben.

A relatíve nem toxikus anyagokra nézve a maximális koncentráció legyen 5 µl/ml, 5 mg/ml vagy 0.01 M, amelyek a legalacsonyabb koncentrációjú.

A relatíve rosszul oldódó anyagokra nézve, amelyek a nem oldódó koncentráció alatt nem toxikusak, a legnagyobb koncentráció haladja meg az oldékonyság határát a kezelési médiumban a kezelési periódus végén. Egyes esetekben (pl. amikor a legalacsonyabb nem oldódó koncentráció felett fordul elő toxicitás) ajánlatos egy vagy több láthatóan kicsapódó dózisszintet tesztelni. Hasznos lehet az oldékonyságot a kezelési periódus elején és végén is megnézni, mivel az változhat az expozíció alatt a sejtek, az S9, a szérum stb. jelenléte miatt. A kicsapódás szabad szemmel állapítható meg. A kicsapódás nem zavarhatja a számolást.

1.4.2.3. Negatív és pozitív kontrollok

Minden tesztbe be kell állítani egyidejű pozitív és negatív (oldószeres vagy vivőanyag) kontrollt úgy metabolikus aktivációval, mint anélkül. Metabolikus aktiváció használata esetén olyan pozitív kontroll vegyületet kell választani, amelyik mutagén hatásának kifejtéséhez metabolikus aktivációt igényel.

Pozitív kontrollnak egy ismert klaszto gént kell használni egy olyan dózisszinten, hogy az a háttérhez képest egy kimutatható és reprodukálható emelkedést okozzon, bizonyítván a teszt érzékenységet.

A pozitív kontroll dózisokat úgy kell megválasztani, hogy a hatás legyen egyértelmű, de ne legyenek olyan magasak, hogy a kódolt lemezek identitása (pozitív kontroll volta) nyomban lelepleződjön. A következő anyagok lehetnek például pozitív kontrollok:

Aktivációs körülmények	Pozitív kontroll	CAS szám	EINECS szám
Exogén metabolikus aktiváció nélkül	metil-metán-szulfonát	[66-27-3]	200-625-0
	etil-metán-szulfonát	[62-50-0]	200-536-7
	N-etil-N-nitrozo-karbamid	[759-73-9]	212-072-2
	mitomycin C	[50-07-7]	200-008-6
	4-nitro-kinolin-N-oxid	[56-57-5]	200-281-1
Exogén metabolikus aktivációval	benzo[a]pirén	[50-32-8]	200-028-5
	ciklofoszfamid ciklofoszfamid monohidrát	[50-18-0] [6055-19-2]	200-015-4

Más, megfelelő pozitív kontroll vegyület is használható. Amennyiben elérhető, megfontolandó a kísérleti anyag osztályába tartozó pozitív kontroll anyag használata.

Negatív kontrollokat (amikor csak oldószer vagy vivőanyag kerül a kezelési médiumba), minden mintavételi időpontra be kell állítani, de ugyanúgy kell velük bánni, mint a kezelt tenyészetekkel. Kezeletlen kontrollt szintén kell használni, hacsak nincs rá historikus adat, hogy a választott oldószernek nincs káros vagy mutagén hatása.

1.4.3. A vizsgálat kivitelezése

1.4.3.1. Kezelés a tesztanyaggal

Proliferáló sejteket kezelnek meg a tesztanyaggal metabolikus aktivációval és anélkül is. A limfociták kezelését a mitogén stimulus után 48 órával kell megkezdeni.

1.4.3.2. A tenyészetek száma

Általában minden koncentrációra két tenyészetet állítanak be, de a negatív/oldószeres kontroll tenyészeteknél ez kifejezetten ajánlott. Amennyiben historikus kontroll adatokkal igazolható, hogy a párhuzamos tenyészetek között a variáció minimális (13) (14), elfogadható lehet minden koncentrációra csak egy tenyészetet beállítani.

Gázokat vagy illékony anyagokat megfelelő módszerekkel, lezárt tenyésztőedényekben kell tesztelni (15) (16).

1.4.3.3. A sejtek begyűjtésének időpontja

Az első kísérletben a sejteket meg kell kezelni a tesztanyaggal metabolikus aktivációval és anélkül is 3-6 órán keresztül, majd a kezelés kezdetétől számított 1.5 normál sejtciklus-idő múlva kell mintát venni (12). Amennyiben ez a kísérlet negatív eredményt ad metabolikus aktivációval és anélkül is, egy további kísérletet kell végezni metabolikus aktiváció nélkül 1.5 normál sejtciklus-időn keresztül végzett folyamatos kezeléssel, aminek a végén nyomban mintát kell venni. Néhány vegyület klasztogenitása könnyebben kimutatható 1.5 sejtciklus-időnél hosszabb kezeléssel/mintavétellel. A metabolikus aktivációval kapott negatív eredmény megerősítésében esetről esetre kell dönteni. Azokat az eseteket ahol a megerősítést nem tartják szükségesnek, meg kell indokolni.

1.4.3.4. Kromoszóma preparátumok készítése

A sejtek begyűjtése előtt általában 1–3 órával megkezelik a tenyészeteket Colcemiddel[®] vagy colchicinnel. Minden egyes tenyészet sejtjeinek begyűjtését, és a kromoszóma preparátumok készítését külön-külön kell elvégezni. A kromoszóma preparálást hipotonizálással, fixálással és festéssel végzik.

1.4.3.5. Mikroszkópos értékelés

A mikroszkópos vizsgálat előtt valamennyi lemezt, beleértve a pozitív és negatív kontrollt is, egymástól függetlenül kódolni kell. Mivel a kromoszóma preparálás gyakran okoz a metafázisok egy részében kromoszómavesztésre vezető töréseket, csak azok a metafázisok értékelendők, amelyekben a centromérák száma egyenlő a modális kromoszómaszám ± 2 -vel valamennyi sejtípusra. Legalább 200 jól kiterült metafázist kell vizsgálni koncentrációnként és kontrollonként, lehetőség szerint egyenlő arányban megosztva a két tenyészet között, ha van két tenyészet. Ez a szám csökkenthető, amennyiben nagyszámú aberráció látható.

Bár a teszt a szerkezeti kromoszóma aberrációk kimutatására szolgál, fontos feljegyezni a poliploidákat és endoreduplikációkat, amennyiben láthatók.

2. ADATFELDOLGOZÁS

2.1. Az eredmények kezelése

A kísérlet egysége a sejt, ezért a szerkezeti kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek százalékos gyakoriságát kell értékelni. Fel kell sorolni a szerkezeti aberrációk különböző típusait, megadni a számukat és gyakoriságukat a kezelt és a kontroll csoportokban. A gap-ek előfordulását külön kell megadni, és általában nem számolják bele az össz-aberráció gyakoriságba.

A fő kromoszóma aberráció kísérletben egyidejűleg fel kell jegyezni a citotoxicitás vizsgálatának eredményét is minden kezelt és kontroll tenyészetre.

Meg kell adni a tenyészetek egyedi adatait. Végül valamennyi adatot táblázatos formában kell összefoglalni.

Az egyértelmű pozitív eredmény igazolása (reprodukálása) nem követelmény. A bizonytalan eredményeket további teszteléssel kell tisztázni, előnyben részesítve a kísérleti körülmények módosítását. A negatív eredmény megerősítésének szükségessége az 1.4.3.3. pont alatt lett tárgyalva. Az új kísérletekben mérlegelni kell a kísérleti körülmények/paraméterek módosítását/kibővítését. Módosítható paraméterek lehetnek a koncentráció különbségek és a metabolikus aktivációs körülmények.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

A pozitív eredmény megállapításának több kritériuma is van, ilyen pl. a kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek számának dóziszfüggő, vagy reprodukálható megemelkedése. Az eredményeknek a biológiai vonatkozását kell először fontolóra venni. Az eredmények értékelésében segítséget nyújthatnak a statisztikai módszerek (3) (13), de a statisztikai szignifikancia nem lehet a pozitív eredmény megállapításának egyedüli kritériuma.

A poliploid sejtek számának megemelkedése jelezheti, hogy a tesztanyag képes gátolni a mitózis folyamatát, és képes számbeli kromoszóma aberrációk előidézésére. Az endoreduplikáció megemelkedése jelezheti, hogy a tesztanyag képes gátolni a sejtciklus előrehaladását (17)(18).

Az a tesztanyag, amelynek az eredménye nem elégtí ki a fenti kritériumokat, nem minősül mutagénnek ebben a rendszerben.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményt ad, de ritkán előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet egyértelműen állást foglalni a tesztanyag aktivitását illetően. Az eredmények az újabb kísérletek számától függetlenül bizonytalanok vagy kérdésesek maradhatnak.

Az *in vitro* kromoszóma aberráció tesztben kapott pozitív eredmény azt jelenti, hogy a tesztanyag szerkezeti kromoszóma aberrációkat indukál emlős szomatikus sejtek tenyésztésében. A negatív eredmény azt jelenti, hogy a vizsgálat körülményei között a tesztanyag nem indukál kromoszóma aberrációkat az emlős szomatikus sejtek tenyésztésében.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Tesztanyag, oldószer/vivőanyag:

– tesztanyag azonosítására szolgáló adatok, halmazállapot, releváns fiziko-kémiai adatok, ha vannak és tisztaság, ha ismert,

- a vivőanyag kiválasztásának indoklása,
- a tesztanyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

- a sejtek típusa és származása,
- kariotípus jellemzők, a használt sejtípus alkalmassága,
- mycoplasma mentesség, ha alkalmazható,
- a sejtciklus hosszára vonatkozó információk,
- a véradók neme, teljes vér, vagy szeparált limfociták használata, a használt mitogén,
- passzálások száma, ha alkalmazható,
- a sejtenyésztés fenntartásának módszere, ha alkalmazható,
- modális kromoszómaszám.

Kísérleti körülmények:

– metafázis blokkoló anyag neve, koncentrációja, behatásának tartama,

– a dóziszintek kiválasztásának magyarázata, sejt kultúrák száma, citotoxicitási és oldékonysági adatok, ha vannak,

- tápfolyadékok összetétele, CO₂ koncentráció, ha alkalmazható,
- a tesztanyag koncentrációja,
- a tenyészethez adott tesztanyag-oldat térfogata,
- inkubációs hőmérséklet,
- inkubációs idő,
- a kezelés tartama,
- sejtszám a leültetéskor, ha alkalmazható,
- a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele, elfogadhatóságának kritériumai,
- pozitív és negatív kontrollok,
- metafázis preparátum készítésének módja,
- az aberrációk meghatározásának/leszámolásának kritériumai,
- az értékelt metafázisok száma,
- a toxicitás megállapítására szolgáló módszerek,
- a negatív, pozitív és bizonytalan eredmények kritériumai.

Eredmények:

- toxikus tünetek, pl. benőttesség mértéke, sejtciklus adatok, sejtszám, mitotikus index,
- kicsapódás jelei,
- a kezelési médium pH-jára és ozmolalítására vonatkozó adatok, ha meghatározták,
- az aberrációk és a gap-ek definíciója,
- kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek száma, és a kromoszóma aberráció típusok minden kezelt és kontroll tenyészetre külön-külön megadva,
- ploidia változások, ha voltak,
- dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,
- az alkalmazott statisztikai módszerek, ha voltak,
- egyidejű negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatok,

– historikus negatív (oldószer/vivőanyag) kontroll adatok, a tartományokkal, átlagokkal és a standard deviációkkal.

Az eredmények megbeszélése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: *Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4. Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.

(2) Ishidate, M. Jr. and 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, pp. 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., Rimpoo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp.1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147-204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297-305.

(6) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

(8) Natarajan, A. T., Tate, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83-90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277-290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F.J. Fouts, J. R. Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(12) Galloway S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T. Mosesso, P., Sofumi, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241-261.

(13) Richardson C., Williams, D. A., Allen, J.A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139-149.

(15) Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.

- Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983). Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362-1364.

B.11. MUTAGENITÁS – *IN VIVO* EMLŐS CSONTVELŐ KROMOSZÓMA ABERRÁCIÓ VIZSGÁLAT**1. MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD TG 475, *In vivo* emlős csontvelő kromoszóma aberráció vizsgálat (1997) másolata.

1.1. Bevezetés

Az emlős *in vivo* kromoszóma aberráció vizsgálat a tesztanyag által okozott szerkezeti kromoszóma aberrációk kimutatására szolgál az állatok, rendszerint rágcslók csontvelő sejtjeiben (1) (2) (3) (4). A szerkezeti kromoszóma aberrációk két típusúak lehetnek, kromoszóma és kromatid típusúak. A poliploidia megemelkedése jelezheti, hogy a tesztanyag képes számbeli aberrációk előidézésére. A kémiai mutagének többsége kromatid típusú aberrációkat indukál, de kromoszóma típusú aberrációk is előfordulnak. A kromoszóma mutációk és más hasonló jelenségek számos emberi genetikai betegség okozói, és alapvető bizonyíték van arra, hogy a kromoszóma mutációk és a hasonló jelenségek által az onkogénekben és a tumor szuppresszor génekben okozott változások szerepet játszanak az emberi és a kísérletes rákok kialakulásában.

Erre a vizsgálatra rutinszerűen rágcslókat használnak. Célszövet a csontvelő, mivel ez gazdagon vaszkularizált és gyors ciklusú sejtpopulációt tartalmaz, amelynek sejtjei könnyen izolálhatók és preparálhatók. Ez a módszer/leírás nem vonatkozik más fajra, vagy más célszövetre.

Ez a kromoszóma aberráció teszt különös jelentőséggel bír a mutagén veszély becslésében, mivel olyan tényezők mérlegelését teszi lehetővé, mint az *in vivo* metabolizmus, a farmakokinetika és a DNS reparáció, bár ezek fajtól, szövetektől és genetikai végpontoktól függően eltérőek lehetnek. Egy *in vivo* teszt egy *in vitro* rendszerben kimutatott mutagén hatás továbbvizsgálatára is használható.

Amennyiben van rá bizonyíték, hogy a tesztanyag, vagy reaktív metabolitja nem fogja elérni a célszövetet, ez a teszt nem alkalmas a kromoszóma aberrációk vizsgálatára.

Lásd még: Általános bevezetés B. rész

1.2. Fogalmi meghatározások

Kromatid típusú aberráció: szerkezeti kromoszóma károsodás, ami egy kromatid törésében, vagy a kromatidok közötti törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú aberráció: szerkezeti kromoszóma károsodás, ami a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Endoreduplikáció: olyan folyamat, amikor egy S fázis után a sejt nem osztódik, hanem egy új S fázis indul, ami 4, 8, 16...kromatidból álló kromoszómák kialakulására vezet.

Gap: egy kromatid szélességénél rövidebb nem-festődő szakasz a kromoszómán, a disztális kromatid rész(ek) legfeljebb minimális tengelyeltéréssel.

Számbeli aberráció: eltérés a sejtekre jellemző normális kromoszómaszámtól.

Poliploidia: a haploid kromoszómaszám (n) egészszáma, de nem diploid (2n) megsokszorozódása (3n, 4n, stb.).

Szerkezeti aberráció: a sejtosztódás metafázisában mikroszkóppal megfigyelhető kromoszóma szerkezeti változások, mint a deléciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli, vagy kromoszómák közötti átrendeződések.

1.3. A tesztmódszer alapelve

Az állatokat megfelelő módon megkezelik a tesztanyaggal, majd a kezelés után megfelelő időpontban leölik. Az ölés előtt az állatokat metafázis blokkoló szerrel (pl. colchicinnel vagy Colcemiddel[®]) kezelik. A csontvelősejtekből kromoszóma preparátumot készítenek, megfestik, és a metafázisú sejteket kromoszóma aberrációra vizsgálják.

1.4. A tesztmódszer leírása**1.4.1. Előkészítendő anyagok****1.4.1.1. Az állatfaj kiválasztása**

Patkányok, egerek és kínai hörcsögök a leggyakrabban használtak, de bármilyen más emlős faj is megfelelő lehet. Általánosan használt laboratóriumi állattörzsek egészséges, fiatal felnőtt egyedeket kell használni. A kísérlet kezdetén az állatok testsúlybeli ingadozása minimális legyen, és egyik nemben se haladja meg az átlag testsúly 20%-át.

1.4.1.2. Tartási és etetési körülmények

A tartási körülményeket illetően lásd az Általános bevezetés B. részét, de a páratartalom legyen 50-60% között.

1.4.1.3. Az állatok előkészítése

Fiatal felnőtt egészséges állatokat random módon (véletlenszerűen) sorolják be a kontroll és kezelt csoportokba. A dobozokat úgy kell elrendezni, hogy a dobozok elhelyezéséből adódó lehetséges hatások a minimálisra csökkenjenek. Az állatokat egyedileg jelölik és legalább öt napig hagyják akklimatizálódni a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. A dózisok elkészítése

A szilárd tesztanyagokat az állatok kezelése előtt megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni, szükség esetén hígítani. A folyékony tesztanyagokat lehet közvetlenül, vagy hígítás után adni. Frissen preparált tesztanyagot kell adni. Kivételt csak akkor lehet tenni, amikor a stabilitásra vonatkozó adatok megengedik a tárolást.

1.4.2. Kísérleti körülmények

1.4.2.1. Oldószer/vivőanyag

Az oldószer/vivőanyag az alkalmazott mennyiségben nem lehet toxikus, és nem lehet rá gyanús, hogy képes kémiai reakcióba lépni a tesztanyaggal. Amennyiben nem a jólismert oldószerek/vivőanyagok valamelyikét használják, a választott oldószer/vivőanyag kompatibilitását adatokkal kell igazolni. Ajánlott, hogy amennyiben lehetséges vizes oldószer/vivőanyag használata kerüljön mindenekelőtt megfontolásra.

1.4.2.2. Kontrollok

Minden tesztben mindkét nemre be kell állítani egyidejű negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrollt. A kontroll csoportok állataival a tesztanyag adását kivéve ugyanúgy kell bánni, mint a tesztanyaggal kezelt állatokkal.

A pozitív kontrolloknak kromoszóma aberrációkat kell okozniuk *in vivo* olyan dózisszinteken, amelyeken már várhatóan kimutatható az emelkedés a negatív kontrollhoz viszonyítva. A pozitív kontroll dózisokat úgy kell megválasztani, hogy a hatás legyen egyértelmű, de ne legyenek olyan magasak, hogy a kódolt lemezek identitása (pozitív kontroll volta) nyomban lelepleződjön. Elfogadható, ha a pozitív kontrollal más módon kezelnek mint a tesztanyaggal, és csak egyszeri mintavétel történik. Továbbá, amennyiben elérhető, megfontolandó a tesztanyaggal azonos kémiai osztályba tartozó pozitív kontroll használata. A következő anyagok lehetnek például pozitív kontrollok:

Pozitív kontroll	CAS szám	EINECS szám
etil-metán-szulfonát	[62-50-0]	200-536-7
N-etil-N-nitrozo-karbamid	[759-73-9]	212-072-2
mitomycin C	[50-07-7]	200-008-6
ciklofoszfamid	[50-18-0]	200-015-4
ciklofoszfamid monohidrát	[6055-19-2]	
trietilén-melamin	[51-18-3]	200-083-5

Negatív kontrollokat, amelyek csak oldószert vagy vivőanyagot kapnak, de a bejuttatás módja megegyezik a tesztanyagéval, minden mintavételi időpontra be kell állítani, hacsak az állatok közötti különbözősége és a kromoszóma aberrációk gyakoriságára vonatkozó historikus adatok alapján ez nem tartható feltétlenül indokoltnak. Amennyiben a negatív kontrollból csak egyszeri mintavétel történik, a legmegfelelőbb azt az első mintavételi időpontban megtenni. Továbbá, kezeletlen kontrollt is be kell állítani, hacsak a választott oldószere/vivőanyagra vonatkozó historikus, vagy irodalmi kontroll adatok alapján ez nem indokolt.

1.5. A vizsgálat kivitelezése

1.5.1. Az állatok neme és száma

Minden kezelt és kontroll csoportnak nemenként legalább öt értékelhető állatot kell tartalmaznia. A csak egyik nemen végzett vizsgálat csak akkor tartható elegendőnek, ha az adott időben rendelkezésre álló, ugyanazon fajra és ugyanolyan kezelési módra vonatkozó adatok bizonyítják, hogy a toxicitásban nincs alapvető különbség a két nem között. Amennyiben az emberi expozíció szex-specifikus, mint pl. néhány gyógyszer esetében, akkor a tesztet csak a megfelelő nemű állatokon kell elvégezni.

1.5.2. A kezelés rendje (kezelési séma)

A tesztanyag bejuttatására előnyben kell részesíteni az egyszeri kezelést. A tesztanyag bejuttatható két részletben (split kezeléssel) is, azaz ugyanazon a napon kétszer kezelnek néhány órás időközzel, megkönnyítve ezáltal a nagyobb térfogatú anyag bevitelét. Az ettől eltérő beadási rendet szakmailag indokolni kell.

Az állatoktól a kezelés után két alkalommal vesznek mintát egy napon belül. Rágcsálók esetén az első mintavételt a kezelést követő 1.5 normál sejtciklus tartamú időközzel végzik (ami normálisan 12-18 óra).

Tekintettel azonban arra, hogy a kromoszóma aberrációk kimutatásának optimális időpontját befolyásolhatja a tesztanyag felszívódásához és metabolizmusához szükséges idő, a sejtciklus kinetikájára kifejtett hatása, egy második mintavétel is ajánlott, az első mintavétel után 24 órával. Ha a kezelés több mint egy napig tart, az utolsó kezelést követő 1.5 normál sejtciklus idejének lejártá után egyszer vesznek mintát.

Az állatokat lelés előtt egy metafázis blokkoló ágens (pl. Colcemid® vagy colchicin) megfelelő dóziséval kezelik meg intraperitoneálisan. Ezután megfelelő időpontban mintát vesznek. Egerek esetében ez az idő mintegy 3-5 óra, kínai hörcsögöknél mintegy 4-5 óra. A sejteket kinyerik a csontvelőből, és kromoszóma aberrációkra vizsgálják.

1.5.3. Dózisszintek

Amikor megfelelő adatok hiányában dóziskereső vizsgálatot végeznek, azt ugyanabban a laboratóriumban kell csinálni ugyanazt a fajt, törzset, nemet és kezelési sémát használva, mint a tervezett fő kísérletben (5). Ha az anyag toxikus, az első mintavételi időpontra három dózisszintet állítanak be. Ezeknek a dózisszinteknek le kell fedniük a toxikustól a kissé, vagy egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételi időpontban már csak a legmagasabb dózisszintre van szükség. A legmagasabb dózis úgy határozható meg, mint amelyik toxikus tüneteket okoz, és amelynél az ugyanolyan módon adott magasabb dózis várhatóan már elhullást okozna. Azok az anyagok, amelyek már alacsony, nem-toxikus dózisszinteken specifikus biológiai hatásokkal rendelkeznek (pl. a hormonok és a mitogének) kivételt képezhetnek a fenti dóziszválasztási kritériumok alól, ezeknél esetről esetre kell döntenet. A legmagasabb dózist az is meghatározhatja, ha csontvelő toxicitásra utaló tünetek állapíthatók meg (több mint 50%-os csökkenés a mitotikus indexben).

1.5.4. Küszöb (limit) teszt

Amikor a 2000 mg/ts kg dózis egyszerre, vagy ugyanazon a napon kétszerre beadva nem okoz észrevehető toxikus tüneteket, és amikor a rokon kémiai szerkezetű vegyületekre vonatkozó adatok alapján nem is várható genotoxikus hatás, akkor a három dózisszinten végzett teljes körű vizsgálat nem tartható feltétlenül szükségesnek. A hosszabb, 14 napig tartó vizsgálat esetén a küszöbdózis 2000 mg/testtömeg kg/nap; az ennél is hosszabb vizsgálat esetén a küszöbdózis 1000 mg/testtömeg kg/nap. Amennyiben a várható emberi expozíció indokolja (igen magas és/vagy széles körű), a limit teszt végezhető magasabb dózissal is.

1.5.5. A dózisok beadása

A tesztanyagot általában gyomorszondával, vagy egy megfelelő intubációs kanüllel, esetleg intraperitoneális injekcióval adják be. Indokolt esetben más módon is bejuttatható. A gyomorszondával vagy injekcióval egyszeri alkalommal beadható folyadék maximális térfogata az állat testsúlyától függ. A térfogat nem lehet több mint 2 ml/100 testtömeg g. Ennél magasabb térfogat adását meg kell indokolni. Az irritatív és korrozív anyagok kivételével, amelyek magasabb koncentrációkban általában igen súlyos hatásúak, a dózistérfogat változását minimalizálni kell úgy, hogy a tesztanyag koncentrációjának beállításával minden dózisszinten azonos legyen a dózistérfogat.

1.5.6. Kromoszóma preparátumok készítése

A csontvelőt közvetlenül az állatok leölése után veszik, hipotonizálják és fixálják. Ezután a sejteket tárgylemezre juttatják és megfestik.

1.5.7. Mikroszkópos értékelés

A citotoxicitás mértékének megállapításához a mitotikus indexet állatonként legalább 1000 sejt leszámolásával határozzák meg minden kezelt (beleértve a pozitív kontrollokat) és negatív kontroll állatban.

Legalább 100 metafázist kell vizsgálni állatonként. Ez a szám csökkenthető, amennyiben nagyszámú aberráció látható. A mikroszkópos vizsgálat előtt valamennyi lemezt, beleértve a pozitív és negatív kontrollokat is, egymástól függetlenül kódolni kell. Mivel a preparálás gyakran okoz a metafázisok egy részében kromoszómavesztésre vezető töréseket, csak azok a metafázisok értékelendők, amelyekben a centromérák száma $2n \pm 2$.

2. ADATFELDOLGOZÁS

2.1. Az eredmények kezelése

Az állatok adatait egyedileg kell megadni táblázatos formában. A kísérleti egység az állat. Az összes állatra meg kell határozni az értékelt sejtek számát, az aberrációk sejtenkénti számát és a szerkezeti aberrációkat hordozó sejtek százalékos gyakoriságát. Fel kell sorolni a szerkezeti aberrációk típusait, számukat és gyakoriságukat a kezelt és a kontroll csoportokban. A gap-ek előfordulását külön kell megadni, de általában nem számolják bele az össz-aberráció gyakoriságba. Ha nincs bizonyítható különbség a két nem válaszában, akkor a két nem adatai összevonhatók a statisztikai értékeléshez.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

A pozitív eredmény megállapításának több kritériuma is van, mint pl. a kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek relatív számának dóziszfüggő megemelkedése, vagy a kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek számának egy egyértelmű megemelkedése egyetlen dózisszinten és egyetlen mintavételi időpontban. Az eredményeknek a biológiai vonatkozását kell először fontolóra venni. Az eredmények értékelésében segítséget nyújthatnak a statisztikai módszerek (6), de a statisztikai szignifikancia nem lehet a pozitív eredmény megállapításának egyedüli kritériuma. A bizonytalan eredményeket további teszteléssel kell tisztázni, előnyben részesítve a kísérleti körülmények módosítását.

A poliploidia megemelkedése azt jelezheti, hogy a tesztanyag képes számbeli aberrációk előidézésére. Az endoreduplikáció megemelkedése azt jelezheti, hogy a tesztanyag képes gátolni a sejtciklus előrehaladását (7) (8).

Az a tesztanyag, amelynek az eredményei a fenti kritériumokat nem elégítik ki, nem tekinthető mutagénnek ebben a tesztben.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményt ad, néhány esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet egyértelműen állást foglalni a tesztanyag aktivitását illetően. Az eredmények az újabb kísérletek számától függetlenül bizonytalanok vagy kérdésesek maradhatnak.

Az *in vivo* kromoszóma aberráció tesztben kapott pozitív eredmény azt jelenti, hogy a tesztanyag kromoszóma aberrációkat indukál az adott faj csontvelőjében. A negatív eredmény azt jelenti, hogy a vizsgálat körülményei között a tesztanyag nem indukál kromoszóma aberrációkat az adott faj csontvelőjében.

Állást kell foglalni abban a kérdésben, hogy a tesztanyag vagy metabolitjai bekerültek-e a vérkeringésbe, és specifikusan elérték-e a célszövetet (pl. szisztémás toxicitás).

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Tesztanyag, oldószer/vivőanyag:

– tesztanyag azonosítására szolgáló adatok, halmazállapot, releváns fiziko-kémiai adatok, ha vannak és tisztaság, ha ismert,

– a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

– a tesztanyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

– a felhasznált faj és törzs,

– az állatok száma, életkora és neme,

– származás, tartási körülmények, táp stb.,

– az állatok egyedi testtömege a kísérlet indításakor, beleértve a testtömegetartományokat, átlagokat és standard deviációkat minden egyes csoportra.

Kísérleti körülmények:

– pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollok,

– a dóziskereső kísérletre vonatkozó adatok, ha végeztek,

– a dózisszint választás magyarázata,

– a tesztanyag kezeléshez történő előkészítésének a részletei,

– a tesztanyag beadásának a részletei,

– az adás módjának magyarázata,

– amennyiben lehetséges, azoknak a módszereknek a megadása, amelyekkel igazolható, hogy a tesztanyag bejutott a keringésbe, vagy elérte a célszövetet,

– tesztanyagnak a tápban vagy az ivóvízben beállított koncentrációjának (ppm) átszámítása az aktuális dózisra (mg/testtömeg kg/nap),

– a táp és a víz minőségének részletei,

– a kezelés és a mintavétel rendjének részletes ismertetése,

– a toxicitás megállapítására szolgáló módszerek,

– metafázis blokkoló anyag neve, koncentrációja, behatásának tartama

– metafázis preparátum készítésének módja,

– az aberrációk meghatározásának/leszámolásának kritériumai,

– az értékelt sejtek száma állatonként,

– a negatív, pozitív és bizonytalan eredmények kritériumai.

Eredmények:

– toxikus tünetek,

– mitotikus index,

– az aberrációk típusa és száma állatonként külön-külön megadva,

– az összaberráció szám csoportonként, az átlaggal és a standard deviációval,

– aberrációt hordozó sejtek száma csoportonként, az átlagokkal és a standard deviációkkal,

– ploidia változás, ha volt

– dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,

– az alkalmazott statisztikai módszerek, ha voltak,

– egyidejű negatív kontroll adatok,

– historikus negatív kontroll adatok, a tartományokkal, átlagokkal és a standard deviációkkal,

– egyidejű pozitív kontroll adatok.

Az eredmények megbeszélése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D.C, pp. 275-306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, pp. 157-165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part 1 revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 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., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305-312.

(5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, D. J. Kirkland (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp.184-232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403-413.

(8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp.1362-I 364.

B.12. MUTAGENITÁS – *IN VIVO* EMLŐS ERITROCITA MIKRONUKLEUSZ VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 474, Emlős eritrocita mikronukleusz vizsgálat (1997) másolata.

1.1. Bevezetés

Az emlős *in vivo* mikronukleusz teszt a tesztanyag által az eritroblasztokban okozott kromoszóma vagy mitotikus apparátus károsodás kimutatására szolgál az állatok, rendszerint rágszálók csontvelőjéből és/vagy perifériás vérből vett eritrociták vizsgálata révén.

A mikronukleusz tesztet azoknak az anyagoknak a kimutatása céljából végzik, amelyek olyan citogenetikai károsodást okoznak, amelyek visszamaradt kromoszóma töredékeket vagy egész kromoszómákat is tartalmazó mikronukleuszok képződésére vezetnek.

Amikor a csontvelői eritroblasztból kifejlődik a polikromáziás eritrocita, a fő sejtmag kilökődik és a képződött mikronukleuszok visszamaradnak a már sejtmagmentes citoplazmában. Ezekben a sejtekben a mikronukleuszok kimutatását éppen a sejtmag hiánya könnyíti meg. A mikronukleált polikromáziás eritrociták gyakoriságának a megemelkedése a kezelt állatokban kromoszóma károsodás indukcióját jelzi.

Erre a vizsgálatra rutinszerűen a rágszálók csontvelőjét használják, mivel a polikromáziás eritrociták ebben a szövetben képződnek. A mikronukleált éretlen (plikromáziás) eritrocitáknak a perifériás vérből történő kimutatása is elfogadott módszer azokban a fajokban, amelyek lépe bizonyítottan nem képes kiszűrni a vérből a mikronukleált eritrocitákat, vagy a fajról kimutatták, hogy megfelelően érzékeny a szerkezeti vagy számbeli kromoszóma aberrációkat okozó ágensek iránt. A mikronukleuszok több kritérium alapján is megkülönböztethetők. Ilyenek a mikronukleuszokban jelenlévő, vagy hiányzó kinetochor vagy a centromer DNS. Az alapvető végpont (end point) a mikronukleált éretlen (plikromáziás) eritrociták gyakorisága. Amennyiben az állatokat négy hétig vagy még tovább kezelik, használható végpont a mikronukleuszt tartalmazó érett (normokromáziás) eritrociták gyakorisága is a perifériás vérben.

Az *in vivo* emlős mikronukleusz teszt különös jelentőséggel bír a mutagén veszély becslésében, mivel olyan tényezők mérlegelését teszi lehetővé, mint az *in vivo* metabolizmus, a farmakokinetika és a DNS reparáció, bár ezek fajtól, szövetektől és genetikai végpontoktól függően eltérőek lehetnek. Egy *in vitro* rendszerben kimutatott mutagén hatás továbbvizsgálatára is használható egy *in vivo* teszt.

Amennyiben van rá bizonyíték, hogy a tesztanyag vagy reaktív metabolitja nem fogja elérni a célsövetet, nem helyes ezt a tesztet használni. Lásd még: Általános bevezetés B. rész

1.2. Fogalmi meghatározások

Centroméra (kinetochor): a kromoszóma azon része, amelyhez a sejtosztódás alatt az orsórostok kapcsolódnak, biztosítva a leánykromoszómák rendezett mozgását a leánysejtek pólusai felé.

Mikronukleuszok: a fő sejtmagtól elkülönült kis járulékos magok, amelyek a mitózis (meiozis) telofázisa alatt visszamaradó kromoszóma töredékekből vagy teljes kromoszómákból képződnek.

Normokromáziás eritrocita: érett, riboszómákat már nem tartalmazó eritrocita amely a riboszómákra szelektív festésekkel különböztethető meg az éretlen, polikromáziás eritrocitától.

Polikromáziás eritrocita: a fejlődés egy átmeneti stádiumában lévő éretlen eritrocita, amely még tartalmaz riboszómákat, ezért a riboszómákra szelektív festésekkel megkülönböztethető az érett normokromáziás eritrocitától.

1.3. A teszt módszer alapelve

Az állatokat egy megfelelő eljárással megkezelik a tesztanyaggal. Ha a csontvelőt használják fel, az állatokat a kezelés után megfelelő időben megölik, a csontvelőt kinyerik, kenetet készítenek és megfestik (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7). Ha a perifériás vért használják fel, a kezelés után megfelelő időben vért vesznek, kenetet készítenek és megfestik (4) (8) (9) (10). Perifériás vér vizsgálata esetén a lehető legkevesebb idő teljen el az utolsó kezelés és a vérvétel között. A preparátumokat mikronukleált sejtekre vizsgálják.

1.4. A teszt módszer leírása

1.4.1. Előkészítendő anyagok

1.4.1.1. Az állatfaj kiválasztása

Csontvelő használata esetén az egér vagy a patkány az ajánlott faj, de bármelyik megfelelő emlős faj alkalmazható. Perifériás vér használata esetén az egér ajánlott, de bármilyen emlős faj elfogadott, amelyek lépe bizonyítottan nem képes kiszűrni a vérből a mikronukleált eritrocitákat, vagy a fajról kimutatták, hogy megfelelően érzékeny a szerkezeti vagy számbeli kromoszóma aberrációkat okozó ágensek iránt. Általánosan használt laboratóriumi állattörzsek fiatal egészséges egyedeit kell használni. A kísérlet kezdetén az állatok testsúlybeli ingadozása legyen minimális, egyik nemben se haladja meg az átlag testsúly 20%-át.

1.4.1.2. Tartási és etetési körülmények

A tartási körülményeket illetően lásd az Általános bevezetés B. részét, de a páratartalom legyen 50–60% között.

1.4.1.3. Az állatok előkészítése

Fiatal felnőtt egészséges állatokat random módon (véletlenszerűen) sorolják be a kontroll és kezelt csoportokba. Az állatokat egyedileg jelölik és legalább öt napig hagyják akklimatizálódni a laboratóriumi körülményekhez. A dobozokat úgy kell elrendezni, hogy a dobozok elhelyezéséből fakadó lehetséges hatások a minimálisra csökkenjenek.

1.4.1.4. A dózisok elkészítése

A szilárd tesztanyagokat a kezelés előtt megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni, szükség esetén hígítani. A folyékony tesztanyagokat lehet közvetlenül, vagy hígítás után adni.

Frissen preparált tesztanyagot kell adni kivéve, amikor a stabilitásra vonatkozó adatok megengedik a tárolást.

1.4.2. Kísérleti körülmények

1.4.2.1. Oldószer/vivőanyag

Az alkalmazott mennyiségben az oldószer/vivőanyag nem lehet toxikus, és nem lehet rá gyanús, hogy képes kémiai reakcióba lépni a tesztanyaggal. Amennyiben nem a jól ismert oldószerek/vivőanyagok valamelyikét használják, a választott oldószer/vivőanyag kompatibilitását adatokkal kell igazolni. Ajánlott, hogy amennyiben lehetséges vizes oldószer/vivőanyag használata kerüljön mindenekelőtt megfontolásra.

1.4.2.2. Kontrollok

Minden tesztben mindkét nemre be kell állítani egyidejű negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrollokat. A kontroll csoportok állataival a tesztanyag adását kivéve ugyanúgy kell bánni mint tesztanyaggal kezelt állatokkal.

A pozitív kontrolloknak mikronukleusz képződést kell okozniuk *in vivo* olyan dózisszinteken, amelyeken már várhatóan kimutatható emelkedést okoznak a negatív kontrollhoz viszonyítva. A pozitív kontroll dózisokat úgy kell megválasztani, hogy a hatás legyen egyértelmű, de ne legyenek olyan magasak, hogy a kódolt lemezek pozitív kontroll volta (identitása) nyomban lelepleződjön. Elfogadható, ha a pozitív kontrollal más módon kezelnek mint a tesztanyaggal, és csak egyszeri mintavétel történik. Továbbá, amennyiben elérhető, megfontolandó a tesztanyaggal azonos kémiai osztályba tartozó pozitív kontroll használata. A következő anyagok lehetnek például pozitív kontrollok:

Pozitív kontroll	CAS szám	EINECS szám
etil-metán-szulfonát	[62-50-0]	200-536-7
N-etil-N-nitrozo-karbamid	[759-73-9]	212-072-2
mitomycin C	[50-07-7]	200-008-6
ciklofoszfamid	[50-18-0]	200-015-4
ciklofoszfamid monohidrát	[6055-19-2]	
trietilén-melamin	[51-18-3]	200-083-5

Negatív kontrollokat, amelyek csak oldószert vagy vivőanyagot kapnak, de a bejuttatás módja megegyezik a tesztanyagéval, minden mintavételi időpontra be kell állítani, hacsak az állatok közötti variációra és a mikronukleált sejtek frekvenciájára vonatkozó historikus adatok alapján ez nem tartható feltétlenül indokoltnak. Amennyiben a negatív kontrollból csak egyszeri mintavétel történik, a legmegfelelőbb erre az első mintavételi időpont. Továbbá, kezeletlen kontrollt is be kell állítani, hacsak a választott oldószere/vivőanyagra vonatkozó historikus, vagy a szakirodalomban közölt kontroll adatok alapján ez nem indokolt. Amennyiben perifériás vért használnak, egy, a kezelést megelőzően végzett mintavétel is elfogadható lehet egyidejű negatív kontrollnak, de csak ha rövid vizsgálatról van szó (pl. 1-3 kezelés), és ha az eredmény beleesik a historikus kontroll alapján várt tartományba.

1.5. A vizsgálat kivitelezése

1.5.1. Az állatok neme és száma

Minden kezelt és kontroll csoportnak nemenként legalább öt értékelhető állatot kell tartalmaznia (11). A csak egyik nemen végzett vizsgálat, csak akkor tartható elegendőnek, ha az adott időben rendelkezésre álló, ugyanazon fajra és ugyanolyan kezelési módra vonatkozó adatok bizonyítják, hogy a toxicitásban nincs alapvető különbség a két nem között. Amennyiben az emberi expozíció szexspecifikus, mint pl. néhány gyógyszer esetében, akkor a tesztet csak a megfelelő nemű állatokon kell elvégezni.

1.5.2. A kezelés rendje (kezelési séma)

Nem lehet standard kezelési sémát (azaz egy, két vagy több kezelés 24 órás időközökkel) ajánlani. Egy kiterjesztett kezelési sémából vett minta akkor fogadható el, amennyiben pozitív eredményt ad, vagy negatív eredmény esetén igazolt a toxicitás, vagy küszöb (limit) dózist alkalmaztak, és a kezelést a mintavételig folytatták. A tesztanyag bejuttatható osztott (split) kezeléssel, azaz ugyanazon a napon kétszer kezelnek néhány órás időközzel, megkönnyítve így a nagyobb térfogatú anyag bevitelét.

A vizsgálat kétféle módon végezhető el:

a) Az állatokat egyszer kezelik a tesztanyaggal. Legalább két alkalommal vesznek csontvelőmintát megfelelő időközökkel a kezelést követő 24. és 48. óra között. A 24. óránál korábbi mintavétel is indokolt lehet. Perifériás vérmintát legalább két alkalommal vesznek megfelelő időközökkel a 36. és a 72. óra között. Amennyiben egy mintavételi időpontban pozitív az eredmény, további mintavételre nincs szükség.

b) Amennyiben két vagy több kezelést alkalmaznak 24 órás időközökkel, csontvelővizsgálat esetén egyszer vesznek mintát az utolsó kezelést követő 18. és 24. óra között, perifériás vér vizsgálata esetén is egyszer vesznek mintát az utolsó kezelést követő 36. és 48. óra között.

Indokolt esetben más mintavételi időpontok is lehetségesek.

1.5.3. Dózisszintek

Amikor megfelelő adatok hiányában dóziskereső vizsgálatot végeznek, azt ugyanabban a laboratóriumban kell végezni ugyanazt a fajt, törzset, nemet és kezelési sémát használva, mint a tervezett fő kísérletben (13). Ha az anyag toxikus, az első mintavételi időpontra három dózisszintet állítanak be. Ezeknek a dózisszinteknek le kell fedniük a toxikustól a kissé, vagy egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi mintavételi időpontban már csak a legmagasabb dózisszintre van szükség. A legmagasabb dózis úgy határozható meg, mint amelyik toxikus tüneteket okoz, és aminél az ugyanolyan módon adott magasabb dózis várhatóan már elhullást okozna. Azok az anyagok, amelyek már alacsony, nem-toxikus dózisszinteken specifikus biológiai hatásokkal rendelkeznek (pl. a hormonok és a mitogének) kivételt képezhetnek a fenti dózisválasztási kritériumok alól, ezeknél esetről esetre kell döntenet. A legmagasabb dózist az is meghatározhatja, ha csontvelő toxicitásra utaló tünetek állapíthatók meg (az éretlen eritrociták arányának csökkenése az össz eritrocita számon belül) a csontvelőben vagy a perifériás vérben.

1.5.4. Küszöb (limit) teszt

Amikor a 2000 mg/testtömeg kg dózis egyszerre, vagy ugyanazon a napon kétszerre beadva nem okoz észrevehető toxikus tüneteket, és amikor a rokon kémiai szerkezetű vegyületekre vonatkozó adatok alapján nem is várható genotoxikus hatás, akkor a három dózisszinten végzett teljes körű vizsgálat nem tartható feltétlenül szükségesnek. A hosszabb, 14 napig tartó vizsgálat esetén a küszöbdózis 2000 mg/testtömeg kg/nap; az ennél is

hosszabb vizsgálat esetén a küszöbdózis 1000 mg/testtömeg kg/nap. Amennyiben azt, a várható emberi expozíció indokolja (igen magas és/vagy széles körű), a limit teszt végezhető magasabb dózissal is.

1.5.5. A dózisok beadása

A tesztanyagot általában gyomorszondával, vagy egy megfelelő intubációs kanüllel, esetleg intraperitoneális injekcióval adják be. Indokolt esetben más módon is bejuttatható. A gyomorszondával vagy injekcióval beadható folyadék maximális térfogata az állat testsúlyától függ. A térfogat nem haladhatja meg a 2 ml/100 testtömeg g-ot. Indokolt esetben azonban ennél több is adható. Az irritatív, és korrozív anyagok kivételével, amelyek magasabb koncentrációkban általában igen súlyos hatásúak, a dózistérfogat változtatást minimalizálni kell úgy, hogy a tesztanyag koncentrációjának beállításával minden dózisszinten azonos legyen a dózistérfogat.

1.5.6. Csontvelő/vér preparátumok készítése

A csontvelőt közvetlenül az állatok leölése után veszik általában a femurokból vagy a tibiákból. A sejtekből kenetet készítenek és megfestik a bevált módszerekkel. Perifériás vért a farokvénából veszik vagy más megfelelő érből. A vérsejteket nyomban szupravitalisan festik (8) (9) (10), vagy előbb kenetet készítenek, majd megfestik. DNS-specifikus festékekkel (pl. akridinnarancs vagy Hoechst 33258 plusz pironin-Y (15)) elkerülhetőek bizonyos, a nem DNS-specifikus festékek használata esetén képződő műtermékek. Ez az előny azonban nem zárja ki a hagyományos festékek (pl. Giemsa) használatát. További eljárások is (pl. cellulóz oszlopok használata a magvas sejtek eltávolítására (16) alkalmazhatók, amennyiben ezek igazoltan megfelelők bizonyultak a mikronukleált sejtek preparálására a laboratóriumban.

1.5.7. Mikroszkópos értékelés

Az éretlen eritrociták arányát az össz eritrocitákon (éretlen + érett) belül csontvelő esetén legalább 200, perifériás vér esetén 1000 eritrocita leszámolásával állapítják meg (17). A mikroszkópos vizsgálat előtt valamennyi lemezt, beleértve a pozitív és negatív kontrollt is, egymástól függetlenül kódolni kell. A mikronukleált éretlen eritrociták előfordulásának megállapítására állatonként legalább 2000 éretlen eritrocitát értékelnek. További információk nyerhetők a mikronukleált érett eritrociták értékelésével. Az értékelhető lemezekon az éretlen eritrociták aránya nem lehet kevesebb mint a kontroll érték 20%-a. Négy hétig, vagy annál tovább tartó kezelés esetén is állatonként legalább 2000 érett eritrocita számolható le mikronukleusz előfordulásra. Az automatikus értékelés (kép analízáló és áramlási citometria sejtszuszpenziókra) elfogadható alternatívái a kézi értékelésnek, amennyiben használata megfelelően indokolt és validált.

2. ADATFELDOLGOZÁS

2.1. Az eredmények kezelése

Az állatok egyedi adatait táblázatos formában kell megadni. A kísérleti egység az állat. Az értékelt éretlen eritrociták számát, a mikronukleált éretlen eritrociták számát, az éretlen eritrociták számát az össz eritrocita számon belül minden egyes állatra külön-külön kell megadni. Négyhetes, vagy annál hosszabb kezelés esetén, amennyiben nézték, az érett eritrocitákra vonatkozó adatokat is meg kell adni. Állatonként megadandó az éretlen eritrociták aránya az összes eritrocitán belül, és ha lehet, százalékosan a mikronukleált eritrociták előfordulása. Ha nincs bizonyítható különbség a két nem választában, akkor azok adatai összevonhatók a statisztikai értékeléshez.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

A pozitív eredmény megállapításának több kritériuma is van, mint pl. a mikronukleált sejtek számának dózisfüggő megemelkedése, vagy a mikronukleált sejtek számának egyértelmű megemelkedése egyetlen dóziscsoportban és egyetlen mintavételi időpontban. Az eredményeknek a biológiai relevanciáját kell először fontolóra venni. Az eredmények értékelésében segítséget nyújthatnak a statisztikai módszerek (18) (19), de a statisztikai szignifikancia nem lehet a pozitív eredmény megállapításának egyedüli kritériuma. A bizonytalan eredményeket további teszteléssel kell tisztázni, előnyben részesítve a kísérleti körülmények módosítását.

Az a tesztanyag, amelynek az eredményei nem elégítik ki a fenti kritériumokat, nem minősül mutagénnek ebben a tesztben.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményt ad, ritkán előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet egyértelműen állást foglalni a tesztanyag aktivitását illetően. Az eredmények az újabb kísérletek számától függetlenül bizonytalanok vagy kérdések maradhatnak.

A mikronukleusz tesztben kapott pozitív eredmény azt jelenti, hogy a tesztanyag a kromoszómák károsítása, vagy a mitotikus apparátus károsítása révén az adott faj eritroblasztjaiban mikronukleuszokat indukál. A negatív eredmény azt jelenti, hogy a vizsgálat körülményei között a tesztanyag nem indukál mikronukleuszokat az adott faj éretlen eritrocitáiban.

Állást kell foglalni abban a kérdésben, hogy a tesztanyag vagy metabolitjai bekerültek-e a vérkeringésbe, és specifikusan elérték-e a célszövetet (pl. szisztémás toxicitás).

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Tesztanyag, oldószer/vivőanyag:

– tesztanyag azonosítására szolgáló adatok, halmazállapot, releváns fiziko-kémiai adatok, ha vannak és tisztaság, ha ismert,

– a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

– a tesztanyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

– a felhasznált faj és törzs,

– az állatok száma, életkora és neme,

– származás, tartási körülmények, táp stb.,

– az állatok egyedi testsúlya, tartomány, átlag és standard deviáció minden egyes csoportra a kísérlet indításakor.

Kísérleti körülmények:

– pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontroll adatok,

– a dóziskereső kísérletre vonatkozó adatok, ha végeztek,

– a dózisszintválasztás magyarázata,

– a tesztanyag kezeléshez történő előkészítésének a részletei,

– a tesztanyag bejuttatásának részletei,

– az adás módjának magyarázata,

– amennyiben lehetséges, azoknak a módszereknek a megadása, amelyekkel igazolható, hogy a tesztanyag bejutott a keringésbe, vagy elérte a célszövetet,

– tesztanyagnak a tápban vagy az ivóvízben beállított koncentrációjának (ppm) átszámítása az aktuális dózisra (mg/tesztömeg kg/nap),

– a táp és a víz minőségének részletei,

– a kezelés és a mintavétel rendjének részletes ismertetése,

– kenetek elkészítésének módszere,

– a toxicitás megállapítására szolgáló módszerek,

– a mikronukleált éretlen eritrociták meghatározásának/leszámolásának kritériumai,

– az értékelt sejtek száma állatonként,

– a negatív, pozitív és bizonytalan eredmények kritériumai.

Eredmények:

– toxikus tünetek,

– éretlen eritrociták hányada az összes eritrociták között,

– a mikronukleált éretlen eritrociták száma állatonként megadva,

– a mikronukleált éretlen eritrociták átlaga \pm standard deviációja csoportonként,

– dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,

– az alkalmazott statisztikai módszerek,

– egyidejű és historikus negatív kontroll adatok,

– egyidejű pozitív kontroll adatok.

Az eredmények megbeszélése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187-190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9-15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61-118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The *In Vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29-80.

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555-558.

- (6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103-112.
- (7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. and Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, *Fund. Appl. Toxicol.* 14, pp. 513-522.
- (8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y. Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 245-249.
- (9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/JEMMS, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 83-98.
- (10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 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. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), *in Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293-304.
- (12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30±6h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313-319.
- (13) Fielder, R. J. Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity, Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (14) Hayashi, M., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241-247.
- (15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269-275.
- (16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.* 213. pp. 91-104.
- (17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97-99.
- (18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetics Assay, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity tests, *UKEMS Recommended Procedures, Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part 1, revised*, Cambridge University Press. Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
- (19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne. Sydney, pp. 184-232.

B.13/14. MUTAGENITÁS – BAKTERIÁLIS REVERZ MUTAGENITÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 471, Bakteriális reverz mutagenitási vizsgálat (1997) másolata.

1.1. Bevezetés

A bakteriális reverz mutagenitási teszt pontmutációk, azaz bázispárcserék és egy vagy néhány bázispár betoldásának vagy elvesztésének a kimutatására szolgál. A tesztet növekedésükhöz aminosavakat igénylő *Salmonella typhimurium* és *Escherichia coli* törzseken végzik (1)(2)(3). E bakteriális reverz mutagenitási teszt alapelve az, hogy azokat a mutációkat mutatja ki, amelyek a tesztörzsekben eleve meglévő mutációkat revertálják, helyreállítva a

baktériumoknak egy esszenciális aminosavat szintetizáló képességét. A revertált baktériumok kimutatása azon alapul, hogy azok az eredeti tesztörzs által igényelt aminosav hiányában is képesek növekedni.

A pontmutációk számos emberi genetikai megbetegedés okai, és alapvető bizonyítékok vannak rá, hogy a testi sejtek onkogénjeinek és tumor szuppresszor génjeinek pontmutációi szerepet játszanak az emberek és a kísérleti állatok daganatainak kifejlődésében. A bakteriális reverz mutagenitási teszt gyors, nem költséges és relatíve egyszerű a kivitelezése. Számos tesztörzs rendelkezik több olyan tulajdonsággal is, amelyek még érzékenyebbé teszik őket a mutációk kimutatására, mint a reverzió helyének DNS szekvenciája, a nagy molekulák iránti fokozott sejt permeabilitás, bizonyos DNS reparációs (DNA repair) rendszerek kiiktatása, vagy hibára hajlamos reparációs folyamatok serkentése. A tesztörzsek specificitása fontos információkkal szolgálhat a genotoxikus ágensek által okozott mutációk típusára nézve. A legkülönbözőbb szerkezetű vegyületek hatására nézve igen nagy adatbázis áll rendelkezésre, és jól bevált módszereket fejlesztettek ki a különböző fizikokémiai tulajdonságú – beleértve az illékony – vegyületek tesztelésére.

Lásd még: Általános bevezetés B. rész

1.2. Fogalmi meghatározások

A reverz mutációs teszt olyan mutációk kimutatására szolgál a növekedéséhez aminosavat (hisztidint vagy triptofánt) igénylő *Salmonella typhimurium* vagy *Escherichia coli* törzsekben, ami a külső aminosav ellátástól már független törzset eredményez.

Bázispárcserét okozó (base pair substitution) mutagének olyan ágensek, amelyek a DNS-ben egy bázispár kicserélődését okozzák egy másik bázispárra. Egy reverziós tesztben ez a változás megtörténhet az eredeti mutáció helyén, vagy a baktérium genom egy másik helyén.

Kereteltolódást okozó (frameshift) mutagének olyan ágensek, amelyek egy vagy több bázispár betoldását vagy elvesztését okozzák a DNS-ben, így megváltoztatják a leolvasás keretét az RNS-ben.

1.3. Alapvető megfontolások

A bakteriális reverz mutagenitási teszt prokarióta sejteket használ, amelyek számos tekintetben különböznek az emlős sejtektől, mint például a kémiai anyagok felvételében, metabolizmusában, a kromoszóma szerkezetben és a DNS reparációs folyamatokban. Az in vitro kivitelezett tesztek esetében általában egy külső (forrásból származó) metabolikus aktivációra van szükség. Az in vitro metabolikus aktivációs rendszerek képtelenek tökéletesen utánozni az emlős in vivo körülményeket. A teszt ezért nem szolgálhat közvetlen információkkal a kémiai anyagok emlősökben való mutagén és daganatkeltő potenciáljáról.

A bakteriális reverz mutagenitási teszt általánosan használatos a genotoxikus aktivitás, de különösen a pontmutációt okozó hatások első szűrésére (initial screen). Terjedelmes adatbázis bizonyítja, hogy számos vegyület, amelyik ebben a tesztben pozitív eredményt ad, az mutagén más tesztekben is. Vannak azonban példák olyan mutagén anyagokra, amelyek mutagenitása ezzel a tesztel nem mutatható ki, amit a vizsgált végpont (endpoint) speciális természete, a metabolikus aktiváció vagy a biológiai elérhetőség különbözősége magyarázhat. Másrésztől azonban, azok a tényezők, amelyek fokozzák a bakteriális mutagenitási teszt érzékenységét, a mutagén aktivitás túlbecsülésére vezethetnek.

A kémiai anyagok bizonyos osztályainak az értékelésére a bakteriális mutagenitási teszt nem bizonyult alkalmasnak, ilyenek pl. az erősen baktericid vegyületek (pl. antibiotikumok) és azok, amelyek feltehetően vagy bizonyítottan specifikusan az emlős sejtek replikációs rendszerével lépnek kölcsönhatásba (pl. néhány topoizomeráz gátló és nukleozid analóg). Ezekben az esetekben az emlős mutagenitási vizsgálatok megfelelőbbek lehetnek.

Bár számos, e tesztben pozitív eredményt adó vegyület emlősben karcinogén, a korreláció nem abszolút. Ez függ a kémiai alapszerkezettől, és vannak olyan daganatkeltők is, amelyek ezzel a tesztel nem mutathatók ki, mert más, nem genotoxikus mechanizmussal hatnak, vagy olyan mechanizmussal, ami a baktériumokból hiányzik.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

A baktérium sejtek szuszpenzióját exponálják a tesztanyaggal egy külső metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában. A lemezöntéses (plate incorporation) eljárás esetében ezeket a szuszpenziókat közvetlenül bekeverik a felülöntő agarba, és nyomban rárétegezik minimál táptalajra. Az előinkubációs (preincubation) eljárás esetében az expozíciós keveréket előbb inkubálják, és csak ezután keverik be a felülöntő agarba a minimál táptalajra való kiöntés előtt. Mindkét eljárás esetén két vagy háromnapos inkubáció után számolják le a revertáns kolóniákat, majd összevetik a számukat a oldószeres kontroll lemezekben talált spontán revertáns kolóniák számával.

A bakteriális reverz mutagenitási teszt kivitelezésére számos módszert írtak le. Ezek közül a legáltalánosabban használt a lemezöntéses módszer (1) (2) (3) (4), az előinkubációs módszer (2) (3) (5) (6) (7) (8), a fluktuációs módszer (9)(10) és a szuszpenziós módszer (11). Leírtak a gázok és a gőzök tesztelésére szolgáló módosításokat is (12).

A(z itt) leírt eljárások elsősorban a lemezöntéses és az előinkubációs módszerekre vonatkoznak. Mindkét módszer csak abban az esetben fogadható el, ha a kísérleteket egyaránt elvégzik metabolikus aktivációval és anélkül is. Néhány

vegyület hatékonyabban mutatható ki az előinkubációs módszerrel. Ezek a vegyületek olyan kémiai osztályokba tartoznak, mint a rövid szénláncú alifás nitrozaminok, a kétvegyértékű fémek, az aldehidek, az azo festékek és diazo vegyületek, a pirrolizidin alkaloidok, az allil és a nitro vegyületek (3). Kiderült az is, hogy a mutagének néhány típusa nem mindig mutatható ki standard lemezöntéses vagy előinkubációs módszerekkel. Ezeket „speciális eseteknek” kell tekinteni, és kimutatásukra kifejezetten javasolt valamilyen alternatív módszert alkalmazni. A következő „speciális eseteket” (ideértve a kimutatásukra szolgáló eljárások példáit is) lehetett megállapítani: azo festékek és diazo vegyületek (3)(5)(6)(13), gázok és illékony vegyületek (12)(14)(15)(16), glikozidok (17)(18). A standard eljárástól való eltérést szakmailag meg kell indokolni.

1.5. A tesztmódszer leírása

1.5.1. Előkészítendő preparátumok

1.5.1.1. Baktériumok

Késői logaritmusos vagy korai stationer növekedési fázisban lévő friss baktérium tenyészetet kell készíteni (mintegy 10^9 sejt/ml). Késői stationer fázisban lévő tenyészetek nem használhatók. Alapvető fontosságú, hogy a kísérlethez használt tenyészetek magas titerben tartalmazzanak életképes baktériumokat. A titer megadható a növekedési görbékre vonatkozó historikus kontroll adatokkal, vagy minden vizsgálatnál igazolható az életképes sejtek számának kiszélesztéssel történő meghatározásával.

Az ajánlott tenyésztési hőmérséklet $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Legalább öt baktériumtörzset kell használni. Ezek között szerepelnie kell legalább négy *S. typhimurium* törzsnak (TA1535, TA98, TA100 és TA1537 vagy TA97a vagy TA97), amelyekről kimutatták, hogy megbízhatóan és reprodukálhatóan reagálnak a különböző laboratóriumokban. Ez a négy *S. typhimurium* törzs a primer reverziós helyen GC bázispárral rendelkezik, és ismeretes, hogy ezek a törzsek nem mutatnak ki bizonyos oxidatív mutagéneket, keresztköti ágenseket és hidrazinokat. Ezek az anyagok azonban kimutathatók a *S. typhimurium* TA102 törzssel (19), vagy az *E. coli* WP2 törzsekkel, amelyek a primer reverziós helyen AT bázispárral rendelkeznek.

A fentiek alapján az ajánlott törzskombináció a következő:

- *S. typhimurium* TA1535, és
- *S. typhimurium* TA1537 vagy TA97 vagy TA97a, és
- *S. typhimurium* TA98, és
- *S. typhimurium* TA100, és
- *E. coli* WP2uvrA, vagy *E. coli* WP2uvrA(pKMI01), vagy
- *S. typhimurium* TA102.

A keresztköti mutagének kimutatása érdekében javasolt bevonni a TA102 törzset, vagy az *E. coli* ϵ uvrA DNS reparációs rendszerrel rendelkező törzseit (pl. *E. coli* WP2 vagy *E. coli* WP2(pKMI01)) a standard tesztörzsek közé.

Elfogadott eljárásokat kell használni a törzstenyészetek előállítására, a markerek ellenőrzésére és a törzsek tárolására. A növekedéshez szükséges aminosav igényt bizonyítani kell minden lefagyasztott törzstenyészetre (tehát hisztidin igényt a *S. typhimurium* és triptofán igényt az *E. coli* törzsekre). A többi fenotípus jegyet hasonlóan ellenőrizni kell, nevezetesen az R-faktor plazmidok jelenlétét vagy hiányát (azaz ampicillin rezisztenciát a TA98, TA100, TA97, TA97a, WP2(pKMI01) és WP2uvrA(pKMI01) törzsekben és ampicillin plusz tetraciklin rezisztenciát a TA102 törzsből), továbbá más specifikus mutációkat (azaz az rfa mutációt a kristályibolya iránti érzékenységgel a *S. typhimurium*, az uvrA mutációt az *E. coli* és az uvrB mutációt a *S. typhimurium* törzsekben az UV fény iránti érzékenységgel) (2)(3). A spontán revertánsok számának meg kell felelniük a laboratóriumi historikus kontroll alapján várt értéknek, és ami különösen fontos, bele kell essenek az irodalomban megadott tartományba.

1.5.1.2. Táptalajok

Egy megfelelő minimál agart (pl. Vogel-Bonner minimál E ingredienseket és glukózt tartalmazót) és egy felülöntő agart használnak, ami néhány osztódásra elegendő hisztidint és biotint vagy triptofánt tartalmaz (1) (2) (9).

1.5.1.3. Metabolikus aktiváció

A baktériumokat egyaránt exponálni kell a kísérleti anyaggal egy megfelelő metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorokkal kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amit enziminducerrel (mint amilyen az Aroclor 1254 (1)(2), vagy a fenobarbiturát és béta-naftoflavon kombinációja (18)(20)(21)) kezelt rágszálók májából állítanak elő. A posztmitokondriális frakció koncentrációja az S9 mixben általában az 5–30 tf% tartományba esik. A metabolikus aktivációs rendszer kiválasztása és az aktivációs körülmények függhetnek a tesztelendő anyag kémiai alapszerkezetétől. Bizonyos esetekben indokolt lehet egynél több posztmitokondriális frakció koncentrációt beállítani. Az azofestékek és a diazo vegyületek esetében a redukációs metabolikus aktivációs rendszer megfelelőbb lehet (6)(13).

1.5.1.4. Tesztanyag/Preparálás

A szilárd kísérleti anyagokat a baktériumok kezelése előtt megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni, indokolt esetben hígítani. A folyékony kísérleti anyagokat közvetlenül és/vagy megfelelő hígítás után lehet hozzáadni a rendszerhez. Friss preparátumot kell használni, kivéve ha a stabilitási adatok alapján az oldat tárolható.

Az oldószer/vivőanyag nem lehet rá gyanús, hogy képes kémiai reakcióra a tesztanyaggal, és nem befolyásolhatja a baktériumok túlélését, valamint az S9 aktivitását (22). Ha nem a jól ismert oldószerek valamelyikét alkalmazzák, akkor használatát alá kell támasztani a kompatibilitására vonatkozó adatokkal. Javasolt, hogy amennyiben lehetséges, először vizes oldószer/vivőanyag használata kerüljön megfontolásra. Vízben bomlékony anyagok tesztelése esetén vízmentes szerves oldószert kell használni.

1.5.2. Vizsgálati körülmények

1.5.2.1. Tesztörzsek (lásd 1.5.1.1.)

1.5.2.2. Dózisszintek

A kísérleti anyag legnagyobb dózisát meghatározó kritériumok közül a citotoxicitást és a végső kezelési keverékben való oldékonyságot kell figyelembe venni. A citotoxicitás és az oldékonysági viszonyok egy előkísérletben tisztázhatók. A citotoxicitást a revertáns kolóniák számának a csökkenése, a háttér (növekedés) csökkenése vagy feltisztulása, vagy a kezelt tenyészet túlélésének a csökkenése jelezheti. A kísérleti anyag citotoxicitását a metabolikus aktivációs rendszer jelenléte befolyásolhatja. A rossz oldódás a végső keverékben való kicsapódás alapján szabad szemmel állapítandó meg az aktuális kísérleti körülmények között.

A javasolt legnagyobb dózis a jól oldódó és nem citotoxikus anyagokra nézve 5 mg/lemez (5 mg/Petri-csésze) vagy 5 µl/lemez. A nem citotoxikus és 5 mg/lemez vagy 5 µl/lemez koncentrációban nem oldódó vegyületeket egy vagy több nem oldódó koncentrációban kell tesztelni. Azokat a kísérleti anyagokat, amelyek már 5 mg/lemez vagy 5 µl/lemez dózis alatt citotoxikusak, a citotoxikus dóziséig terjedő tartományban kell tesztelni. A kicsapódás nem zavarhatja a kolóniaszámolást.

A kísérleti anyagnak legalább öt különböző értékelhető dózist kell tesztelni mintegy négyzetgyök tíznek megfelelő intervallumokkal az első kísérletben. A dózis-hatás vizsgálata során előnyösebb lehet kisebb intervallumokat használni. Az 5 mg/lemez vagy 5 µl/lemez feletti dózisos tesztelése is megfontolandó, amennyiben az értékelendő anyag jelentősebb mennyiségű potenciálisan mutagén szennyezőket tartalmaz.

1.5.2.3. Negatív és pozitív kontrollok

Minden kísérletet törzsspecifikus pozitív, valamint negatív (oldószer vagy vivőanyag) kontroll beállításával kell végezni úgy metabolikus aktivációval mint anélkül. A pozitív kontrollok dózisait úgy kell megválasztani, hogy azok demonstrálják a teszt érzékenységét.

A metabolikus aktivációval végzett kísérletekben a pozitív kontroll referencia anyago(ka)t a használt baktériumtörzsek típusa alapján kell kiválasztani.

Az alábbi vegyületek szolgálhatnak metabolikus aktiváció esetén pozitív kontrollként:

Kontroll vegyület	CAS szám	EINECS szám
9,10-dimetil-antracén	781-43-1	212-308-4
7,12-dimetil-benzantracén	57-97-6	200-359-5
Benzo(a)pirén	50-32-8	200-028-5
2-amino-antracén	613-13-8	210-330-9
ciklofoszfamid	50-18-0	200-015-4
ciklofoszfamid monohidrát	6055-19-2	

Reduktív metabolikus aktivációs rendszer használata esetén a következő pozitív kontroll vegyület használandó:

Kontroll vegyület	CAS szám	EINECS szám
kongó vörös	573-58-0	209-358-4

A 2-amino-antracén nem lehet egyedüli indikátora az S9 mix alkalmazásának. A 2-amino-antracén használata esetén minden egyes S9 gyártási tételt ellenőrizni kell olyan mutagénekkel, amelyek hatásuk kifejtéséhez mikroszómális enzimek általi metabolikus aktivációt igényelnek, mint a benzo(a)pirén és a 7,12-dimetil-benzantracén.

Az alábbi vegyületek szolgálhatnak metabolikus aktiváció nélkül törzsspecifikus pozitív kontrollokként:

Kontroll vegyület	CAS szám	EINECS szám	Tesztörzs
nátrium-azid	26628-22-8	247-852-1	TA1535 és TA100
2-nitro-fluorén	607-57-8	210-138-5	TA98
9-amino-akridin	90-45-9	201-995-6	TA1537, TA97 és TA97a
ICR-191	17070-45-0	241-129-4	TA1537, TA97 és TA97a
kumén-hidroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA102
mitomycin C	50-07-7	200-008-6	TA102 és WP2 (pKM101)
N-etil-N'-nitro-N-nitrozo-guanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA és WP2uvrA (pKM101)
4-nitro-kinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA és WP2uvrA (pKM101)
furil-furamid (AF2)	3688-53-7		plazmid hordozó törzsek

Más megfelelő pozitív kontroll referencia anyagok is használhatók. Amennyiben elérhető, megfontolandó a kísérleti anyag osztályába tartozó pozitív kontroll anyag használata.

Minden kísérletbe be kell állítani oldószeres vagy vivőanyagos negatív kontrollt, ami nem tartalmazza a tesztanyagot, de a kezelésre használt oldattal/szuszpenzióval mindenben megegyező módon kell vele eljárni. Továbbá, kezeletlen kontrollt is be kell állítani, hacsak nincsenek olyan historikus kontroll adatok, amelyek bizonyítják, hogy a választott oldószernek nincs káros vagy mutagén hatása.

1.5.3. A vizsgálat kivitelezése

A lemezöntéses módszer esetén (1)(2)(3)(4) metabolikus aktiváció nélkül rendszerint 0.05 ml vagy 0.1 ml tesztanyag oldatot, 0.1 ml friss baktérium tenyészetet (ami mintegy 10^8 életképes sejtet tartalmaz), és 0.5 ml steril puffert kevernek 2.0 ml felülöntő agarhoz. Metabolikus aktiváció esetén rendszerint 0.5 ml, megfelelő mennyiségű posztmitokondriális frakciót (5–30 tf% között) tartalmazó metabolikus aktivációs rendszert kevernek a baktériumokkal és a kísérleti anyag oldatával együtt a felülöntő agarba. A kémcsövek tartalmát összekeverik és minimál agar lemezek felszínére rétegezik. Az inkubáció megkezdése előtt a felülöntő agart hagyják megszilárdulni.

Az előinkubációs módszernél (2)(3)(5)(6) a tesztanyag oldatát, a tesztörzset (mintegy 10^8 életképes baktériumot) és a steril puffert vagy a metabolikus aktivációs rendszert (0.5 ml) általában 20 percig, vagy hosszabb ideig előinkubálják 30–37 °C-on, majd hozzákeverik a felülöntő agart és rétegezik a minimál agar lemezre. Rendszerint 0.05 vagy 0.1 ml kísérleti anyag oldatot, 0.1 ml baktérium tenyészetet és 0.5 ml S9 mixet vagy puffert kevernek 2.0 ml felülöntő agarhoz. Az előinkubáció alatt a kémcsöveket rázatással levegőztetik.

A variáció megfelelő értékeléséhez minden dózisszinten minden lemezt három példányban kell elkészíteni. Szakmailag indokolt esetekben két párhuzamos is elegendő lehet. Egy-egy lemez alkalmankénti elvesztése nem szükségszerűen jelenti a kísérlet elfogadhatatlanságát.

A gázokat és az illékony anyagokat megfelelő módszerrel, lezárt kémcsövekben kell tesztelni (12)(14)(15)(16).

1.5.4. Inkubáció

Az adott kísérlet valamennyi lemezét 48–72 óráig kell inkubálni 37 °C-on. Az inkubáció után leszámolják a revertáns kolóniákat.

2. ADATFELDOLGOZÁS

2.1. Az eredmények kezelése

Az adatokat revertáns kolóniák száma per lemez formában kell megadni. Meg kell adni a pozitív és a negatív (oldószeres és kezeletlen, ha készült) kontroll lemezek revertáns kolóniáinak a számát is.

Az egyedi kolóniaszámokat, átlagukat és a standard deviációt kell megadni úgy a tesztanyaggal kezelt, mint a pozitív és a negatív (kezeletlen és/vagy oldószeres) kontroll lemezek esetében.

Egy egyértelmű pozitív eredmény igazolása (reprodukálása) nem követelmény. Bizonytalan (equivocal) eredményt további kísérlettel kísérletekkel kell tisztázni, előnyben részesítve a kísérleti körülmények módosítását. A negatív eredmény megerősítésének szükségességéről esetről esetre kell döntenet. Azokban az esetekben, ahol a negatív eredmény megerősítését nem tartják szükségesnek, azt meg kell indokolni. Az új (megerősítő) kísérletekben mérlegelni kell a vizsgálati körülmények módosítását, a vizsgált paraméterek kibővítését. A módosítható vizsgálati paraméterek közé tartoznak a dózis intervallumok, a kezelés módja (lemezöntéses vagy előinkubációs teszt) és a metabolikus aktivációs körülmények.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

A pozitív eredmény megállapításának több kritériuma is van, mint pl. a revertáns kolóniák lemezenkénti számának dóziszfüggő emelkedése a tesztelt dózistartományban és/vagy egy reprodukálható emelkedés egy vagy több dózisszinten, legalább egy törzsből, metabolikus aktivációval vagy anélkül (23). Az eredményeknek a biológiai relevanciájukat kell először fontolóra venni. Az eredmények értékelésében segítséget nyújthatnak a statisztikai módszerek (24), de a statisztikai szignifikancia nem lehet a pozitív eredmény megállapításának egyedüli kritériuma.

Az a tesztanyag, amelynek az eredményei a fenti kritériumokat nem elégték ki, nem minősül mutagének ebben a tesztben.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményt ad, ritkán, a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehetséges egyértelműen állást foglalni a tesztanyag aktivitásáról (mutagenitását) illetően. Az eredmények az újabb kísérletek számától függetlenül bizonytalanok vagy kérdések maradhatnak.

A bakteriális reverz mutagenitási tesztben kapott pozitív eredmény azt jelenti, hogy a kísérleti anyag a *Salmonella typhimurium* és/vagy az *Escherichia coli* genomban pontmutációt indukált bázispárcsere vagy kereteltolódás (frameshift) révén. A negatív eredmény azt jelenti, hogy az adott kísérleti körülmények között a kísérleti anyag nem mutagén az adott fajban.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

Tesztanyag és oldószer/vivőanyag:

- tesztanyag azonosítására szolgáló adatok, halmazállapot, releváns fiziko-kémiai tulajdonságok, tisztaság,
- az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indoklása,
- a tesztanyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Teszt törzsek:

- használt törzsek,
- tenyészetek sejt száma,
- törzsek fenotípusa.

Vizsgálati körülmények:

– a tesztanyag lemezenkénti mennyisége ($\mu\text{g}/\text{lemezben}$ vagy $\mu\text{l}/\text{lemezben}$) a dóziszválasztás logikája/magyarázata és a párhuzamos lemezek száma dózisonként,

- használt táptalajok,
- a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele, megadva az elfogadhatóság kritériumait,
- kezelési módszerek.

Eredmények:

- toxicitás jelei,
- kicsapódás jelei,
- lemezenkénti kolóniaszámok,
- a revertáns kolóniák számának az átlaga és a standard deviáció,
- dózis-válasz összefüggés, ahol lehetséges,
- statisztikai analízis, ha történt,
- egyidejű negatív (oldószeres/vivőanyagos) és pozitív kontroll adatok, átlagokkal és standard deviációkkal,
- historikus negatív (oldószeres/vivőanyagos) és pozitív kontroll adatok, a tartománnyal, átlagokkal és standard deviációkkal.

Az eredmények megbeszélése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Ohta, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986). The Salmonella typhimurium/Mammalian

Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters 1*, pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity in Microbial Tests, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part I Revised, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aesbacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity, Test for Foods, *J. Food Safety*, 8, pp. 167-177.

(9) Green, M.H. L., Muriel, W. J. Bridges. B. A. (1976). Use of a Simplified Fluctuation Test to Detect Low Levels of Mutagens, *Mutation Res.*, 38, pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress, in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F., Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780-3782.

(18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester Strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the Salmonella typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83-91.

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press. pp. 28-65.

B.15. MUTAGENITÁS – GÉN MUTÁCIÓ VIZSGÁLATA SACCHAROMYCES CEREVISIAEBEN**1. MÓDSZER****1.1. Bevezetés**

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyag

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

Több különböző *Saccharomyces cerevisiae* haploid és diploid törzs használható a kémiai anyagok által indukált génmutációk kimutatására metabolikus aktivációval vagy anélkül.

A haploid törzsek forward mutációs rendszerei, mint a vörös, növekedéséhez adenint igénylő mutánsok (*ade-1*, *ade-2*) mutációi fehér, duplán defektív (adenin-igényes) mutánsokat eredményeznek, továbbá az olyan szelektív rendszerek, mint a kanavanin és a cikloheximid rezisztencia indukciója használatosak a leginkább.

A legvalidáltabb reverz mutációs rendszerben a XV185-14C haploid törzset használják, amely az *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* és *trp 5-48* ochre nonszensz mutációkat hordozza. Ezek a mutációk olyan báziscserét okozó mutagénekre revertálnak, amelyek helyspecifikus (site specific), vagy ochre szuppresszor mutációkat indukálnak.

A XV185-14C egy *his 1-7* markert is hordoz. Ez egy misszensz mutáció, ami főként a genom egy más helyén (second site) bekövetkező mutációval revertál, végül hordoz még egy *hom 3-10* markert is, ami kereteltolódást okozó (frameshift) mutagénekre revertál.

A *S. cerevisiae* diploid törzsei közül a leginkább használt törzs a D₇, ami homozigóta a *ilv 1-92* génre.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek megadva.

1.6. A teszt módszer leírása**Előkészítendő preparátumok**

A kísérleti anyag és a kontroll oldatait megfelelő vivőanyagot használva közvetlenül a tesztelés előtt kell elkészíteni. A vízben nem oldódó szerves anyagok esetén olyan szerves oldószereket kell használni mint az etilalkohol, az acetone, vagy a dimetil-szulfoxid (DMSO) legfeljebb 2 térfogat%-ban. A vivőanyag végkoncentrációja nem befolyásolhatja lényeges mértékben a sejtek életképességét és növekedési készségét.

Metabolikus aktiváció

A sejteket a kísérleti anyaggal egyaránt kezelni kell egy megfelelő exogén metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és annak hiányában is.

A legáltalánosabban használt rendszer az enziminducerrel előkezelt rágcsálók májának posztmitokondriális frakciója, amelyet kofaktorokkal egészítenek ki. Más fajok, szövetek, posztmitokondriális frakciók, vagy más eljárások is alkalmasak lehetnek metabolikus aktivációra.

Vizsgálati körülmények**Teszt törzsek**

A haploid XV185-14C és a diploid D₇ a leggyakrabban használt törzsek a génmutációk vizsgálatára, de más törzsek is megfelelőek lehetnek.

Táptalajok

Megfelelő táptalajokat kell használni a túlélők és a mutánsok számának meghatározására.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Egyidejű pozitív, kezeletlen és oldószeres kontrollt kell beállítani. Megfelelő pozitív kontrollt kell használni minden egyes specifikus mutációs végpontra.

Dózisszintek

A kísérleti anyagnak legalább öt, egymástól megfelelő intervallumokkal eltérő dózisát kell vizsgálni. Toxikus anyagok esetében a vizsgált legnagyobb dózis nem csökkentheti a túlélést 5–10% alá. A vízben aránylag rosszul oldódó anyagokat, megfelelő módszert használva az oldékonyságuk határáig terjedő dózisban kell tesztelni. A vízben szabadon oldódó és nem toxikus anyagok legnagyobb dózisát esetről esetre kell meghatározni.

Inkubációs körülmények

A lemezeket 4–7 napig inkubálják 28-30 °C-on sötétben.

Spontán mutációs gyakoriság

Olyan szubkultúrák használhatók, amelyek spontán mutációs frekvenciája az elfogadott normális tartományon belülre esik.

Párhuzamosok száma

A génmutációval indukált reverz mutánsok (protorófofok) és a túlélők meghatározására legalább három párhuzamos lemezt kell készíteni koncentrációként. Azokban a kísérletekben, ahol a mutációs ráta alacsony, mint például a *hom 3-10* markernél, a párhuzamosok számát meg kell emelni, hogy statisztikailag megfelelően értékelhető adatokat lehessen kapni.

A vizsgálat kivitelezése

A *S. cerevisiae* törzsek kezelését rendszerint folyadékteszt (szuszpenziós) eljárással végzik növekvő (log fázisú), vagy stacioner tenyészeteket használva. Az első kísérletet növekvő sejteken kell végezni: $1-5 \times 10^7$ /ml sejtet exponálnak a kísérleti anyaggal legfeljebb 18 órán keresztül $28-37^\circ\text{C}$ -on rázatva; megfelelő mennyiségű metabolikus aktivációs rendszert is használnak a kezelés során, amennyiben szükséges. A kezelés végén a sejteket lecentrifugálják, mossák, és leültetik megfelelő táptalajokra. Az inkubáció után leszámolják a túlélőket és a mutánsokat.

Amennyiben az első kísérlet negatív, egy második kísérletet kell végezni stacioner fázisban lévő sejteket használva. Ha az első kísérlet pozitív, ez megerősítendő egy független kísérletben.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában kell közölni, megadva a kolóniaszámokat, a mutánsok számát, a túlélési és a mutációs frekvenciát. Minden eredményt meg kell erősíteni egy független kísérletben. Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel kell értékelni.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentés, amennyiben lehetséges, az alábbi információkat tartalmazza:

- használt törzs,
- vizsgálati körülmények: stacioner fázisú vagy növekvő sejtek, táptalajok összetétele, inkubáció hőmérséklete és tartama, metabolikus aktivációs rendszer,
- kezelési körülmények: dózisszintek, kezelés kivitelezése és tartama, hőmérséklet a kezelés alatt, pozitív és negatív kontrollok,
- kolóniaszámok, mutánsok száma, túlélési és mutációs frekvencia, dózis-hatás összefüggés, ha van, az adatok statisztikai értékelése,
- az eredmények megbeszélése,
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és az eredmények értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész (H).

B.16. MITOTIKUS REKOMBINÁCIÓ VIZSGÁLATA SACCHAROMYCES CEREVISIAEBEN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

*Saccharomyces cerevisiae*ben a mitotikus rekombináció kimutatható a gének között (vagy általánosabban a gén és a centromérája között) és a géneken belül. Az előbbi jelenséget mitotikus crossing-overnek nevezik, ami reciprok termékeket eredményez, az utóbbi jelenség pedig az esetek zömében nem reciprok, és gékonverzióknak nevezik. A

crossing-overt heterozigóta törzsben recesszív homozigóta kolóniák vagy szektorok indukciójának kimutatása révén vizsgálják, míg a génkonverziót prototróf revertánsok indukciójának kimutatásával vizsgálják egy olyan auxotróf heteroallél törzsben, ami két különböző defektív allélt hordozza ugyanannak a génnek. A mitotikus génkonverzió vizsgálatára a leggyakrabban használt törzsek a D₄ (ami heteroallél az *ade 2* és a *trp 5* lokuszokra), a D₇ (heteroallél a *trp 5* lokuszra), a BZ₃₄ (heteroallél az *arg 4* lokuszra) és a JD1 (heteroallél a *his 4* és a *trp 5* lokuszokra). A piros és rózsaszín homozigóta szektorok kialakulására vezető mitotikus crossing-over a D₅ vagy a D₇ törzseken vizsgálható (az utóbbin mitotikus génkonverzió és reverz mutáció is vizsgálható az *ilv 1-92* lokuszban); mindkét törzs heterozigóta az *ade 2* komplementáló allélokra.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek megadva.

1.6. A teszt módszer leírása

Előkészítendő preparátumok

A kísérleti és a kontroll anyag oldatait megfelelő vivőanyagot használva közvetlenül a tesztelés előtt kell elkészíteni. A vízben nem oldódó szerves anyagok esetén olyan szerves oldószereket kell használni mint az etilalkohol, az acetone, vagy a dimetil-szulfoxid (DMSO) legfeljebb 2 térfogat%-ban. A vivőanyag végkoncentrációja nem befolyásolhatja lényeges mértékben a sejtek életképességét és növekedési készségét.

Metabolikus aktiváció

A sejteket a kísérleti anyaggal egyaránt kezelni kell egy megfelelő exogén metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és annak hiányában is.

A legáltalánosabban használt rendszer az enziminducerrel előkezelt rágcsálók májának posztmitokondriális frakciója, amelyet kofaktorokkal egészítenek ki. Más fajok, szövetek, posztmitokondriális frakciók, vagy más eljárások is alkalmasak lehetnek metabolikus aktivációra.

Vizsgálati körülmények

Teszt törzsek

A leggyakrabban használt törzsek a diploid D₄, D₅, D₇ és JD1, de más törzsek is megfelelőek lehetnek

Táptalajok

Megfelelő táptalajok használatosak a túlélés és a mitotikus rekombináció gyakoriságának a meghatározására.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Egyidejű pozitív, kezeletlen és oldószeres kontrollt kell beállítani. Megfelelő pozitív kontroll vegyületeket kell használni minden egyes specifikus rekombinációs végpontra.

Dózisszintek

A kísérleti anyagnak legalább öt, egymástól megfelelő intervallumokkal eltérő dózist kell vizsgálni. A különböző tényezők közül elsősorban a citotoxicitást és az oldékonyságot kell figyelembe venni.

A legalacsonyabb dózis nem befolyásolhatja a sejtek életképességét. Toxikus anyagokra vonatkozóan a tesztelt legnagyobb dózis nem csökkentheti a túlélést 5–10% alá. A vízben aránylag rosszul oldódó anyagokat megfelelő módszert használva az oldékonyságuk határáig terjedő dózisban kell tesztelni. A vízben szabadon oldódó és nem toxikus anyagok legnagyobb dózist esetről esetre kell meghatározni.

A tesztanyaggal történő kezelés végezhető a sejtek stacioner vagy növekvő fázisában, de legfeljebb 18 órán keresztül. A hosszabban kezelt tenyészeteket mikroszkóposan kell ellenőrizni spóráképződésre, mivel azok értékelhetetlenné teszik a vizsgálatot.

Inkubációs körülmények

A lemezeket 4–7 napig inkubálják 28–30 °C-on sötétben. A mitotikus crossing-over révén keletkezett vörös és rózsaszín homozigóta szektorok vizsgálatára szolgáló lemezeket a kolóniaszámolás előtt egy-két napig még hűtőszekrényben (mintegy +4 °C-on) kell tartani, lehetőséget adva a megfelelően pigmentált kolóniák kifejlődésére.

A mitotikus rekombináció spontán frekvenciája

Olyan szubkultúrákat kell használni, amelyek spontán mitotikus rekombinációs frekvenciája az elfogadott normális tartományon belül van.

Párhuzamosok száma

A mitotikus génkonverzió révén indukált prototrófok és a túlélők meghatározására minimálisan három párhuzamos lemezt kell készíteni koncentrációként. Azokban a kísérletekben, ahol a mitotikus crossing-over révén létrejött recesszív homozigócia kerül meghatározásra, a párhuzamosok számát meg kell emelni, hogy biztosítani lehessen a megfelelő számú kolóniát.

A vizsgálat kivitelezése

A *S. cerevisiae* törzsek kezelését rendszerint folyadékteszt (szuszpenziós) eljárással végzik növekvő (log fázisú) vagy stacioner tenyészeteket használva. A első kísérletet növekvő sejteken kell végezni: $1-5 \times 10^7$ /ml sejtet exponálnak a kísérleti anyaggal legfeljebb 18 óráig 28–37 °C-on rázatva; megfelelő mennyiségű metabolikus aktivációs rendszert is használnak a kezelés során, amennyiben szükséges.

A kezelés végén a sejteket lecentrifugálják, mossák, és leültetik megfelelő táptalajokra. Az inkubáció után leszámolják a túlélőket és a mitotikus rekombinánsokat.

Amennyiben az első kísérlet negatív, egy második kísérletet kell végezni stacioner fázisban lévő sejteket használva. Ha az első kísérlet pozitív, ez megerősítendő egy független kísérletben.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában kell közölni megadva a kolóniaszámokat, a rekombinánsok számát, a túlélési és a rekombinációs frekvenciát.

Az eredményt meg kell erősíteni egy független kísérletben.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel kell értékelni.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS**3.1. Vizsgálati jelentés**

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

- használt törzs,
- vizsgálati körülmények: stacioner fázisú vagy növekvő sejtek, táptalajok összetétele, inkubáció hőmérséklete és tartama, metabolikus aktivációs rendszer,
- kezelési körülmények: dózisszintek, kezelés kivitelezése és tartama, hőmérséklet a kezelés alatt, pozitív és negatív kontrollok,
- kolóniaszámok, rekombinánsok száma; túlélési és rekombinációs frekvencia, dózis-hatás összefüggés, ha van, az adatok statisztikai értékelése,
- az eredmények megbeszélése,
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és az eredmények értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész (H).

B.17. MUTAGENITÁS – *IN VITRO* EMLŐS SEJT GÉN MUTÁCIÓ VIZSGÁLAT**1. MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD TG 476, *In vitro* emlős sejt génmutáció vizsgálat (1997) másolata.

1.1. Bevezetés

Az *in vitro* emlős sejt génmutáció vizsgálat a kémiai anyagok génmutációkat okozó hatásának kimutatására szolgál. A vizsgálatra megfelelő sejt vonalak az L5178Y egér limfoma sejtek, a CHO, a CHO-AS52 és a V79 kínai hörsög sejtek, valamint a TK6 humán limfoblasztoid sejtek (1). Ezekben a sejt vonalakban a leggyakrabban vizsgált genetikai végpontok (endpointok) a timidin kináz (TK), valamint a hipoxantin-guanin foszforibozil transzferáz (HPRT), és a transzgen xantin-guanin foszforibozil transzferáz (XPRT) lokuszok mutációinak kimutatása. A TK, HPRT és az XPRT mutációs tesztek a genetikai történések különböző spektrumát mutatják ki. A TK és az XPRT lokuszok autoszomális lokalizációja lehetővé teszi olyan genetikai történések (pl. nagy deléciók) detektálását, amelyek nem mutathatók ki az X kromoszóma HPRT lokuszában (2)(3)(4)(5)(6).

Az *in vitro* emlős sejt génmutáció vizsgálatához megállapodott sejt vonalak vagy törzsek tenyészeit használják. A sejteket a tenyészetben való növekedési készség és a spontán mutációs gyakoriság stabilitása alapján választják ki.

Az *in vitro* kivitelezett tesztek esetében általában egy külső (forrásból származó) metabolikus aktivációra van szükség. Ez az *in vitro* metabolikus aktivációs rendszer azonban képtelen tökéletesen utánozni az emlős *in vivo* körülményeket. Gondosan kerülni kell azokat a körülményeket, amelyek pozitív eredményre vezetnek, de nem valódi mutagén hatás révén. Okozhatják például a pH és ozmolalitás változások vagy kifejezett citotoxikus hatás (7).

Ezt a vizsgálatot a lehetséges emlős mutagének és karcinogének szűrésére használják. Számos vegyület van, amelyik ebben a tesztben pozitív eredményt ad és emlősben daganatkeltő, de nincs teljes korreláció az *in vitro* génmutáció vizsgálat eredménye és a karcinogenitás között. A korreláció függ az adott kémiai osztálytól, és egyre több bizonyíték van rá, hogy azok a daganatkeltők, amelyek ezzel a tesztel nem mutathatók ki, nem közvetlen DNS-károsító hatás révén, hanem más mechanizmussal fejtik ki hatásukat (6).

Lásd még: Általános bevezetés B. rész

1.2. Fogalmi meghatározások

Előre/oda (forward) mutáció: egy génmutáció a szülői (vad) típusból a mutáns típusba, ami a kódolt protein enzimaktivitásának megváltozására vagy elvesztésére vezet.

Bázispárcserét okozó (base pair substitution) mutagének: olyan anyagok, amelyek a DNS-ben egy vagy több bázispár kicserélődését okozzák egy vagy több másik bázispárra.

Kereteltolódást okozó (frameshift) mutagének: olyan anyagok, amelyek egy vagy több bázispár betoldását, vagy elvesztését okozzák a DNS-ben.

Fenotípus kifejeződési (expressziós) idő: az az időtartam, ami alatt az eredeti (vad) géntermék kiürül az újonnan mutálódott sejtől.

Mutációs gyakoriság/ráta (mutant frequency): az észlelt mutáns sejtek száma osztva az életképes sejtek számával.

Relatív össznövekedés: a sejt szám emelkedése egy adott idő alatt összehasonlítva a kontroll populációval; a kontrollhoz viszonyított (relatív) szuszpenziós növekedés szorozva a kontrollhoz viszonyított (relatív) klónképző képességgel.

Relatív szuszpenziós növekedés: a kontrollhoz viszonyított sejt szám emelkedés az expressziós periódus alatt.

Életképesség (viability): a kezelt sejtek klónképző képessége az expressziós periódus után a szelektív médiumba való leültetés idején.

Túlélés (survival): a kezelt sejtek klónképző képessége a kezelési periódus után; a túlélést rendszerint a kontroll populációhoz viszonyítva adják meg.

1.3. A teszt módszer alapelve

A TK⁺ TK⁻ mutáció miatt timidin kináz deficiens sejtek rezisztensek a pirimidin bázisanalóg trifluoro-timidin (TFT) citotoxikus hatása iránt. A timidin kináz proficiens sejtek érzékenyek a TFT iránt, ami a celluláris metabolizmus gátlását, és a további sejtosztódások leállítását okozza. Ezért csak a mutáns sejtek képesek TFT jelenlétében nőni, míg a normális sejtek, amelyek tartalmazzák a TK-t, nem. Hasonlóképpen, a HPRT és XPRT deficiens sejtek kisselektálhatók 6-tioguaninnal (TG), vagy 8-azaguaninnal (AG). Minden génmutációs tesztben különös gondot kell fordítani a tesztvegyület tulajdonságaira, amennyiben bázisanalógot vagy a szelektív ágenshez hasonló vegyületet tesztelnek. Például a tesztanyagoknak minden, a mutáns és a nem-mutáns sejtekre szelektív toxicitásának a gyanúját ki kell vizsgálni. Amennyiben a szelektív ágenshez hasonló vegyületet tesztelnek, a szelektációs rendszer/ágens hatékonyságát igazolni kell (8).

A szuszpenziós vagy monolayer (egy rétegben növe) tenyészetben lévő sejteket megfelelő ideig kezelik a tesztanyaggal metabolikus aktivációval és anélkül is, majd szubkultúrákat készítenek a citotoxicitás meghatározására, és a mutáns fenotípus kifejeződésére a szelekció előtt (9)(10)(11)(12)(13). A citotoxicitás felmérésére általában a relatív klónképző képességet (túlélést) vagy a tenyészetek relatív össznövekedését határozzák meg a kezelési periódus végén. A kezelt tenyészeteket, a vizsgált lokusztól és sejttypustól függően, annyi ideig tartják fenn megfelelő tápfolyadékban, amennyi az indukált mutáció közel optimális fenotípusos kifejeződéséhez szükséges. A mutációs gyakoriságot úgy határozzák meg, hogy ismert számú sejtet ültetnek le szelektációs ágenset tartalmazó tápfolyadékba a mutáns sejtek kimutatására, és szelektációs ágenset nem tartalmazó tápfolyadékba a klónképző képesség (életképesség) megállapítására. Megfelelő inkubációs idő után leszámolják a kolóniákat. A mutációs gyakoriság a szelektív médiumban talált mutáns kolóniák számából és a nem szelektív médiumban talált kolóniák számából vezethető le.

1.4. A teszt módszer leírása

1.4.1. Előkészítendő anyagok

1.4.1.1. Sejtek kiválasztása

A génmutáció vizsgálat kivitelezéséhez számos sejt vonal elérhető, így az L5171Y, a CHO, a CHO-ASS2, a V79 vagy a TK6 sejtek szubklónjai. Az erre a célra használt sejteknek a kémiai mutagének iránt igazolt érzékenységgel, valamint magas klónképző képességgel és stabil spontán mutációs gyakorisággal kell rendelkezni. A sejteket rendszeresen ellenőrizni kell mycoplasma fertőzöttségre, ha fertőzöttek nem használhatók.

A vizsgálatot előre meghatározott érzékenységre és teljesítőképességre kell tervezni. A használt sejtek és tenyészetek számában és a tesztanyag-koncentrációkban fejeződjenek ki ezek a meghatározott paraméterek (14). A kezelést túlélő életképes sejtek minimális számának, amelyeket a teszt minden egyes szakaszában használnak, a spontán mutációs gyakoriságon kell alapulnia. Általános, a sejt számra vonatkozó irányelv, hogy legyen a spontán mutációs gyakoriság inverzének a tízszerese, de legalább 10^6 sejt az ajánlott. A tesztrendszerre vonatkozó adekvát historikus adatokkal kell rendelkezni, amelyek jelzik a teszt konzisztens kivitelezését.

1.4.1.2. Tápfolyadékok és tenyésztési körülmények

Megfelelő tápfolyadékokat és inkubációs körülményeket (tenyésztő edények, CO_2 koncentráció, hőmérséklet és páratartalom) kell biztosítani a tenyészetek fenntartására. A tápfolyadékokat a szelekciós rendszer és a sejt típus figyelembevételével kell megválasztani. Különösen fontos az, hogy a tenyésztési körülményeket úgy kell megválasztani, hogy azok optimális körülményeket biztosítsanak a sejtek növekedéséhez az expressziós periódus alatt, valamint a mutáns, és a nem-mutáns sejtek kolóniaképzése alatt.

1.4.1.3. A tenyészetek előkészítése

A sejteket törzstenyészetekből szaporítják fel, leültetik tápfolyadékba és 37°C -on inkubálják. Szükség esetén a tenyészeteket meg kell tisztítani az eleve bennük lévő (preegzisztáló) mutáns sejtektől.

1.4.1.4. Metabolikus aktiváció

A sejteket exponálni kell a kísérleti anyaggal egy megfelelő metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában is. A legáltalánosabban használt rendszer a kofaktorokkal kiegészített posztmitokondriális frakció (S9), amit enziminducerrel [mint amilyen az Aroclor 1254 (15)(16)(17)(18) vagy a fenobarbiturát és béta-naftoflavon kombinációja (19)(20)] kezelt rágcslók májából állítanak elő.

A posztmitokondriális frakciót általában 1–10 tf% koncentráció tartományban használják a végtérfogatban. A metabolikus aktivációs rendszer kiválasztása és az aktivációs körülmények függhetnek a tesztelendő kémiai anyag osztályától. Bizonyos esetekben indokolt lehet egynél több posztmitokondriális frakció koncentráció beállítására.

A fejlesztések között megemlítendő a genetikailag módosított sejt vonalak, amelyekben olyan specifikus aktivációs enzimek nyilvánulnak meg (expresszálnak), amelyek endogén aktivációs készséget biztosíthatnak a sejteknek. A sejt vonal kiválasztását szakmailag indokolni kell (pl. a citokróm P450 izoenzim relevanciája a tesztanyag metabolizmusával).

1.4.1.5. A tesztanyag előkészítése

A szilárd tesztanyagokat a sejtek kezelése előtt megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni, szükség esetén hígítani. A folyékony tesztanyagokat lehet közvetlenül adni a tesztrendszerhez, vagy hígítás után. Frissen preparált tesztanyagot kell használni. Kivételt csak akkor lehet tenni, amikor a stabilitásra vonatkozó adatok megengedik a tárolást.

1.4.2. Kísérleti körülmények

1.4.2.1. Oldószer/vivőanyag

Az oldószer/vivőanyag nem lehet rá gyanús, hogy képes kémiai reakcióba lépni a tesztanyaggal, és nem befolyásolhatja a sejtek túlélését és az S9 aktivitását. Amennyiben nem a jólismert oldószerek/vivőanyagok valamelyikét használják, a választott oldószer/vivőanyag kompatibilitását adatokkal kell igazolni. Ajánlott, hogy amennyiben lehetséges, először vizes oldószer/vivőanyag használata kerüljön megfontolásra. Amennyiben a tesztanyag vízben bomlik, vízmentes szerves oldószert kell használni. A víz molekuláris szűrővel távolítható el.

1.4.2.2. Dóziszintek

A legmagasabb dózist megszabó kritériumok közül a citotoxicitás, az oldékonyság a tesztrendszerben, változások a pH-ban és az ozmolalításban igényelnek megfontolást.

A citotoxicitást a fő kísérletben metabolikus aktivációval és anélkül is meg kell határozni megfelelő mutatókat használva a sejtek integritására és növekedésére, mint amilyen a relatív klónképző készség, vagy a relatív össznövekedés. Az oldékonyságot és a citotoxicitást egy előkísérletben célszerű meghatározni.

Legalább 4 értékelhető koncentrációt kell beállítani. Ha az anyag citotoxikus, a koncentráció tartomány a maximálistól a már csak kissé, vagy egyáltalán nem toxikusig terjedjen; ez rendszerint azt jelenti, hogy a koncentrációk ne nagyobb, mint kettő és négyzetgyök tíz közé eső faktoral különbözzenek egymástól. Amennyiben a legmagasabb dózis a citotoxicitáson alapul, akkor az vezessen megközelítőleg 10–20% (de 10%-nál nem kevesebb) relatív túlélésre (relatív klónképző készségre) vagy relatív össznövekedésre. A relatíve nem-toxikus anyagok esetén a legmagasabb dózis legyen 5 mg/ml, 5 μl /ml vagy 0.01 M, amelyek a legalacsonyabb koncentrációjú közülük.

A rosszul oldódó anyagokat – a tesztelési körülmények között megállapított oldékonyságuk határáig terjedő, vagy azt meghaladó dózisokban kell tesztelni. Az oldhatatlanság tényét a végső kezelési médiumban kell meghatározni, amiben a sejtek expozíciója történik. Hasznos lehet az oldékonyságot a kezelés elején és végén is megállapítani, mivel az változhat az expozíció alatt a sejtek, az S9, a szérum stb. jelenléte miatt. Az oldódás hiánya szabad szemmel megállapítható. A kicsapódás nem zavarhatja a számolást/értékelést.

1.4.2.3. Negatív és pozitív kontrollok

Minden tesztbe be kell állítani egyidejű pozitív és negatív (oldószeres vagy vivőanyag) kontrollt úgy metabolikus aktivációval, mint anélkül. Metabolikus aktiváció használata esetén olyan pozitív kontroll vegyületet kell választani, amelyik mutagén hatásának kifejtéséhez metabolikus aktivációt igényel.

A következő anyagok lehetnek például pozitív kontrollok:

Aktivációs körülmények	Lokusz	Pozitív kontroll	CAS szám	EINECS szám
Exogén metabolikus aktiváció nélkül	HPRT	etil-metán-szulfonát	62-50-0	200-536-7
		N-etil-N-nitrozo-karbamid	759-73-9	212-072-2
	TK*	metil-metán-szulfonát	66-27-3	200-625-0
		XPRT	etil-metán-szulfonát	62-50-0
	N-etil-N-nitrozo-karbamid		759-73-9	212-072-2
	Exogén metabolikus aktivációval	HPRT	3-metil-kolantrén	56-49-5
N-nitrozo-dimetil-amin			62-75-9	200-549-8
7,12-dimetil-benzantracén			57-97-6	200-359-5
TK*		ciklofoszfamid	50-18-0	200-015-4
		ciklofoszfamid monohidrát	6055-19-2	
		Benzo(a)pirén	50-32-8	200-028-5
		3-metil-kolantrén	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-nitrozo-dimetil-amin (magas S9 koncentráció)	62-75-9	200-549-8
			Benzo(a)pirén	50-32-8

* (kis és nagy kolóniák)

Más, megfelelő pozitív kontroll vegyület is használható, pl. ha a laboratórium rendelkezik historikus adatbázissal a 5-bróm-2'-dezoxi-uridinre (CAS szám: 59-14-3, EINECS szám: 200-415-9), akkor ez szintén használható referencia anyagként. Amennyiben elérhető, megfontolandó a kísérleti anyag osztályába tartozó pozitív kontroll anyag használata. Negatív kontrollokat (amikor csak oldószer vagy vivőanyag kerül a kezelési médiumba, de ugyanúgy kell velük bánni mint a kezelt tenyészetekkel) minden mintavételi időpontra be kell állítani. Kezeletlen kontrollt is vizsgálni kell, ha csak nincs rá historikus adat, hogy a választott oldószernek nincs káros vagy mutagén hatása.

1.4.3. A vizsgálat kivitelezése

1.4.3.1. Kezelés a tesztanyaggal

A proliferáló sejteket metabolikus aktivációval és anélkül is meg kell kezelni a tesztanyaggal. A kezelésnek megfelelő ideig kell tartania (rendszerint 3–6 óra a megfelelő). Az kezelési időt ki lehet terjeszteni egy vagy több sejtciklus tartamára.

Egy vagy két kezelt tenyészetet állítanak be minden koncentrációra. Amennyiben egy tenyészetet használnak koncentrációnként, a koncentrációk számát meg kell emelni, hogy megfelelő számú tenyészet maradjon az értékeléshez (pl. legalább nyolc értékelhető koncentráció). A negatív/oldószeres kontrollhoz két párhuzamos tenyészetet kell beállítani.

Gázokat vagy illékony anyagokat megfelelő módszerekkel, lezárt tenyésztőedényekben kell tesztelni (21) (22).

1.4.3.2. A túlélés, életképesség és a mutációs gyakoriság meghatározása

A kezelési periódus végén a sejteket mossák, begyűjtik és leültetik a klónképző készség meghatározásához és a mutáns fenotípus kifejeződéséhez. A citotoxicitás vizsgálatára a tenyészetek relatív klónképző képességét (túlélés), vagy a relatív össznövekedést határozzák meg, amit rendszerint a kezelési periódus lejártá után kezdenek el.

Minden lokuszra van szüksége van egy meghatározott minimális időre az újonnan indukált mutánsok megközelítőleg optimális fenotípusos kifejeződéséhez (HPRT és XPRT lokuszok legalább 6–8 napot, a TK lokusz legalább 2 napot igényel). A sejteket szelektív ágenst tartalmazó és szelektív ágenst nem tartalmazó tápfolyadékban tenyésztik a mutánsok számának és a klónképző képességnek a meghatározásához. Az életképesség meghatározásához (amit a mutációs gyakoriság kiszámításához használnak) a sejteket nem-szelektív médiumba ültetik le az expressziós periódus végén.

Ha a kísérleti anyag pozitív eredményt adott az L5178Y TK⁺ tesztben, akkor kolónia méretmeghatározást kell végezni legalább egy kezelt tenyészetben (a legmagasabb pozitív eredményt adó dózisszinten), valamint a negatív és a pozitív kontrollokban. Amennyiben a TK⁺ teszt negatív eredményt adott, a kolónia méretmeghatározást csak a negatív és a pozitív kontrollban kell elvégezni. Kolónia méretmeghatározás végezhető a TK6-TK⁺ vizsgálat során is.

2. ADATFELDOLGOZÁS

2.1. Az eredmények kezelése

Az eredmények tartalmazzák a kezelt és kontroll tenyészetekre vonatkozó citotoxicitás és túlélés meghatározást, kolóniaszámokat és a mutációs gyakoriságot.

Az L5178Y TK⁺ tesztben kapott pozitív eredmény esetén, kolónia méretmeghatározást kell végezni a „kis” és a „nagy” kolóniák kritériumait használva legalább egy kezelt tenyészetben (a legmagasabb pozitív eredményt adó dózisszinten), valamint a negatív és a pozitív kontrollban. A kis és a nagy kolóniát képező mutánsok molekuláris és citogenetikai hátterét részletesen feltárták (23)(24). A TK⁺ tesztben a kolóniákat normálisan növekvő (nagy) és lassan növekvő (kis) kolóniák kritériumai alapján értékelik (25). Azok a mutáns sejtek, amelyek a legsúlyosabb genetikai károsodást szenvedték el, hosszabb megkettőződési idővel bírnak, így csak kis kolóniákat képeznek. Ez a károsodás a teljes gén elvesztésétől a kariotípusosan látható kromoszóma aberrációkig terjed. A kis kolónia mutációt indukáló képesség társul a vegyületek nagy kromoszóma aberrációkat okozó képességével (26). A kevésbé súlyosan károsodott mutáns sejtek növekedési rátája hasonló a szülői sejtekéhez, így nagy kolóniákat képeznek.

Meg kell adni a túlélést (relatív klónképző készség) vagy a relatív össznövekedést. A mutációs gyakoriságot mutáns sejtek száma per túlélő sejtek száma formában kell kifejezni.

Meg kell adni a tenyészetek egyedi adatait. Végül valamennyi adatot táblázatos formában kell összefoglalni.

Az egyértelműen pozitív eredmény igazolása (reprodukálása) nem követelmény. A bizonytalan eredményeket további teszteléssel kell tisztázni, előnyben részesítve a kísérleti körülmények módosítását. A negatív eredmény megerősítésének szükségességéről esetről esetre kell dönten. Azokban az esetekben, amelyekben a negatív eredmény megerősítését nem tartják szükségesnek, azt meg kell indokolni. Negatív vagy bizonytalan eredmények esetén végzendő új kísérletben mérlegelni kell a vizsgálati körülmények/paraméterek módosítását/kibővítését. Módosítható vizsgálati paraméterek lehetnek a dózis intervallumok és a metabolikus aktivációs körülmények.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

A pozitív eredmény megállapításának több kritériuma is van, mint pl. a mutációs gyakoriság dóziszfüggő vagy reprodukálható megemelkedése. Az eredményeknek a biológiai vonatkozását kell először fontolóra venni. Az eredmények értékelésében segítséget nyújthatnak a statisztikai módszerek, de a statisztikai szignifikancia nem lehet a pozitív eredmény megállapításának egyedüli kritériuma.

Az a tesztanyag, amelynek az eredménye nem elégti ki a fenti kritériumokat, nem minősül mutagénnek ebben a rendszerben.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményt fog adni, ritkán előfordulhat, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet egyértelműen állást foglalni a tesztanyag aktivitását illetően. Az eredmények az újabb kísérletek számától függetlenül bizonytalanok vagy kérdésesek maradhatnak.

Az *in vitro* emlős sejt génmutáció tesztben kapott pozitív eredmény azt jelenti, hogy a tesztanyag génmutációkat indukál a használt emlős sejttenyészetben. Egy reprodukálható pozitív dózis-válasz a legsokatmondóbb. A negatív eredmény azt jelenti, hogy a vizsgálat körülményei között a tesztanyag nem indukál génmutációkat az emlős sejtek tenyészetében.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Tesztanyag, oldószer/vivőanyag:

– tesztanyag azonosítására szolgáló adatok, halmazállapot, releváns fiziko-kémiai adatok, ha vannak és a tisztaság, ha ismert,

– az oldószer/vivőanyag kiválasztásának indoklása,

– a tesztanyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Sejtek:

– a sejtek típusa és származása,

– tenyészetek száma,

– passzálások száma, ha alkalmazható,

– a sejttenyészet fenntartásának módszere, ha alkalmazható,

– mycoplasma fertőzés hiánya.

Kísérleti körülmények:

– a dóziszintválasztás és a sejt kultúrák számának a magyarázata, pl. citotoxicitási adatok és a korlátozott oldékonyságra vonatkozó adatok, ha vannak,

– tápfolyadék összetétele, CO₂ koncentráció,

- a tesztanyag koncentrációja,
- a tenyészethez adott tesztanyagoldat térfogata,
- inkubációs hőmérséklet,
- inkubációs idő,
- a kezelés tartama,
- sejtdenzitás a kezelés alatt,
- a metabolikus aktivációs rendszer típusa és összetétele, elfogadhatóságának kritériumai,
- pozitív és negatív kontrollok,
- expressziós periódus tartama (beleértve a leültetett sejtek számát, szubkulturák indítását, és a tápfolyadékcsere rendjét, ha volt),
- szelekciós ágens,
- a negatív, pozitív és bizonytalan eredmények kritériumai,
- az életképes és mutáns sejtek leszámolásának módszerei,
- a méretük és típusuk alapján figyelembe vett kolóniák meghatározása (beleértve a „kis” és „nagy” kolóniák kritériumait, ha alkalmazható).

Eredmények:

- toxikus tünetek,
- kicsapódás jelei,
- a kezelési médium pH-jára és ozmolalitására vonatkozó adatok, ha meghatározták,
- kolónia méretek, ha meghatározták, legalább a negatív és pozitív kontrollban,
- labormegfeleléség a kis kolóniák kimutatására az L5178Y TK^{+/−} rendszerben, ha alkalmazható,
- dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,
- az alkalmazott statisztikai módszerek, ha voltak,
- egyidejű negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatok,
- historikus negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatok, a tartományokkal, átlagokkal és a standard deviációkkal,
- a mutációs gyakoriság.

Az eredmények megbeszélése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

- (1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F. J and Tindal, K.R. (eds.) (1987), *Banbury Report 28; Mammalian Cell Mutagenesis*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- (2) Chu, E.H.Y. and Malling H.V. (1968), *Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells In Vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61, pp. 1306-1312.
- (3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982), *Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts*, *Mutation Res.* 94, pp. 467-485.
- (4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989), *Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci*, *Mutagenesis*, 4, pp. 394-403.
- (5) Aaron, C.S., and Stankowski, Jr. L.F., (1989), *Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates*, *Mutation Res.* 223, pp. 121-128.
- (6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr. L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994), *Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures*. *Mutation Res.* 312, pp. 235-239.
- (7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991), *Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9*, *Mutation Res.* 257, pp. 147-204.
- (8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavournin, K. H. (1983), *Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*, *Mutation Res.*, 115, pp. 225-251.
- (9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), *A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program*, *Mutation Res.*, 196, pp. 17-36.

- (10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W.N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., O'Neill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 135-141.
- (11) Liber, H. L., Yandell, D. W. and Little, J. B. (1989), A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus, *Mutation Res.*, 216, pp. 9-17.
- (12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp.133-147.
- (13) Turner, N. T., Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure for the L5178Y/TK^{+/-} – TK^{+/-} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay, in: Kilbey, B. J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239-268.
- (14) Arlett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. C. (1989), Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation, in: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
- (15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzacoro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, pp. 365-373.
- (16) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31, pp. 347-364.
- (17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK^{+/-} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, pp. 61-108.
- (18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, pp. 173-215.
- (19) Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in: *In Vitro Genotoxicity Assays*, *Mutagenesis* 7, pp. 175-177.
- (20) Matsushima, T., Sawamura M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer 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: Ticc. R. R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds), *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, New York, Plenum, pp. 91-103.
- (22) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental Mutagenesis*, 5, pp. 795-801.
- (23) Applegate, M. L., Moore, M. M., Broder, C. B., Burrell, A. and Hozier, J. C. (1990), Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, pp. 51-55.
- (24) Moore, M. M., Clive, D., Hozier, J. C., Howard, B. E., Batson, A. G., Turner, N. T. and Sawyer, J. (1985), Analysis of Trifluorothymidine, Resistant (TFT⁺) Mutants of L5178Y/TK^{+/-} – Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 161-174.
- (25) Yandell, D.W., Dryja, T. P. and Little, J. B. (1990), Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells, *Mutation Res.* 229, pp. 89-102.
- (26) Moore, M. M. and Doerr, C. L. (1990), Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/-} – 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells, *Mutagenesis*. 5, pp. 609-614.

B.18. DNS-KÁROSODÁS ÉS REPARÁCIÓ – NEM TERVEZETT DNS-SZINTÉZIS (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) VIZSGÁLAT EMLŐS SEJTEN IN VITRO**1. MÓDSZER****1.1. Bevezetés**

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

A nem tervezett DNS-szintézis (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) teszt a reparáció (DNA repair = DNS reparáció) DNS-szintézist vizsgálja, ami a kémiai és fizikai ágensek által okozott DNS-károsodást tartalmazó szekvencia kivágása és eltávolítása után következik be. A teszt az emlős sejtek DNS-ébe történő olyan triciált timidin (³H-TdR) beépülésének a mérésén alapul, ami nem a sejtcilus S fázisában következik be. A kezelt sejtek DNS-ébe történő triciált timidin felvétel meghatározása történhet autoradiográfiás vagy folyadék szcintillációs (liquid scintillation counting, LSC) módszerrel. Az emlős sejtenyészeteket – amennyiben nem primer patkány májsejt tenyészetéről van szó – a kísérleti anyaggal egy exogén metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és anélkül egyaránt kezelni kell. Az UDS vizsgálható *in vivo* rendszerekben is.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek megadva.

1.6. A teszt módszer leírása

Előkészítendő anyagok

A vizsgálathoz a kísérleti és a kontroll vagy referencia anyagokat tápfolyadékban vagy más megfelelő vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni, majd tovább hígítani tápfolyadékkal. A vivőanyag végkoncentrációja a tápfolyadékban nem befolyásolhatja a sejtek életképességét.

Patkány májsejtek és humán limfociták primer tenyészetei, vagy megállapodott (established) sejt vonalak (mint pl. humán diploid fibroblasztok) használhatók a vizsgálathoz.

A sejteket (amennyiben nem primer patkány májsejtekről van szó) egy megfelelő metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában egyaránt meg kell kezelni a kísérleti anyaggal.

Kísérleti körülmények

A tenyészetek száma

Autoradiográfiás UDS-módszer használata esetén legalább két tenyészet, míg LSC-s UDS-módszer esetén pedig hat (szakmailag indokolt esetben kevesebb) tenyészet vizsgálata szükséges minden tesztpontra.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Egyidejű pozitív és negatív (kezeletlen és/vagy vivőanyag) kontrollokat kell beállítani metabolikus aktivációval és anélkül minden kísérletbe.

A patkány májsejteken végzett vizsgálat esetén pozitív kontrollok lehetnek a 7,12-dimetil-benzantracén (7,12-DMBA) vagy a 2-acetamido-fluorén (2-AAF). Megállapodott sejtenyészetek esetén – függetlenül attól, hogy autoradiográfiás vagy LSC módszert használnak – metabolikus aktiváció nélkül a 4-nitro-kinolin-N-oxid, míg metabolikus aktivációval a dimetil-nitrozamin lehet a pozitív kontroll.

Dózisszintek

A kísérleti anyagnak több koncentrációját kell használni egy olyan tartományban, ami alkalmas a hatás megállapítására. A legmagasabb dózisnak bizonyos citotoxikus hatást kell mutatnia. A vízben aránylag rosszul oldódó anyagokat az oldékonyságuk határáig terjedő dózisban kell tesztelni. A vízben szabadon oldódó és nem toxikus anyagok legnagyobb dózisát esetről esetre kell meghatározni.

Sejtek

Megfelelő tápfolyadékok, CO₂ koncentráció, hőmérséklet és páratartalom szükséges a tenyészetek fenntartására. A megállapodott sejt vonalakat rendszeresen ellenőrizni kell mycoplasma fertőzésre.

Metabolikus aktiváció

Primer patkány májsejt tenyészetekhez nincs szükség exogén metabolikus aktivációs rendszerre. Megállapodott sejt vonalak és limfociták kezelését egyaránt el kell végezni metabolikus aktivációval és anélkül.

A vizsgálat kivitelezése

Tenyészetek készítése

Megállapodott sejtvonalakat törzstenyészetekből indítanak (tripszinezéssel vagy lerázással), megfelelő sejtszámmal leültetik szövettenyésztő edényekbe és 37 °C-on inkubálják.

A patkány májsejtek rövidtávú (short term) tenyészeit frissen izolált májsejtekkel kell indítani olyan tápfolyadékban, ami lehetővé teszi a sejtek letapadását a növekedésre szánt felülethez.

Humán limfocita tenyészeteket megfelelő technikák alkalmazásával kell indítani.

A tenyészetek kezelése a kísérleti anyaggal

Primer patkány májsejtek

Frissen izolált patkány májsejteket megfelelő ideig kezelik a tesztanyaggal a ³H-TdR-tartalmú tápfolyadékban. A kezelési periódus végén a tápfolyadékot le kell szívni a sejtekről, majd a sejteket öblíteni, fixálni és szárítani kell. A lemezeket autoradiográfiás emulzióba merítik (alternatívaként filmszalag is használható), exponálják, előhívják, festik és leszámolják a szemcséket (grains).

Megállapodott sejtvonalak és limfociták

Autoradiográfiás módszer: a sejttenyészetet megfelelő ideig exponálják a kísérleti anyaggal, majd megkezelik ³H-TdR-nel. Az expozíciós időket a kísérleti anyag tulajdonságai, a metabolikus aktivációs rendszer aktivitása és a sejttípus szabja meg. Az UDS csúcs kimutatására, a ³H-TdR-t a kísérleti anyaggal együtt, vagy néhány percen belül a kísérleti anyaggal való kezelés után kell adni. A két eljárás közötti választást befolyásolja a lehetséges interakció a kísérleti anyag és a ³H-TdR között. Az UDS és a szemikonzervatív replikáció elkülönítésére az utóbbi gátolható pl. arginin-hiányos vagy alacsony szerum tartalmú tápfolyadékkal és hidroxikarbammiddal.

Az UDS LSC-s meghatározása: a kísérleti anyaggal való kezelés megkezdése előtt a fent leírt módszerekkel gátolni kell a sejtek S-fázisba jutását, majd a sejteket kezelni kell a kísérleti anyaggal az autoradiográfiás módszernél leírtak szerint. Az inkubációs periódus végén extrahálni kell a DNS-t a sejtekből, és meg kell határozni az össz DNS tartalmat és a ³H-TdR beépülés mértékét.

Rá kell mutatni, hogy amennyiben a humán limfocita tenyészet nincs stimulálva, a szemikonzervatív DNS replikáció gátlása szükségtelen.

Értékelés

Autoradiográfiás meghatározás

Az UDS sejttenyészetben történő meghatározása esetén az S-fázisú sejtmagokat nem számolják. Dózionként legalább 50 sejtet kell értékelni. Számolás előtt a lemezeket kódolni kell. Számos jól elkülönült random mezőt kell leszámolni minden lemezen. A citoplazmába beépült ³H-TdR mennyiségét minden egyes sejtben három sejtmagnyi területen kell leszámolni.

LSC-s meghatározás

Az UDS LSC-s meghatározása esetén megfelelő számú tenyészetet kell használni minden dózisszinten és kontrollban.

Minden eredményt egy független kísérletben kell megerősíteni.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában kell megadni.

2.1. Autoradiográfiás meghatározások

A ³H-TdR citoplazmatikus beépülésének mértékét és a sejtmagra eső szemcsék számát külön-külön kell megadni.

Átlag, medián és a módusz használható a citoplazmatikus ³H-TdR beépülés megoszlásának és a sejtmagonkénti szemcseszámoknak a megadásához.

2.2. LSC-meghatározások

LSC-s meghatározásokra a ³H-TdR beépülését dpm/μg DNS-formában kell megadni. A dpm/μg DNS átlagának és szórásának a megadása használható a beépülés megoszlásának a jellemzésére.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel kell értékelni.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentés, amennyiben lehetséges, tartalmazza az alábbi információkat:

- felhasznált sejtek, sejtszám és a passzálások száma a kezelés idején, tenyészetek száma,
- a sejttenyészetek fenntartásának módszerei, beleértve tápfolyadékokat, hőmérsékletet és a CO₂ koncentrációt,
- tesztanyag, vivőanyag, dózisszintek, a vizsgálatban alkalmazott dózisszintek kiválasztásának magyarázata,
- metabolikus aktivációs rendszer részletei,
- kezelés rendje,

- pozitív és negatív kontrollok,
- használt autoradiográfiás technika,
- az S fázisba való belépés gátlásának módszere,
- az LSC-s módszerrel kapcsolatban a DNS extrakció módjának és az össz DNS-tartalom meghatározásának a leírása,
- dózis-hatás összefüggés, ahol lehet,
- statisztikai értékelés,
- az eredmények megbeszélése,
- az eredmények értelmezése.

3.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

Lásd: az Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: az Általános bevezetés B. rész (H).

B.19. *IN VITRO* EMLŐS TESTVÉRKROMATID KICSERÉLŐDÉS (SISTER CHROMATID EXCHANGE, SCE) VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

A testvérkromatid kicserélődés (sister chromatid exchange, SCE) vizsgálat egy gyorsított a megkettőződött kromoszómák két testvérkromatidja közötti reciprok DNS kicserélődés kimutatására. Az SCE-k a DNS-replikáció termékeinek kicserélődését jelentik látszólag homológ lokuszokban. A kicserélődés feltehetően DNS-törés és újraegyesülés révén keletkezik, de a jelenség molekuláris alapjairól keveset tudunk. Az SCE-k kimutatásához a testvérkromatidok eltérő jelölésére van szükség, amit úgy érnek el, hogy a sejtek kromoszomális DNS-ébe két sejtcikluson keresztül bróm-dezoxiuridint (BrdU) építenek be.

Emlős sejteket *in vitro* kezelnek a tesztanyaggal egy exogén emlős metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában, és két sejtcikluson keresztül BrdU-t tartalmazó tápfolyadékban tenyésztenek. Egy mitózis gátlóval (pl. colchicinnel) történő kezelés után, a mitózis metafázisszerű (c-metafázis) stádiumában akkumulálódott sejteket begyűjtik és kromoszóma preparátumot készítenek.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek megadva.

1.6. A tesztmódszer leírása

Előkészítendő preparátumok

- Primer tenyészetek (humán limfociták) vagy megállapodott (established) sejtvonalak (p1. kínai hörcsög ovárium sejtek) használhatók erre a vizsgálatra. A sejtvonalatokat ellenőrizni kell Mycoplasma fertőzésre.
- Megfelelő tápfolyadékokat és inkubációs körülményeket (pl. hőmérséklet, tenyésztőedények, CO₂ koncentráció és páratartalom) kell alkalmazni.
- A kísérleti anyagokat a sejtek kezelése előtt tápfolyadékban, vagy más megfelelő vivőanyagban oldják vagy szuszpendálják. A vivőanyag végkoncentrációja a tápfolyadékban nem befolyásolhatja lényegesen a sejtek életképességét vagy a növekedési rátát és az SCE frekvenciát, amit az oldószeres kontrollal kell ellenőrizni.
- A sejteknek a kísérleti anyaggal történő kezelését egy megfelelő exogén emlős metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában is el kell végezni. Amennyiben alternatívaként olyan sejttypust használnak, amelyik

rendelkezik saját metabolikus aktivitással, akkor az aktivitás természetének és sebességének alkalmasnak kell lennie a tesztelésre kerülő anyag kémiai osztályának aktiválására.

Vizsgálati körülmények

Tenyészetek száma

Legalább két párhuzamos tenyészetet kell használni minden egyes kísérleti pontra.

Negatív és pozitív kontrollok használata

Pozitív kontrollként egy direkt ható és egy metabolikus aktivációt igénylő vegyületet is be kell állítani minden kísérletbe, és vivőanyagot kontrollt is kell használni.

A következő anyagok használhatók pozitív kontrollként:

– direkt ható vegyület: etil-metánszulfonát,

– indirekt ható vegyület: ciklofoszfamid.

Amennyiben lehetséges, egy a tesztelendő anyaggal azonos kémiai osztályba tartozó pozitív kontroll is beállítandó.

Dózisszintek

A tesztanyagnak legalább három, egymástól megfelelő intervallumokkal eltérő dózisát kell használni. A legmagasabb dózisnak jelentős toxikus hatást kell mutatnia, de ugyanakkor meg kell hogy engedjen kielégítő mértékű sejtosztódást is. A vízben aránylag rosszul oldódó anyagokat, megfelelő módszert használva az oldékonyságuk határáig terjedő dózisban kell tesztelni. A vízben szabadon oldódó és nem toxikus anyagok legnagyobb dózisát esetről esetre kell meghatározni.

A vizsgálat kivitelezése

Tenyészetek előállítás

A megállapodott sejtvonalakat törzstenyészetekből állítják elő (pl. tripszinezéssel vagy felrázással), megfelelő sejtszámmal leültetik tenyésztő edényekbe és 37 °C-on inkubálják. Monolayer tenyészeteknél a sejtszámot tenyésztő edényenként úgy kell beállítani, hogy a sejtek begyűjtésekor a benövés mértéke ne legyen több, mint 50%. Alternatívaként szuszpenzióban növő sejtek is használhatók. Humán limfocita tenyészetek heparinózott vérből indíthatók megfelelő technikával 37 °C-on inkubálva.

Tenyészetek kezelése

Exponenciális növekedési fázisban lévő sejteket kezelnek megfelelő ideig a tesztanyaggal; a legtöbb esetben egy-két órás kezelés elegendő lehet, de bizonyos esetekben a kezelési idő kiterjeszhető akár két teljes sejtciklusra. Azokat a sejteket, amelyek nem rendelkeznek kielégítő saját metabolikus aktivációs kapacitással, egy megfelelő metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és anélkül is meg kell kezelni. A kezelési periódus végén mosással el kell távolítani a kísérleti anyagot, és a sejteket tovább kell tenyészteni még két sejtcikluson keresztül BrdU jelenlétében. Alternatívaként a sejteket egyszerre ki lehet tenni a kísérleti anyag és a BrdU hatásának két sejtciklus egész tartamára.

A humán limfocita tenyészetek a kezelés alatt szemisinkron állapotban vannak.

A sejteket a kezelést követő második osztódáskor vizsgálják biztosítva, hogy az expozíció a sejtciklus legérzékenyebb stádiumaiban érvényesüljön. A BrdU-nak kitett tenyészetekkel minden művelet sötétben vagy tompított fényű izzólámpa megvilágítása mellett végzendő a sejtek begyűjtéséig minimálisra csökkentve a BrdU-t tartalmazó DNS fotolízisét.

A sejtek begyűjtése (harvesting)

A sejteket mitózis gátlóval (pl. colchicinnel) kezelik meg egy-két órával a begyűjtés előtt. Minden egyes tenyészetet külön-külön kell kezelni, begyűjteni és belőle kromoszómát preparálni.

Kromoszóma preparálás és festés

A kromoszóma preparátumokat standard citogenetikai módszerekkel készítik. Az SCE-k kimutatása számos festési eljárással végezhető (pl. fluorokróm plusz Giemsa módszerrel).

Metafázis analízis

A vizsgálandó sejtek száma az SCE spontán előfordulásának gyakoriságától függ. Tenyészetenként rendszerint legalább 25 jól kiterült metafázist kell megvizsgálni SCE előfordulásra. Vizsgálat előtt a lemezeket kódolni kell. Humán limfociták esetében csak olyan metafázisok vizsgálhatók, amelyek 46 centromérával rendelkeznek. Megállapodott sejtvonalak esetében csak olyan metafázisok vizsgálhatók, amelyek a modális kromoszómaszámnak megfelelő ± 2 centromérával rendelkeznek. Meg kell abban állapodni, hogy a jelzés centroméra körüli elfordulását SCE-nek minősítik-e vagy sem. Az eredményeket egy független kísérletben kell megerősíteni.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában kell megadni. Az SCE-k számát külön-külön meg kell adni minden egyes metafázisra (SCE/metafázis) és minden egyes kromoszómára (SCE/kromoszóma) valamennyi kezelt és kontroll tenyészetben.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentés, amennyiben lehetséges, tartalmazza az alábbi információkat:

– felhasznált sejtek, a sejttenyészetek fenntartására szolgáló módszerek,
– vizsgálati körülmények: tápfolyadékok összetétele, CO₂ koncentráció, dózisszintek, használt oldószer, inkubációs hőmérséklet, kezelés tartama, a felhasznált mitózis gátló, annak koncentrációja és behatási ideje, felhasznált emlős aktivációs rendszer típusa, pozitív és negatív kontrollok,

- a sejttenyészetek száma kísérleti pontonként,
- a metafázis preparátumok készítésének részletei,
- analizált metafázisok száma (minden tenyészetre külön-külön megadva),
- az SCE-k átlaga sejtenként és kromoszómánként (minden tenyészetre külön-külön megadva),
- az SCE-k leszámolásának kritériumai,
- a dóziszválasztás logikája,
- dózis-hatás összefüggés, ha van,
- statisztikai értékelés,
- az eredmények megbeszélése,
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és az eredmények értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész (H).

B.20. NEMHEZ KÖTÖTT RECESSZÍV LETÁLIS TESZT DROSOPHILA MELANOGASTERBEN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszerek alapelve

A *Drosophila melanogaster*-en végzett nemhez kötött recesszív letális (sex-linked recessive lethal, SLRL) teszt a rovar ivarsejtjeiben bekövetkezett mutációk, pontmutációk és kis deléciók kimutatására szolgál. A teszt forward mutációs vizsgálat, ami az X kromoszóma mintegy 800 lokuszában bekövetkezett mutációk szűrésére alkalmas; ez a 800 lokusz az X kromoszómán lévő összes lokuszok mintegy 80%-át jelenti. Az X kromoszóma a teljes haploid genom mintegy ötödét képviseli.

A *Drosophila melanogaster* X kromoszómájának mutációi fenotípusosan a mutáns gént hordozó hívekben fejlődnek ki. Amennyiben a mutáció hemizigóta állapotban letális, bekövetkezésére abból lehet következtetni, hogy a hím utódok lehetséges két osztálya közül (amelyek normálisan születhetnének a heterozigóta nőténnytől) az egyik hiányzik. Ezen alapul a SLRL teszt, a kimutatás speciálisan jelölt és átrendezett kromoszómák segítségével történik.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek megadva.

1.6. A teszt módszer leírása

Előkészítendő preparátumok

Törzsek

Egy jól definiált vad típusú törzs hímjei és Muller-5 törzs nőtényei használhatók. Más megfelelő markerekkel rendelkező nőtények többszörös inverzióval az X kromoszómán is alkalmasak lehetnek.

Testanyag

A kísérleti anyagokat vízben kell oldani. A vízben nem oldódó anyagokat megfelelő vivőanyagban (pl. etanol és Tween-60 vagy -80 keverékében) kell oldani vagy szuszpendálni, majd az adás előtt vízzel vagy sóoldattal hígítani. Dimetil-szulfoxid (DMSO) nem használható vivőanyagként.

Állatszám

A tesztet egy előre meghatározott érzékenységre és teljesítőképességre kell tervezni. Döntően a megfelelő kontrollban észlelt spontán mutációs frekvencia határozza meg a kezelendő kromoszómák számát, amelyeket majd vizsgálni kell.

Beadás módja

A kísérleti anyag bejuttatása történhet a szájon át, injekcióval vagy gázok, gőzök belélegeztetésével. A testanyag etetése cukor oldatban történhet. Amennyiben szükséges, a kísérleti anyag 0.7%-os NaCl oldatban oldható, és a mellvagy a hasüregbe injektálható.

Negatív és pozitív kontrollok használata

Negatív (vivőanyag) és pozitív kontrollokat kell beállítani. Amennyiben azonban a laboratóriumban megfelelő historikus kontroll adatok állnak a rendelkezésre, az egyidejű kontrolltól el lehet tekinteni.

Dózisszintek

Három dózist kell használni. Egy előzetes felméréshez elegendő lehet a kísérleti anyag egy dózisa, amennyiben az megfelel a maximálisan tolerálható dózissal, vagy bizonyos toxikus tüneteket okoz. Nem toxikus anyagokat a beadható legnagyobb dózisban kell adni.

A vizsgálat kivitelezése

Vad típusú hímeket (háromtól ötnapos korúak) kezelnek a kísérleti anyaggal, és egyedileg pároztatják nagyszámú, a Müller 5 törzsből, vagy más megfelelő markerű (az X kromoszómán többszörös inverziót hordozó) törzsből származó szűz nőténnyel. A nőtényeket két-három naponként friss szűzekre cserélik, lefedve a spermatogenezis teljes ciklusát. Ezeknek a nőtényeknek az utódait vizsgálják a letális hatásokra annak megfelelően, hogy ezek a letális hatások a kezelés alatt az érett spermiumokban, a közép és késői stádiumú spermátidokban, a korai spermátidokban, a spermátidokban és a spermátogoniumokban következtek-e be.

A fenti keresztezésekből származó heterozigóta F1 nőtényeket egyedileg (azaz egy nőtény van egy fiolában) pároztatják a fivéreikkel. Az F2 generációban, minden egyes tenyészetet megvizsgálunk a vad típusú híme hiányára. Amennyiben egy tenyészet olyan F1 nőtényből látszik származni, amelyik letális szülői X kromoszómát hordoz (azaz a kezelt kromoszómájú híme hiánya állapítható meg) a nőtény ugyanolyan genotípusú nővérein ellenőrizni kell, hogy a letalitás ismétlődik-e a következő generációban.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában kell közölni megadva a vizsgált X-kromoszómák számát, a steril hímek számát, a letális kromoszómák számát minden egyes dózissal, és valamennyi kezelt hím minden egyes párzási periódusára. Hímenként meg kell adni a különböző nagyságú klaszterek számát. Az eredményeket meg kell erősíteni egy külön kísérletben.

A nemhez kötött recesszív letális teszt értékelésére megfelelő statisztikai módszereket kell alkalmazni. Az egy hímből származó recesszív letális mutációk klaszterjeit figyelembe kell venni, és megfelelő statisztikai módszerrel értékelni.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentés, amennyiben lehetséges, tartalmazza az alábbi információkat:

- tenyészet: a használt *Drosophila* tenyészetek vagy törzsek, a rovarok életkora, a kezelt hímek száma, steril hímek száma, a beállított F2 tenyészetek száma, utódok nélküli F2 tenyészetek száma, a letális mutációt hordozó kromoszómák száma megadva minden egyes ivarsejt fejlődési stádiumra,
- a kezelt csoport nagyságának megállapítására szolgáló kritériumok,
- vizsgálati körülmények: a kezelés és mintavétel rendjének részletes leírása, dózisszintek, toxicitási adatok, negatív (oldószeres) és pozitív kontrollok, ha be voltak állítva,

- a letális mutációk értékelésének kritériumai,
- expozíció/hatás összefüggés, amennyiben lehetséges,
- az adatok értékelése,
- az eredmények megbeszélése,
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és az eredmények értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész (H).

B.21. IN VITRO EMLŐS SEJTTRANSZFORMÁCIÓS VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

Emlős sejtenyészetek alkalmazhatók a kémiai anyagok által *in vitro* indukált olyan fenotípus változások kimutatására, amelyek *in vivo* a malignus transzformációval kapcsolatosak. Széles körben használt sejtek a C3H10T1/2, 3T3, SHE és a Fischer patkányból származó sejtek. A tesztek a sejtmorfológia megváltozásának, a fókusz képzésnek, vagy a lágyagarban való növekedési képesség megváltozásának (képesek nőni és kolóniákat képezni lágyagarban is, anchorage independence) kimutatásán alapulnak. Vannak kevésbé használatos rendszerek is, amelyek a daganatkeltő vegyi anyagokkal történt kezelés hatására a sejtekben kialakuló más fiziológiai vagy morfológiai változások kimutatásán alapulnak. Nincs olyan *in vitro* teszt-végpont (endpoint) amelyik megalapozott hatásmechanizmusbeli kapcsolatban állna a rákkal. Néhány tesztrendszer képes kimutatni a tumor promotereket is. A citotoxicitás a tesztanyagnak a tenyészetek kolóniaképző képességére (cloning efficiency) vagy a növekedési rátájára kifejtett hatásának meghatározásával állapítható meg. A citotoxicitás meghatározása annak a megállapítására alkalmas, hogy a kísérleti anyaggal történt kezelés toxikológiailag releváns-e, de nem használható a transzformációs gyakoriság kiszámítására valamennyi tesztben, mivel egyesek ismételt inkubációval és/vagy ismételt passzálassal járnak.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek megadva.

1.6. A tesztmódszer leírása

Előkészítendő anyagok

Sejtek

Különböző sejtvonalak és primer sejtenyészetek használatosak az alkalmazandó transzformációs tesztől függően. A vizsgálatnak biztosítania kell azt, hogy a tesztben használandó sejtek megfelelő fenotípus változást mutassanak az ismert carcinogénnel történő expozíció után, és igazolnia kell azt, hogy a teszt az ő laboratóriumában bizonyítottan és dokumentáltan valid és megbízható.

Tápfolyadékok

Olyan tápfolyadékokat és kísérleti körülményeket kell biztosítani, amelyek alkalmasak az alkalmazandó transzformációs vizsgálat kivitelezésére.

Tesztanyag előkészítése

A tesztanyagok oldhatók tápfolyadékban, vagy oldhatók, esetleg szuszpendálhatók megfelelő vivőanyagokban a sejtek kezelése előtt. A vivőanyag végkoncentrációja a tápfolyadékban nem befolyásolhatja a sejtek életképességét, növekedési rátáját vagy a transzformációs gyakoriságot.

Metabolikus aktiváció

A sejteknek a tesztanyaggal való kezelését el kell végezni egy megfelelő metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában is. Amennyiben alternatívaként olyan sejtípust használnak, amelyik rendelkezik saját

metabolikus aktivitással, akkor az aktivitás természetének ismerten alkalmasnak kell lennie a tesztelésre kerülő anyag kémiai osztályának aktiválására.

Vizsgálati körülmények

Negatív és pozitív kontrollok használata

Pozitív kontrollként egy direkt ható és egy metabolikus aktiválást igénylő vegyületet is be kell állítani minden kísérletbe; negatív (vivőanyag) kontrollt szintén kell használni.

A következő anyagok használhatók pozitív kontrollként:

Direkt ható vegyületek:

– etil-metánszulfonát,

– béta-propiolakton

– Indirekt ható vegyületek:

– 2-acetamido-fluorén

– 4-dimetil-amino-azo-benzol

– 7,12-dimetil-benzantracén

Amennyiben lehetséges, be kell állítani egy további pozitív kontrollt, ami a tesztelendő vegyülettel azonos kémiai osztályba tartozik.

Dózisszintek

A kísérleti anyagnak több koncentrációját kell használni. Ezeknek a koncentrációknak dóziszfüggő toxikus hatást kell okozniuk: a legmagasabb koncentrációnak alacsony túlélést kell eredményeznie, míg a legalacsonyabb dózisszinten a túlélésnek megközelítőleg ugyanannyinak kell lennie mint a negatív kontrollban.

A vízben aránylag rosszul oldódó anyagokat megfelelő módszert használva az oldékonyságuk határáig terjedő dózisban kell tesztelni. A vízben szabadon oldódó és nem toxikus anyagok legnagyobb dózisát esetről esetre kell meghatározni.

A vizsgálat kivitelezése

A sejteket az alkalmazott tesztrendszerrel függően megfelelő ideig kell kezelni. Ismételt kezelés esetén előfordulhat, hogy a tápfolyadékcsere újratekezéssel kötik össze, és amennyiben szükséges friss metabolikus aktivációs rendszert is beállítanak. Azokat a sejteket amelyek nem rendelkeznek kielégítő saját metabolikus aktivitással, exponálni kell a kísérleti anyaggal egy megfelelő metabolikus aktivációs rendszer jelenlétében és hiányában is.

A kezelési periódus végén a sejtekről mosással eltávolítják a tesztanyagot, és a tenyésztést olyan körülmények között folytatják amelyek alkalmasak a megfigyelendő transzformált fenotípus megjelenéséhez, és a transzformációs gyakoriság meghatározásához. Minden eredményt megerősítenek egy független kísérletben.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában kell megadni. Az alkalmazott tesztől függően különböző formák használhatók, pl. egyedi (lemezenkénti) kolóniaszámok, pozitív lemezek vagy a transzformált sejtek száma. Amennyiben lehetséges, a túlélést a kontroll százalékában, a transzformációs frekvenciát pedig a transzformált és a túlélő sejtek hányadosaként kell megadni. Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel kell értékelni.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentés, amennyiben lehetséges, tartalmazza az alábbi információkat:

– felhasznált sejt típusa, tenyészetek száma, sejtenyészetek fenntartásának módszerei,

– vizsgálati körülmények: kísérleti anyag koncentrációja, használt vivőanyag, inkubációs idő, a kezelés tartama és gyakorisága, sejttség a kezelés alatt, a használt exogén metabolikus aktivációs rendszer típusa, pozitív és negatív kontrollok, a megfigyelt fenotípusváltozás jellemzői, a használt szelekciós rendszer (ha alkalmazásra került), a dózisok megválasztásának magyarázata,

– életképes és transzformált sejtek leszámolására szolgáló módszer,

– statisztikai értékelés,

– az eredmények megbeszélése,

– az eredmények értelmezése.

3.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

B.22. DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓBAN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

A domináns letális hatások az embrió vagy a magzat halálát okozzák. Valamely kémiai anyag expozíciója által okozott domináns letális mutáció azt jelzi, hogy a szer hatással van az adott faj germinális szövetére. Általánosan elfogadott, hogy a domináns letális mutációk kromoszóma károsodások (strukturális és numerikus aberrációk) következményei. Toxikus (nem mutagén) hatás következtében is előfordulhat a kezelt nőstényekben embriópusztulás.

Általában hím állatokat kezelnek a kísérleti anyaggal, és kezeletlen szűz nőstényekkel pároztatják. A spermio genesis egyes stádiumai külön-külön tesztelhetők úgy, hogy megfelelő időközönként friss nőstényekkel pároztatnak. Amennyiben a kezelt csoportbeli elhalt implantátumok nőstényenkénti száma meghaladja a kontroll csoportbeli elhalt implantátumok nőstényenkénti számát, az posztimplantációs veszteséget jelez. A preimplantációs veszteség úgy határozható meg, hogy a sárgatestek nőstényenkénti számát összevetik az összes implantátum nőstényenkénti számával úgy a kezelt, mint a kontroll csoportokban. Az össz domináns letális hatás a pre- és a posztimplantációs veszteség összegével egyenlő. Az összdomináns letális hatás számítása a nőstényenkénti élő implantátumok számának összevetésén alapul a kezelt és kontroll csoportok között. Az implantátumok számának egy adott intervallumban bekövetkező csökkenése sejtpusztulás (azaz a spermociták és/vagy a spermio goniumok pusztulásának) következménye is lehet.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek megadva.

1.6. A teszt módszer leírása

Előkészítendő preparátumok

Amennyiben lehetséges, a kísérleti anyagot izotóniás sóoldatban kell feloldani. A vízben oldhatatlan vegyületeket, megfelelő vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni. A használt vivőanyag nem léphet kölcsönhatásba a kísérleti anyaggal és nem okozhat toxikus tüneteket. Frissen készített preparátumokat kell használni.

Vizsgálati körülmények

A bejuttatás módja

A kísérleti anyagot általában csak egyszeri alkalommal adják. Toxikológiai információk alapján az ismételt adás is indokolt lehet. A bejuttatás szokásos módja az orális intubáció vagy az intraperitoneális injekció, de más bejuttatási mód is megfelelő lehet.

Kísérleti állatok

Egerek vagy patkányok az ajánlott fajok. Egészséges, szexuálisan teljesen érett állatokat randomizálják, és szétosztják kezelt és kontroll csoportokba.

Állatszám és nem

Megfelelő számú kezelt hímet kell használni, figyelembe véve az értékelendő biológiai jelenség spontán változását. A választott állatszámnak a kimutatás előre meghatározott érzékenységén és a megfelelő szignifikancia szint elérésén kell alapulnia. Például egy tipikus tesztben a hímek számát minden dóziscsoportban úgy kell megállapítani, hogy biztosítva legyen a 30–50 vemhes nőstény, pároztatási időközönként.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Általában minden kísérletben alkalmazni kell egy egyidejű pozitív és negatív (vivőanyag) kontrollt. Amennyiben elfogadható friss pozitív kontroll eredményekkel rendelkezik a laboratórium, ezek felhasználhatók az egyidejű pozitív kontroll helyett. A pozitív kontroll vegyületet egy megfelelő alacsony dózisban kell adni ahhoz, (pl. MMS, intraperitoneálisan 10 mg/kg dózisban), hogy demonstrálható legyen a teszt érzékenysége.

Dózisszintek

Általában három dózisszintet kell beállítani. A nagy dózisonak toxikus tüneteket kell okoznia vagy csökkentenie kell a kezelt állatok fertilitását. Bizonyos esetekben egyetlen magas dózis is elegendő lehet a teszthez.

Limit (küszöb) teszt

Nem toxikus anyagokból egyszeri alkalommal 5 g/kg-ot, ismételt kezelés esetén naponta 1 g/kg-ot kell adni.

A vizsgálat kivitelezése

Számos kezelési séma létezik. A kísérleti anyag egyszeri adása a leggyakrabban használt eljárás, de más kezelési sémák is használhatók.

Egyedileg tartott hímeket a kezelés után megfelelő időközönként ismételtlen egy vagy két kezeletlen szűz nősténnyel pároztatják. A nőstényeket legalább egy teljes oestrus ciklus tartamára együtt kell hagyni a hímekkel, vagy amíg a párzás megtörténtét igazolja a hüvelyben kimutatott ondó vagy a hüvelydugó.

A kezelést követő pároztatások számát a kezelési terv szabja meg, aminek biztosítania kell, hogy a spermio genesis minden stádiumában történjen mintavétel (pároztatás).

A nőstényeket a vemhesség második felében megölik, és az uterusok tartalmát megvizsgálva meghatározzák az élő és az elhalt implantátumok számát. Vizsgálhatók az ováriumok is a sárgatestek számának megállapítása céljából.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában kell közölni megadva a hímek, a vemhes nőstények és a nem vemhes nőstények számát. Egyedileg kell megadni az összes pároztatás eredményét, beleértve minden egyes hím és nőstény azonosítását. Minden nőstényre nézve meg kell adni a pároztatás hetét, a dózist, amit a hím kapott, és az élő, valamint az elhalt implantátumok számát.

Az össz-domináns letális hatás számítása a nőstényenkénti élő implantátumok számának összevetésén alapul a kezelt és kontroll csoportok között. A halott és az élő implantátumok aránya a kezelt csoportban összevetve a kontroll csoport ugyanezen arányával megadja a posztimplantációs veszteséget.

Amennyiben a korai és késői elhalások külön lettek regisztrálva, ezt világossá kell tenni a táblázatokban is.

Ha a preimplantációs veszteség megállapításra került, azt közölni kell. A preimplantációs veszteség kiszámítható a sárgatestek és az implantátumok száma közötti eltérésekből, vagy az implantátumok méhenkénti átlagos számának a kontroll csoporthoz viszonyított csökkenéséből.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel értékelik.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentés, amennyiben lehetséges, tartalmazza az alábbi információkat:

– felhasznált állatok faja, törzse, életkora és testsúlya, hímek és nőstények száma a kezelt és a kontroll csoportokban,

– kísérleti anyag, vivőanyag, tesztelt dózisszintek, a dóziszválasztás logikája, negatív és pozitív kontrollok, toxicitási adatok,

– a kezelés módja, rendje,

– pároztatás rendje,

– a párzás bekövetkezésének megállapítására szolgáló módszer,

– feldolgozás ideje,

– a domináns letálisok számolásának kritériumai,

– dózis-hatás összefüggés, amennyiben lehetséges,

– statisztikai értékelés,

– az eredmények megbeszélése,

– az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és az eredmények értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész (H).

B.23. MUTAGENITÁS – EMLŐS SPERMIOGONIÁLIS KROMOSZÓMA ABERRÁCIÓ VIZSGÁLAT**1. MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD TG 483, Emlős spermiogoniális kromoszóma aberráció vizsgálat (1997) másolata.

1.1. Bevezetés

Az *in vivo* emlős spermiogoniális kromoszóma aberráció vizsgálat azoknak a tesztanyagoknak a kimutatására szolgál, amelyek szerkezeti kromoszóma aberrációkat okoznak az emlős spermiogoniális sejtekben (1) (2) (3) (4) (5). A szerkezeti kromoszóma aberrációk két típusúak lehetnek, kromoszóma és kromatid típusúak. A kémiai mutagének többsége kromatid típusú aberrációkat indukál, de kromoszóma típusú aberrációk is előfordulnak. Ezt a módszert nem a számbeli aberrációk kimutatására tervezték, és rutinszerűen nem is használják erre a célra. A kromoszóma mutációk és a hasonló jelenségek számos emberi genetikai megbetegedés okai.

Ez a vizsgálat a spermiogoniális ivarsejtekben bekövetkezett kromoszómális történéseket mutatja ki, így várhatóan előre jelzi az ivarsejtek öröklődő mutációinak indukcióját.

Erre a vizsgálatra rutinszerűen rágcshalókat használnak. Ez az *in vivo* citogenetikai vizsgálat a spermiogoniális mitózisok kromoszóma aberrációinak kimutatására szolgál. A módszer nem terjed ki más célsejtek vizsgálatára.

A kromatid típusú aberrációkat a spermiogoniumokban a kezelést követő első mitotikus sejtosztódáskor kell vizsgálni, mielőtt ezek a károsodások elvesznek az ezt követő sejtosztódások során. További információk is nyerhetők a kezelt spermiogonium őssejtekéből: kromoszóma típusú aberrációk mutathatók ki meiotikus kromoszóma vizsgálattal a diakinezis-metafázis I-ben, amikor a kezelt sejtek spermiocitákká válnak.

Ezt az *in vivo* tesztet abból a célból dolgozták ki, hogy vizsgálni lehessen, vajon szomatikus sejtekben mutagén anyagok aktívak-e az ivarsejtekben is. Továbbá, a spermiogonium vizsgálat alkalmas a mutagén veszély becslésére, mivel olyan tényezők mérlegelését teszi lehetővé, mint az *in vivo* metabolizmus, a farmakokinetika és a DNS-reparáció.

A herében a spermiogoniumok számos generációja van jelen a kémiai anyagok iránti különböző érzékenységgel, így az észlelt aberrációk a kezelt spermiogonium populációk egy halmozott válaszát jelentik az egyre nagyobb számú differenciált spermiogonium sejtek predominanciájával. A herén belüli helyüktől függően a spermiogoniumok különböző generációi exponálódhatnak, vagy nem exponálódhatnak a keringés révén a fizikai és élettani Sertoli sejt gát és a vér-here gát miatt.

Amennyiben van rá bizonyíték, hogy a tesztanyag vagy reaktív metabolitja nem fogja elérni a célszövetet, ez a teszt nem alkalmas a kromoszóma aberrációk vizsgálatára

Lásd még: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Kromatid típusú aberráció: szerkezeti kromoszóma károsodás, ami egy kromatid törésében vagy a kromatidok közötti törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Kromoszóma típusú aberráció: szerkezeti kromoszóma károsodás, ami a két kromatid azonos helyén történt törésében, vagy törésben és újraegyesülésben nyilvánul meg.

Gap: egy kromatid szélességénél rövidebb nem-festődő szakasz a kromoszómán, a disztális kromatid rész(ek) legfeljebb minimális tengelyeltéréssel.

Számbeli aberráció: eltérés a sejtekre jellemző normális kromoszómaszámtól.

Poliploidia: a haploid kromoszómaszám (n) egészszáma, de nem diploid ($2n$) megsokszorozódása ($3n$, $4n$, stb.).

Szerkezeti aberráció: a sejtosztódás metafázisában mikroszkóppal megfigyelhető kromoszóma szerkezeti változások, mint a deléciók és fragmentumok, a kromoszómán belüli, vagy kromoszómák közötti átrendeződések.

1.3. A tesztmódszer alapelve

Az állatokat alkalmas módon megkezelik a tesztanyaggal, majd a kezelés után megfelelő időpontban leölik. Az ölés előtt az állatokat metafázis blokkoló szerrel (pl. colchicinnel vagy Colcemid®-del) kezelik. Az ivarsejtekből kromoszóma preparátumokat készítenek, megfestik, és a metafázisú sejteket kromoszóma aberrációra vizsgálják.

1.4. A tesztmódszer leírása**1.4.1. Előkészítendő anyagok****1.4.1.1. Az állatfaj kiválasztása**

Hím kínai hörcsögöket és egereket használnak a leggyakrabban, de bármilyen más emlős faj hímjei is megfelelőek lehetnek. Általánosan használt laboratóriumi állattörzsek egészséges, fiatal felnőtt egyedek kell alkalmazni. A kísérlet kezdetén az állatok között a testsúlybeli eltérés legyen minimális, egyik nemből se haladja meg az átlag testsúly $\pm 20\%$ -át.

1.4.1.2. Tartási és etetési körülmények

A tartási körülményeket illetően lásd az Általános bevezetés B. részét, de a páratartalom 50–60% közötti legyen.

1.4.1.3. Az állatok előkészítése

Fiatal felnőtt egészséges hímeket random módon (véletlenszerűen) sorolják be a kontroll és kezelt csoportokba. A dobozokat úgy kell elrendezni, hogy a dobozok elhelyezéséből adódó lehetséges hatások a minimálisra csökkenjenek. Az állatokat egyedileg jelölik és legalább öt napig hagyják akklimatizálódni a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. A dózisok elkészítése

A szilárd testanyagokat az állatok kezelése előtt megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni, szükség esetén hígítani. A folyékony testanyagokat lehet közvetlenül, vagy hígítás után adni. Frissen preparált testanyagot kell adni. Kivételt csak akkor lehet tenni, amikor a stabilitásra vonatkozó adatok megengedik a tárolást.

1.4.2. Kísérleti körülmények

1.4.2.1. Oldószer/vivőanyag

Az oldószer/vivőanyag az alkalmazott mennyiségben nem lehet toxikus, és nem lehet rá gyanús, hogy képes kémiai reakcióba lépni a testanyaggal. Amennyiben nem a jól ismert oldószerek/vivőanyagok valamelyikét használják, a választott oldószer/vivőanyag kompatibilitását adatokkal kell igazolni. Ajánlott, hogy amennyiben lehetséges vizes oldószer/vivőanyag használata kerüljön mindenekelőtt megfontolásra.

1.4.2.2. Kontrollok

Minden testben be kell állítani egyidejű negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrollt. A kontroll csoportok állataival a testanyag adását kivéve ugyanúgy kell bánni, mint a testanyaggal kezelt állatokkal.

A pozitív kontrolloknak kromoszóma aberrációkat kell okozniuk *in vivo* olyan dózisszinteken, amelyeken már várhatóan kimutatható az emelkedés a negatív kontrollhoz viszonyítva.

A pozitív kontroll dózisokat úgy kell megválasztani, hogy a hatás legyen egyértelmű, de ne legyenek olyan magasak, hogy kódolt lemezek identitása (pozitív kontroll volta) nyomban lelepleződjön. Elfogadható, ha a pozitív kontrollal más módon kezelnek mint a testanyaggal, és csak egyszeri mintavétel történik. Végül, amennyiben elérhető, megfontolandó a testanyaggal azonos kémiai osztályba tartozó pozitív kontroll használata. A következő anyagok lehetnek például pozitív kontrollok:

Pozitív kontroll	CAS szám	EINECS szám
ciklofoszfamid	50-18-0	200-015-4
ciklofoszfamid monohidrát	6055-19-2	
ciklohexil-amin	108-91-8	203-629-0
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
akrilamid monomer	79-06-1	202-173-7
trietilén-melamin	51-18-3	200-083-5

Negatív kontrollokat, amelyek csak oldószert vagy vivőanyagot kapnak, de a bejuttatás módja megegyezik a testanyagéval, minden mintavételi időpontra be kell állítani, hacsak az állatok közötti különbözőségekre és a kromoszóma aberrációk gyakoriságára vonatkozó historikus adatok alapján ez nem tartható feltétlenül indokoltnak. Továbbá, kezeletlen kontrollt is be kell állítani, hacsak a választott oldószerre/vivőanyagra vonatkozó saját historikus, vagy az irodalmi kontroll adatok alapján ez nem indokolt.

1.5. A vizsgálat kivitelezése

1.5.1. Az állatok neme és száma

Minden kezelt és kontroll csoportnak legalább öt értékelhető hímet kell tartalmaznia.

1.5.2. A kezelés rendje (kezelési séma)

A testanyag bejuttatására előnyben kell részesíteni az egyszeri vagy kétszeri kezelést (azaz az egy vagy két kezelést). A testanyag bejuttatható két részletben (split kezeléssel) is, azaz ugyanazon a napon kétszer kezelnek néhány óras időközzel, megkönnyítve ezáltal a nagyobb térfogatú anyag bevitelét. Az ettől eltérő beadási rendet szakmailag indokolni kell.

A legmagasabb dózisszinten a kezelést követően kétszer vesznek mintát. Mivel a testanyag befolyásolhatja a sejtciklus kinetikáját, egy korai és egy késői mintavételt végeznek a kezelést követő 24. és 48. órában. Az alacsonyabb dózisszinteken 24 óra, vagy 1.5 sejtciklus idő múlva kell mintát venni, hacsak nincs egy másik mintavételi időpont, ami ismertén alkalmasabb a hatások kimutatására (6).

Más mintavételi időpontok is használhatók. Pl. azoknál a vegyületeknél, amelyek kromoszóma visszamaradást okozhatnak, vagy S fázistól független hatást fejthetnek ki, egy korábbi mintavétel lehet a megfelelő (1).

Az ismételt kezelési rend alkalmazásáról esetről esetre kell dönten. Ismételt kezelési rend esetén az állatokat az utolsó kezelés után 24 órával (1.5 sejtciklus idő) kell feldolgozni, de más mintavételi időpontok is megfelelőek lehetnek.

Az állatokat leülés előtt egy metafázis blokkoló anyag (pl. Colcemid® vagy colchicin) megfelelő dóziséval kezelik meg intraperitoneálisan. Ezután megfelelő időpontban mintát vesznek. Egerek esetében ez az idő mintegy 3–5 óra, kínai hörsögöknél mintegy 4–5 óra.

1.5.3. Dózisszintek

Amikor megfelelő adatok hiányában dóziskereső vizsgálatot végeznek, azt ugyanabban a laboratóriumban kell csinálni, ugyanazt a fajt, törzset, nemet és kezelési sémát használva mint a tervezett fő kísérletben (7). Ha az anyag toxikus, az első mintavételi időpontra három dózisszintet állítanak be. Ezeknek a dózisszinteknek le kell fedniük a toxikustól a kissé, vagy egyáltalán nem toxikusig terjedő tartományt. A későbbi időpontban már csak a legmagasabb dózisszinten kell mintát venni. A legmagasabb dózis úgy határozható meg, mint amelyik toxikus tüneteket okoz, és amelynél az ugyanolyan módon adott magasabb dózis várhatóan már elhullást okozna.

Azok az anyagok, amelyek már alacsony, nem-toxikus dózisszinteken specifikus biológiai hatásokkal rendelkeznek (pl. a hormonok és a mitogének) kivételt képezhetnek a fenti dóziszválasztási kritériumok alól, ezeknél esetről esetre kell dönteni. A legmagasabb dózist az is meghatározhatja, ha toxikus tünetek állapíthatók meg a spermogonium sejtekben (azaz csökkenés a spermogonium mitózisok, valamint az első és második meiotikus metafázisok arányában; a csökkenés ne haladja meg az 50%-ot).

1.5.4. Küszöb (limit) teszt

Amikor a 2000 mg/ts kg dózis egyszerre, vagy ugyanazon a napon kétszerre beadva nem okoz észrevehető toxikus tüneteket, és amikor a rokon kémiai szerkezetű vegyületekre vonatkozó adatok alapján nem is várható genotoxikus hatás, akkor a három dózisszinten végzett teljes körű vizsgálat nem tartható feltétlenül szükségesnek. A hosszabb, 14 napig tartó vizsgálat esetén a küszöbdózis 2000 mg/testtömeg kg/nap; az ennél is hosszabb vizsgálat esetén a küszöbdózis 1000 mg/testtömeg kg/nap. Amennyiben a várható emberi expozíció indokolja, a limit teszt végezhető magasabb dózissal is.

1.5.5. A dózisok beadása

A tesztanyagot általában gyomorszondával, vagy egy megfelelő intubációs kanyallal, esetleg intraperitoneális injekcióval adják be. Indokolt esetben más módon is bejuttatható. A gyomorszondával vagy injekcióval egyszeri alkalommal beadható folyadék maximális térfogata az állat testsúlyától függ. A térfogat nem lehet több mint 2 ml/100 testtömeg g. Ennél nagyobb térfogat alkalmazását indokolni kell. Az irritatív, és korrozív anyagok kivételével, amelyek magasabb koncentrációkban általában igen súlyos hatásúak, a dózistérfogat változását minimalizálni kell úgy, hogy a tesztanyag koncentrációjának beállításával minden dózisszinten azonos legyen a dózistérfogat.

1.5.6. Kromoszóma preparátumok készítése

Közvetlenül az állatok leülése után egyik vagy mindkét heréből sejtuszpenziót vesznek, hipotonizálják és fixálják. Ezután a sejteket tárgylemezre juttatják és megfestik.

1.5.7. Mikroszkópos értékelés

Legalább 100 jól kiterült metafázist kell vizsgálni állatonként (azaz minimum 500 metafázist csoportonként). Ez a szám csökkenthető, amennyiben nagyszámú aberráció látható. A mikroszkópos vizsgálat előtt valamennyi lemezt, beleértve a pozitív és negatív kontrollokat is, egymástól függetlenül kódolni kell. Mivel a preparálás gyakran okoz a metafázisok egy részében kromozómavesztésre vezető töréseket, csak azok a metafázisok értékelendők, amelyekben a centromérák száma $2n \pm 2$.

2. ADATFELDOLGOZÁS

2.1. Az eredmények kezelése

Az állatok adatait egyedileg kell megadni táblázatos formában. A kísérleti egység az állat. Minden egyes állatnál értékelni kell a szerkezeti kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek számát és a kromoszóma aberrációk sejtenkénti számát. Fel kell sorolni a szerkezeti aberrációk típusait, megadva számukat és gyakoriságukat a kezelt és a kontroll csoportokban. A gap-ek előfordulását külön feljegyzik és közlik, de általában nem számolják bele az össz-aberráció gyakoriságba.

Amennyiben a mitózisok és a meiosisok is megfigyelésre kerültek, úgy a citotoxikus hatás kimutatására, állatonként 100-100 osztódó sejtet leszámolva, meg kell adni minden kezelt és kontroll állatra a spermogonium mitózisok arányát az 1. és 2. meiotikus metafázisokhoz viszonyítva. Amennyiben csak a mitózisokat értékelték, meg kell határozni a mitózisindexet állatonként legalább 1000 sejtet leszámolva.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

A pozitív eredmény megállapításának több kritériuma is van, mint pl. a kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek relatív számának dózisfüggő megemelkedése, vagy a kromoszóma aberrációkat hordozó sejtek számának egy egyértelmű megemelkedése egyetlen dózisszinten és egyetlen mintavételi időpontban. Az eredményeknek a biológiai vonatkozását kell először fontolóra venni. Az eredmények értékelésében segítséget nyújthatnak a statisztikai

módszerek, de a statisztikai szignifikancia nem lehet a pozitív eredmény megállapításának egyedüli kritériuma. A bizonytalan eredményeket további teszteléssel kell tisztázni, előnyben részesítve a kísérleti körülmények módosítását.

Az a tesztanyag, aminek az eredményei nem elégték ki a fenti kritériumokat, nem minősül mutagénnek ebben a tesztben.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményt ad, néhány esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet egyértelműen állást foglalni a tesztanyag aktivitását illetően. Az eredmények az újabb kísérletek számától függetlenül bizonytalanok vagy kérdések maradhatnak.

Az *in vivo* spermiogoniális kromoszóma aberráció tesztben kapott pozitív eredmény azt jelenti, hogy a tesztanyag szerkezeti kromoszóma aberrációkat indukál az adott faj ivarsejtjeiben. A negatív eredmény azt jelenti, hogy a vizsgált körülményei között a tesztanyag nem indukál kromoszóma aberrációkat az adott faj ivarsejtjeiben.

Állást kell foglalni abban a kérdésben, hogy a tesztanyag vagy metabolitjai bekerülhettek-e a vérkeringésbe, és specifikusan elérték-e a célszövetet (pl. szisztémás toxicitás).

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Tesztanyag, oldószer/vivőanyag;

– tesztanyag azonosítására szolgáló adatok, halmazállapot, releváns fiziko-kémiai adatok, ha vannak és tisztaság, ha ismert,

– a vivőanyag kiválasztásának indoklása,

– a tesztanyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

– a felhasznált faj és törzs,

– az állatok száma, életkora és neme,

– származás, tartási körülmények, táp stb.,

– az állatok egyedi testsúlya a kísérlet indításakor, beleértve a testsúlytartományokat, átlagokat és standard deviációkat minden egyes csoportra.

Kísérleti körülmények:

– pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontroll adatok,

– a dóziskereső kísérletre vonatkozó adatok, ha végeztek,

– a dózisszintválasztás magyarázata,

– a tesztanyag kezeléshez történő előkészítésének a részletei,

– a tesztanyag beadásának a részletei,

– az ölési időpontok magyarázata,

– az adás módjának magyarázata,

– tesztanyagnak a tápban vagy az ivóvízben beállított koncentrációjának (ppm) átszámítása az aktuális dózisra (mg/testtömeg kg/nap),

– a táp és a víz minőségének részletei,

– a kezelés és a mintavétel rendjének részletes ismertetése,

– a toxicitás megállapítására szolgáló módszerek,

– metafázis blokkoló anyag neve, dózisa, behatásának tartama,

– metafázis preparátum készítésének módja,

– az aberrációk meghatározásának/leszámolásának kritériumai,

– az értékelt sejtek száma állatonként,

– a negatív, pozitív és bizonytalan eredmények kritériumai.

Eredmények:

– toxikus tünetek,

– mitotikus index,

– spermiogonium mitózisok aránya az 1. és 2. meiotikus metafázisokhoz,

– az aberrációk típusa és száma állatonként külön-külön megadva,

– az összaberráció szám csoportonként,

– aberrációt hordozó sejtek száma csoportonként,

– dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,

– az alkalmazott statisztikai módszerek, ha voltak,

– egyidejű negatív kontroll adatok,

– historikus negatív kontroll adatok, a tartományokkal, átlagokkal és a standard deviációkkal,

- egyidejű pozitív kontroll adatok,
 - ploidia változások, ha voltak.
- Az eredmények megbeszélése.
Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

- (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, pp. 289-294.
- (4) Richold, M. Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse. D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Basic Mutagenicity, Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity, Testing. Report. Part I revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. I 15-141.
- (5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978), A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes, *Mutation Res.*, 52, pp. 207-209.
- (6) Adler, I. D., Shelby, M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994), International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests, *Mutation Res.*, 312, pp. 313-318.
- (7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Repon of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313-319.
- (8) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clarc, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B.24. EGÉR FOLT (SPOT) TESZT

1 MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

Ez egy in vivo egér teszt, amelyikben a fejlődő embriót exponálják a kémiai anyagokkal. A fejlődő embrió célsejtjei a melanoblasztok, a cél-gének azok a gének, amelyek meghatározzák a bőr szőrzetének a színét. A fejlődő embriók heterozigóták számos a szőrzet színét meghatározó génre. A domináns allél mutációja vagy elvesztése (különböző genetikai események következtében) egy melanoblaszt ilyen génjében a recesszív fenotípus kifejeződését eredményezi az utódsejtekben, ami az egér bőrén az alaptól eltérő színű folt keletkezésére vezet. Leszámolják a foltos utódokat, a mutációkat, és ezek frekvenciáját összevetik a kezelt és a kontroll csoport között. Az egér spot teszt feltehetően a magzati sejtekben bekövetkezett szomatikus mutációkat mutatja ki.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek megadva.

1.6. A teszt módszer leírása

Előkészítendő preparátumok

Amennyiben lehetséges, a kísérleti anyagot izotóniás konyhasóoldatban kell oldani vagy szuszpendálni. Ha ebben nem oldódik, más megfelelő vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni. A használt vivőanyag nem léphet kölcsönhatásba a kísérleti anyaggal, és nem lehet toxikus. A kísérleti anyagnak csak friss készítménye használható.

Kísérleti állatok

T törzsű egereket (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, cchp/cchp; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) pároztatnak HT törzssel (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe), vagy C57 BL törzssel (nonagouti, a/a). Más alkalmas keresztezés, mint pl. az NMRI törzs (nonagouti, a/a; albino, c/c) és a DBA törzs (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) között is használhatók, amelyek nonagouti utódokat nemzenek.

Állatszám és nem

Megfelelő számú vemhes nőtényt kell ahhoz megkezelni, hogy elegendő számú túlélő utód szülessen minden dózisszinten. A megfelelő mintaszámot a kezelt egereken észlelt foltok száma és a kontroll adatok tartománya szabja meg. Egy negatív eredmény csak akkor fogadható el, ha a legmagasabb dózisszinten a kezelt nőtényeknek legalább 300 utódja lett kiértékelve.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden kísérletbe be kell állítani csak vivőanyaggal kezelt egyidejű negatív kontrollt. Ugyanazon laboratóriumból származó történeti kontroll adatokat össze lehet vonni a teszt érzékenységének fokozására, amennyiben azok homogének. Ugyanazon laboratóriumból származó friss pozitív kontroll adatokra (ismerten mutagén kémiai anyaggal kezelt állatokból) is szükség van, amennyiben a kísérleti anyag nem bizonyult mutagénnek.

Kezelés módja

A kezelés szokásos módja a vemhes nőtények orális intubációja vagy intraperitoneális injekciója, de az inhalációs kezelés vagy a bejuttatás más módja is alkalmas lehet.

Dózisszintek

Legalább két dózisszintet kell beállítani, amelyik közül az egyik legyen toxikus, vagy csökkentse az alomszámot. A nem-toxikus vegyületeket a beadható legnagyobb dózisban kell alkalmazni.

A vizsgálat kivitelezése

Az egyszeri kezelést általában a vemhesség 8., 9. vagy 10. napján végzik úgy számolva, hogy az a nap az első, amikor a hüvelydugó először látható. Ezek a napok megfelelnek a fogamzást követő 7.25., 8.25. és 9.25. napnak. Az ismételt kezeléseket is ezeken a napokon végezhetők.

Értékelés

Az utódokat kódolják, és a születés után 3–4 héttel megvizsgálják a foltokra.

A foltoknak három osztályát különítik el:

a) 5 mm-nél kisebb fehér foltok az elülső testfelszín középvonalában, amelyeket feltételezhetően sejtpusztulás okoz (white mid-ventral spots, WMVS);

b) sárga, agouti (aranynyúl) szerű foltok az emlők körül, a genitális, nyaki, lágyéki és hónalji régiókban, homlokközépen, amelyek feltételezhetően hibás differenciálódás eredményei (misdifferentiation spots, MDS); és

c) random eloszlású pigmentált és fehér foltok, amelyek valószínűleg szomatikus mutációra vezethetők vissza (random spots, RS).

Mindhárom osztályba tartozó foltokat regisztrálni kell, de csak az utolsónak, az RS-nek van genetikai vonatkozása. Az MDS és az RS foltok elkülönítéséből fakadó problémákat a foltszőrök fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatával lehet megoldani.

Az utódok egyértelmű makroszkópos morfológiai elváltozásait fel kell jegyezni.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Meg kell adni az összes vizsgált utód számát, és azok számát, akik egy vagy több feltehetően szomatikus mutáció révén keletkezett foltot (RS) hordoznak. A kezelt és kontroll csoportok adatait megfelelő módszerrel kell összevetni. Az adatokat meg kell adni folt per alom alapon is.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentés, amennyiben lehetséges, az alábbi információkat tartalmazza:

- a keresztezéshez használt törzsek,
- a vemhes nőstények száma a kezelt és kontroll csoportban,
- az átlagos alomszám a születéskor és az elválasztáskor a kontroll és a kezelt csoportokban,
- a kísérleti anyag dózisszintjei),
- a használt oldószer,
- a vemhesség napja, amikor a kezelés történt,
- a kezelés módja,
- az vizsgált utódok száma összesen, és a WMVS-t, MDS-t és RS-t hordozó állatok száma a kísérleti és a kontroll csoportokban,
- utódokon észlelt makroszkópos eltérések,
- dózis-hatás összefüggés az RS-ekre, amennyiben lehetséges,
- statisztikai értékelés,
- az eredmények megbeszélése,
- az eredmények értelmezése.

3.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész (H).

B.25. ÖRÖKLŐDŐ TRANSZLOKÁCIÓ VIZSGÁLAT EGÉRBEN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Lásd: Általános bevezetés B. rész.

1.3. Hivatkozási anyagok

Nincsenek megadva.

1.4. A vizsgálati módszer alapelve

Az egér öröklődő transzlokációs teszt az emlős ivarsejtekben bekövetkezett strukturális és numerikus kromoszóma elváltozások kimutatására szolgál az első generációs utódokban. A kimutatható kromoszóma elváltozások a reciprok transzlokációk, és ha a nőstényeket is értékelik, az X kromoszóma vesztés. A transzlokációt hordozók és az XO nőstények csökkent fertilitást mutatnak, ennek alapján választják ki az F1 utódokat citogenetikai vizsgálatra. Bizonyos transzlokáció típusok (X-autoszóma és a c-t típus) teljes sterilitást okoznak. A transzlokációkat cytogenetikai módszerrel mutatják ki az F1 hímek meiotikus sejtjeinek diakinezis-metafázis I. stádiumában, vagy az F1 nőstények hím utódaiban. Az XO nőstények kimutatása a csontvelői kromoszómák vizsgálatával történik, amennyiben a mitózisokban csak 39 kromoszóma van.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek megadva.

1.6. A teszt módszer leírása

Előkészítendő preparátumok

A kísérleti anyagot izotóniás konyhasóoldatban oldják. Amennyiben ebben nem oldódik, más megfelelő vivőanyagban oldják vagy szuszpendálják. A tesztanyagnak frissen készített oldatát/szuszpenzióját használják.

A vivőanyag nem léphet kölcsönhatásba a kísérleti anyaggal, és nem lehet toxikus.

A kezelés módja

Általában orális intubációval vagy intraperitoneális injekcióval juttatják be a kísérleti anyagot, de más módszer is megfelelő lehet.

Kísérleti állatok

A pároztatás és a citológiai vizsgálat megkönnyítése érdekében ezeket a vizsgálatokat egéren végzik. Nem szükséges speciális egértörzset használni, de az átlagos alomszám legyen 8 feletti, és viszonylag állandó. Egészséges, szexuálisan érett állatokat használnak.

Állatszám

A szükséges állatszám a spontán transzlokációs frekvenciától függ, és a pozitív eredmény megállapításához szükséges minimális indukciós szinttől (minimális emelkedéstől).

A tesztet általában hím F1 utódok vizsgálatával végzik. Legalább 500 hím F1 utódra van szükség dóziscsoportonként. Amennyiben nőstény F1 utódokat is bevonnak a kísérletbe, 300 hímrre és 300 nőstényre van szükség.

A pozitív és negatív kontrollok használata

Megfelelő egyidejű és historikus kontroll adatoknak kell lenni. Amennyiben ugyanebben a laboratóriumban egy frissen elvégzett kísérletből elfogadható pozitív kontroll adatok állnak rendelkezésre, ezek felhasználhatók az egyidejű pozitív kontroll helyett.

Dózisszintek

Egy dózist tesztelnek, azt a legmagasabbat, ami már okoz bizonyos minimális toxikus tüneteket, de még nincs hatása a reprodukciós készségekre vagy a túlélésre. A dózishatás összefüggés vizsgálatához még két alacsonyabb dózisa van szükség. A nem toxikus vegyületeket a beadható legnagyobb dózisban kell használni.

A vizsgálat kivitelezése

Kezelés és pároztatás

Két kezelési séma használatos. A kísérleti anyag egyszeri adását használják a legáltalánosabban. A kísérleti anyagnak 35 napig tartó, heti hét kezeléssel történő adása szintén alkalmazható. A kezelést követő pároztatások számát a kezelési séma szabja meg, és biztosítani kell azt, hogy valamennyi kezelt ivarsejt fejlődési stádium mintavételre (pároztatásra) kerüljön. A pároztatási periódus után minden nőstényt egyedileg kell elhelyezni a dobozba. Amikor a nőstény megellett, a dátumot, az alomszámot és az utódok nemét jegyzőkönyvezni kell. A hím utódokat elválasztják, a nőstény utódokat, hacsak nem kerülnek további felhasználásra a kísérletben, kiveszik a vizsgálatból.

Tesztelés transzlokációs heterozigóciára

A két lehetséges módszer egyikét használják:

- Az F1 utódok fertilitási tesztelése, majd ezután a feltehetően transzlokáció hordozók citogenetikai vizsgálata,
- Valamennyi hím F1 utód citogenetikai vizsgálata minden előzetes fertilitási tesztelés nélkül.

a) A fertilitás tesztelése

Egy F1 egyed csökkent fertilitása az alomszám és/vagy nőstény párjának uterus tartalma alapján állapítható meg.

A használt törzsre nézve meg kell állapítani a normál és a csökkent fertilitás kritériumait.

Alomszám-megállapítás: az F1 hímeken tesztelik úgy, hogy egyedileg pároztatják egy ugyanabból a kísérletből, vagy tenyészetből származó nősténnyel. A párzás utáni 18. naptól kezdődően a dobozokat naponta ellenőrzik.

Az ellés után az alomszámot és az F2 utódok nemét jegyzőkönyvezik, majd az utódokat eltávolítják a kísérletből.

Amennyiben az F1 nőstény utódokat tesztelik, a kis alomból származó F2 utódokat tartják meg a további vizsgálatra. A nőstény transzlokáció hordozók azonosítása a transzlokáció citogenetikai kimutatásával történik valamelyik hím utódjuk vizsgálata révén. Az X0 nőstények az alom nemi arányának megváltozása révén ismerhetők fel, amennyiben 1:1-ről 1:2-re változik az utódok között a hímek és nőstények aránya. Egy többlépéses eljárás keretében a normális F1 állatokat kiveszik a további kísérletből, amennyiben az első F2 alom eléri, vagy meghaladja az előre meghatározott normál értéket, máskülönben a második vagy harmadik F2 almot is megvizsgálják.

Azokat az F1 állatokat, amelyeket nem lehet normálisként besorolni a három F2 alom vizsgálata után, tovább kell vizsgálni nőstény párjának uterusz tartalmára, vagy közvetlenül el kell végezni a citogenetikai vizsgálatukat.

Uterus tartalom vizsgálat: a transzlokáció hordozók kis alomszáma az embriók elpusztulásának a következménye, így az elhalt implantátumok magas száma jelzi, hogy a kísérleti állatban transzlokáció történt. Mindegyik tesztelendő F1 hímet két vagy három nősténnyel pároztatnak. A megtermékenyülést a mindennapos reggeli inspekció alkalmával felismert hüvelydugó jelzi. A nőstényeket az ezt követő 14–16. napon megölik, és feljegyzik az uteruszukban lévő élő és elhalt implantátumok számát.

b) Citogenetikai vizsgálat

Here preparátumokat készítenek levegőn szárítással technikával. A transzlokáció hordozókat a diakinezis-metafázis I.-ben lévő primer spermocitákban talált multivalensek révén lehet felismerni. Legalább két sejtben kell találni multivalenseket ahhoz, hogy az állatot bizonyítottan transzlokáció hordozónak lehessen tartani.

Amennyiben nem történt tenyésztéses szelekció, minden F1 hímet meg kell vizsgálni citogenetikailag. Legkevesebb 25 diakinezis-metafázis I.-ben lévő sejtet kell mikroszkóposan megvizsgálni állatonként. El kell végezni a mitotikus metafázisok vizsgálatát is az F1 hímek spermiogoniumaiban vagy csontvelő sejtjeiben, amennyiben túl kicsik a herék, vagy a meiosis leállt a diakinezis előtt, vagy X0ra gyanús F1 nőstények vannak. Amennyiben egy szokatlanul hosszú és/vagy rövid kromoszóma van 10 sejt mindegyikében, az egy különleges hím steril transzlokációt bizonyít (c-t típus). Némelyik X-autoszóma transzlokáció, amely hím sterilítást okoz, csak a mitotikus kromoszómák sávanalízisével deríthető ki. Amennyiben 10 mitozis mindegyikében csak 39 kromoszóma van, ez a nőstény X0 állapotát bizonyítja.

2. ADATFELDOLGOZÁS

Az adatokat táblázatos formában adják meg.

A pároztatásokból származó átlagos alomszámot és nemi arányt a születés után és a választáskor is megadják minden pároztatási intervallumra.

Az F1 állatok fertilitásának felméréséhez megadják az átlagos alomszámot valamennyi normál pároztatásra, az F1 transzlokáció hordozók alomszámait pedig egyedileg adják meg. Az uterus tartalom vizsgálata esetén megadják az élő és elhalt implantátumok átlagát valamennyi normál pároztatásra, az F1 transzlokáció hordozók élő és elhalt implantátumainak számát pedig egyedileg adják meg minden egyes pároztatásra.

A diakinezis-metafázis I. cytogenetikai analízisére a multivalens konfigurációk számát és típusát, valamint az össz-sejtszámot adják meg minden transzlokáció hordozóra.

A steril F1 egyedek vonatkozásában feljegyzik a pároztatások össz számát és a pároztatási periódus tartamát adják meg. Megadják a herék súlyát és a citogenetikai vizsgálat részleteit is.

Az X0 nőstények esetében közlik az átlagos alomszámot, az F2 utódok nemi megoszlását, és a citogenetikai vizsgálat eredményét.

Amennyiben lehetséges az F1 transzlokáció hordozókat előszűrjük fertilitási vizsgálattal, és táblázatokban megadják, hogy ezek közül mennyi bizonyult megerősített transzlokációs heterozigótának.

Közlik a negatív kontroll adatokat és a pozitív kontroll kísérleteket.

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentés, amennyiben lehetséges tartalmazza az alábbi információkat:

- az egér törzs, az állatok életkora és a kezelt állatok testsúlya,
- mindkét nemű szülői állatok száma a kezelt és kontroll csoportokban,
- vizsgálati körülmények, a kezelés, a dózisszintek, az oldószerek és a pároztatás rendjének részletes leírása,
- az utódok száma és neme nőstényenként, továbbá azoknak az utódoknak a száma és neme, amelyek transzlokációs analízisre kerültek,
 - a transzlokációs analízis ideje és kritériumai,
 - a transzlokáció hordozók száma és részletes leírása, beleértve a tenyésztésre és az uterus tartalomra vonatkozó adatokat, amennyiben nézték,
 - citogenetikai eljárások, mikroszkópos vizsgálat részletei, előnyben részesítve az elváltozások képi megjelenítését,
 - statisztikai értékelés,
 - az eredmények megbeszélése,
 - az eredmények értelmezése.

3.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

Lásd: Általános bevezetés B. rész (G).

4. HIVATKOZÁSOK

Lásd: Általános bevezetés B. rész (H).

B.26. SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT - 90 NAPOS ISMÉTELT ORÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

Ez a szubkrónikus orális toxicitási vizsgálató módszer az OECD TG 408 (1998) másolata.

1.1. Bevezetés

Valamely vegyi anyag toxikus jellemzőinek felmérése és értékelése során, az orális ismételt adású szubkrónikus toxicitás meghatározását, az akut vagy 28 napos ismételt adású toxicitási vizsgálatokból nyert korábbi információk alapján lehet elvégezni. A 90 napos vizsgálat olyan hosszabb időtartamú ismételt expozíció által okozott lehetséges egészségkárosodás veszélyeiről szolgáltat információkat, ami időben magába foglalja az elválasztástól a felnőttkorig terjedő fejlődés és növekedés szakaszát. A vizsgálat információkkal szolgál a fő toxikus hatásokról, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét, és alapul szolgálhat az expozíció kimutatható káros hatással nem járó szintjének (NOAEL) a felméréséhez, ami felhasználható a krónikus vizsgálatok dózisszintjeinek kiválasztásához, továbbá a humán expozíció biztonsági kritériumainak a megállapításához.

A módszer továbbá külön súlyt helyez a neurológiai végpontokra és jelzi az immunológiai és a reprodukciós hatásokat. Hangsúlyozott az állatok olyan fokú gondos klinikai megfigyelésének a szükségessége, hogy az a lehető legtöbb információval szolgáljon. A vizsgálatnak alkalmasnak kell lenni a neurotoxikus, valamint az immunológiai és reprodukciós szervhatásokkal rendelkező vegyületek kimutatására, amelyek további, alaposabb vizsgálatok elvégzését tehetik indokolttá.

Lásd még az Általános Bevezetés B. részét is.

1.2. Fogalommeghatározások

Dózis: a beadott vizsgálati anyag mennyisége. A dózis megadható mint tömeg (g, mg), vagy mint tömeg a kísérleti állat egységnyi testtömegére vonatkoztatva (pl. mg/kg), vagy mint állandó koncentráció (ppm) a tápban.

Dozírozás (adagolás): általános meghatározás, ami magában foglalja a dózist, a kezelés gyakoriságát és a kezelés időtartamát.

NOAEL: a kimutatható káros hatással nem járó dózisszint rövidítése (no observed adverse effect level). Ez a legmagasabb olyan dózisszint, ahol még nem figyelhetők meg a kezelésnek tulajdonítható káros elváltozások.

1.3. A vizsgálati módszer alapelve

A vizsgálati anyagot 90 napon keresztül naponta adják lépcsőzetesen emelkedő dózisban szájon át a kísérleti állatok csoportjainak (egy dózisszint jelent egy csoportot). A kezelés alatt az állatokon a toxikus tüneteket gondosan meg kell figyelni. A vizsgálat alatt elhullott vagy megölt állatokat fel kell boncolni. A vizsgálat végén a túlélő állatokat is megölik és azokat is fel kell boncolni.

1.4. A vizsgálati módszer leírása

1.4.1. Az állatok előkészítése

Olyan egészséges állatokat kell használni, amelyek már legalább öt napon át alkalmazkodtak a laboratóriumi körülményekhez, és amelyeken korábban semmilyen vizsgálatot nem végeztek. Meg kell adni a kísérleti állatok fajtát, törzsét, származását, nemét, testtömegét és/vagy életkorát. Az állatokat véletlenszerűen (random) kell kontroll és kezelt csoportokba sorolni. Az állattartó dobozokat úgy kell elrendezni, hogy a dobozok elhelyezéséből fakadó lehetséges hatások minimálisak legyenek. Minden egyes állatot egyedi azonosító számmal kell megjelölni.

1.4.2. A dózisok elkészítése

A vizsgálati anyagot szondával, a tápba keverve, vagy az ivóvízzel adják be. Az orális kezelés módja, a vizsgálat céljától, valamint a vizsgálati anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ.

Amennyiben szükséges, a vizsgálati anyagot egy megfelelő vivőszerben oldják vagy szuszpendálják. Ajánlott, hogy amennyiben lehetséges, először a vizes oldat/szuszpénzió használatát vegyék számításba, majd ezután egy olajjal (kukorica olajjal) készített oldat/emulzió használatát, és csak végül más vivőszerrel készített oldatokét. Amennyiben nem vizet használnak, ismerni kell a vivőszer toxikus jellemzőit. Meg kell határozni a vizsgálati anyag stabilitását a kezelés körülményei között.

1.4.3. Vizsgálati feltételek

1.4.3.1. Kísérleti állatok

Ajánlott faj a patkány, de más rágcsáló faj, pl. egér is használható. A szokásosan használt laboratóriumi törzsek fiatal felnőtt egészséges állatait kell használni. A nőtények egyszer sem fialhattak (nulliparák), és nem lehetnek vemhesek. A kezelést, az elválasztás után, amilyen hamar csak lehet, kell megkezdeni, de minden esetben az állatok kilenches kora előtt. A vizsgálat megkezdésekor az egyes állatok testtömege egyik nemből sem térhet el a testtömegek átlagától több mint $\pm 20\%$ -kal. Amennyiben a vizsgálat egy hosszantartó krónikus toxicitási vizsgálat előkísérlete, úgy mindkét vizsgálatban ugyanazon forrásból származó és ugyanazt az állattörzset kell használni.

1.4.3.2. Állatszám és nem

Legalább 20 állatot (10 nőstényt és 10 hímeket) kell használni minden dózisszinten. Amennyiben időközi ölést is terveznek, annyi állatot kell még beállítani, amennyit az időközi ölésre szántak. A vegyi anyagra vagy közeli analógjára vonatkozó előzetes információk alapján fontolóra kell venni kiegészítő kontroll- és nagy dózissal kezelt csoportok (nemenként 5 állat) beállítását a kezelés után, hogy a toxikus hatások reverzibilitását vagy tartósságát meg lehessen állapítani. A kezelés után a megfelelő megfigyelési időtartam megállapításánál figyelembe kell venni az észlelt toxikus hatást.

1.4.3.3. Dózisszintek

A határérték-vizsgálat kivételével (lásd az 1.4.3.4. pontot) legalább három dózisszintet és egy egyidejű kontrollt kell beállítani. A dózisszintek alapulhatnak egy előzetesen ismételt adagolású kezeléssel végzett vagy a dóziskereső vizsgálat eredményein, de figyelembe kell venni minden rendelkezésre álló, a vizsgálati anyagra, vagy a hasonló anyagokra vonatkozó toxikológiai és toxikokinetikai adatot is. Amennyiben a vizsgálati anyag fizikai-kémiai tulajdonságai, vagy biológiai hatásai nem korlátozzák, a legmagasabb dózisszintet úgy kell megválasztani, hogy toxikus tünetek legyenek, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést az állatoknak. Fokozatosan csökkenő dózissort kell választani abból a célból, hogy kimutatható legyen bármilyen dóziszfüggő válasz és a kimutatható káros hatással nem járó dózisszint (NOAEL) a legalacsonyabb dózisszinten legyen. A csökkenő dózisonál leggyakrabban a két-négyszeres dóziskülönbség az optimális. Továbbá gyakran hasznos negyedik csoportot is beállítani igen nagy különbséggel a dózisek között (pl. több mint hat-tízszerez különbség).

A kontroll csoportnak kezeletlennek vagy vivőszerez kontrollnak kell lennie, amennyiben a beadás vivőszerezrel történt. A kontroll csoport állataival, a vizsgálati anyag adását kivéve, ugyanúgy kell bánni, mint a vizsgálati anyaggal kezelt állatokkal. Amennyiben vivőszert használnak, a kontroll csoportnak a vivőszert az alkalmazott legnagyobb térfogatban kell adni. Amennyiben a vizsgálati anyagot a tápban adják, és ez csökkent tápfelvételt okoz, hasznos lehet egy azonos tápbevitelű kontroll csoportot beállítani annak eldöntésére, hogy a csökkenést a táp íze okozza-e, vagy az toxikus hatás következménye.

A vivőszereznek vagy más adalékanyagoknak a következő jellemzőit kell mérlegelni: a vizsgálati anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára, vagy tárolására gyakorolt hatások; a vizsgálati anyag kémiai tulajdonságaira kifejtett hatások, amelyek befolyásolhatják annak toxikus jellemzőit, valamint a táp- és a vízfelvételre, vagy az állatok tápláltságára gyakorolt hatások.

1.4.3.4. Határérték vizsgálat (Limit teszt)

Amennyiben a vizsgálat egy dózisszinten, ami legalább 1000 mg/testtömeg kg/nap, az erre a vizsgálatra leírt eljárást használva nem okoz kimutatható káros hatást, és ha a hasonló szerkezetű vegyületekre vonatkozó adatok alapján nem is várható toxicitás, akkor a teljes vizsgálat három dózisszinttel nem tartható szükségesnek. A határérték vizsgálat minden esetben alkalmazható annak a kivételével, amikor a humán expozíció teszi indokolttá a magasabb dózisszint használatát.

1.5. Vizsgálati eljárás

1.5.1. A dózisek beadása

Az állatokat 90 napon át a hét mindennapján kezelni kell a vizsgálati anyaggal. Bármilyen más kezelési sémát, pl. hetente csak öt kezelést, meg kell indokolni. Amennyiben a vizsgálati anyagot szondával adják be, ezt megfelelő gyomorszondát vagy intubációs kanült használva egyszerre (egy adagban) kell beadni. Az egy kezeléssel beadható maximális folyadékterfogat az állat nagyságától függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeget, a vizes oldatok kivételével, amikor a térfogat 2 ml/100 g testtömeg is lehet. Az irritációt és felmaródást okozó anyagok kivételével, amelyek nagyobb koncentrációban általában igen súlyos elváltozásokat okoznak, a dózistérfogatot a lehető legkisebb mértékben kell változtatni, úgy, hogy a vizsgálati anyag koncentrációjának beállításával minden dózisszinten azonos legyen a dózistérfogat.

A táppal vagy az ivóvízzel beadott anyagoknál fontos annak a biztosítása, hogy a vizsgálati anyag mennyisége ne befolyásolja a szokásos táplálkozást és ne borítsa fel a folyadék egyensúlyt. A vizsgálati anyagot a táppal adják, vagy állandó koncentrációjú (ppm) tápot adnak, vagy az állatok testtömegére vonatkoztatott állandó dózisszintet alkalmaznak; de bármelyik lehetőséget is választják, azt pontosan meg kell adni. Azokat az anyagokat, amelyeket szondával adnak be, mindennap azonos időpontban kell adni úgy, hogy a dózisszintek az állatok testtömegére vonatkoztatva állandóak legyenek. Amennyiben a 90 napos vizsgálat egy hosszantartó krónikus toxicitási vizsgálat előkísérlete, mindkét vizsgálatban hasonló tápot kell használni.

1.5.2. Megfigyelések

A megfigyelésnek legalább 90 napig kell tartania. A kiegészítő csoport állatait, amelyeket a kezelést követő megfigyelésre szánnak, hogy a toxikus hatások tartósságát vagy gyógyulását meg lehessen állapítani, kezelés nélkül megfelelő ideig kell tartani.

Általános klinikai megfigyelést kell végezni mindennap legalább egyszer, lehetőség szerint mindig ugyanabban az időpontban, figyelembe véve a tünetek jelentkezésének a kezelés után várható maximumát. Az állatok klinikai állapotáról jegyzőkönyvet kell vezetni. Naponta legalább kétszer, rendszerint a munkanap kezdetén és végén, valamennyi állaton meg kell figyelni a megbetegedések és elhullások tüneteit.

Az első expozíció előtt legalább egyszer, majd még egyszer a kezelés megkezdése után egy héttel, részletes klinikai megfigyelést kell végezni minden állaton (lehetővé téve a kezelt és a kezeletlen állapot összehasonlítását). A megfigyelést a dobozon kívül kell végezni állandó helyen, hasonló időpontban minden alkalommal. A megfigyeléseket gondosan jegyzőkönyvezni kell, előnyben részesítve a vizsgáló laboratórium által egyértelműen meghatározott pontozásos rendszert. Törekedni kell arra, hogy a megfigyelés körülményeinek változásai minimálisak legyenek. A megfigyelt tüneteknek ki kell terjedniük, de nem korlátozandók, a bőrelváltozásokra, a nyelv lepedékre, a szemekre, nyálkahártyákra, szekréciós és exkréciós funkciókra, a vegetatív tünetekre (könnyezés, szőrborzolás, pupillatágasság, szokatlan légzésmód). A járásmódban, testtartásban, a kézbevitelre bekövetkezett változásokat, továbbá a tónusos vagy klónusos görcsök jelentkezését, sztereotípiákat (fokozott „mosakodás”, megkergülés) vagy a bizarr viselkedésmódot (pl. öncsonkítás, hátramenés) is jegyzőkönyvezni kell (1).

Szemtükörrel vagy erre a célra alkalmas más eszközzel szemészeti vizsgálatot végezni a kezelés megkezdése előtt és a kezelés befejezésekor lehetőség szerint minden állaton, de legalább a nagydózissal kezelt és a kontroll csoport állatain. Amennyiben van valamilyen elváltozás a szemben, valamennyi állatot meg kell vizsgálni.

Az expozíciós időszak vége felé, de nem korábban, mint a 11. héten, meg kell határozni a különböző típusú ingerekre (1) (pl. akusztikus, vizuális és proprioceptív) adott szenzoros reakciókat (2), (3), (4), továbbá kapaszkodási erőt (5) és a motoros aktivitást (6). Az eljárások további részleteit a megfelelő hivatkozások tartalmazzák, de a hivatkozottakon kívül más, alternatív eljárások is használhatók.

A vizsgálat vége felé a funkcionális megfigyelések elhagyhatók, amennyiben más vizsgálatokból vannak rá adatok és a naponkénti klinikai megfigyelések nem utalnak semmilyen funkcionális károsodásra.

A funkcionális megfigyelések kivételesen azoknál a csoportoknál is mellőzhetők, amelyeknél olyan súlyos toxikus tünetek láthatók, amelyek már erősen gátolnák a funkcionális módszerek alkalmazását.

1.5.2.1. Testtömeg és a táp/vízfogyasztás

Valamennyi állat testtömegét hetente legalább egyszer meg kell mérni. A tápfogyasztást legalább hetente kell mérni. Amennyiben a vizsgálati anyag beadása az ivóvízzel történik, a vízfogyasztást is legalább hetente kell mérni. A vízfogyasztás mérését akkor is meg kell fontolni, ha a beadás szondával, vagy a táppal történik, mert ez megváltoztathatja az ivási szokásokat.

1.5.2.2. Hematológia és klinikai kémia

Vérmintát kell venni egy megnevezett helyről, és amennyiben lehetséges, azt megfelelő körülmények között kell tárolni. A vizsgálat végén vagy a vizsgálat részeként, közvetlenül az állatok kiírtása előtt kell vért venni.

A következő vizsgálatokat kell elvégezni a vizsgálat befejezése előtt (vagy időközben) vett vérből: hematokrit, hemoglobinn koncentráció, vörösvértestszám, összes fehérvérsejtszám, minőségi vérkép, trombocitaszám, véralvadási idő/képesség..

Klinikai kémiai meghatározásokat kell végezni a szövetekre gyakorolt fő toxikus hatások és speciálisan a vesékre és a májra kifejtett hatások vizsgálatára minden egyes állattól közvetlenül a megölés előtt vagy az alatt vett, valamint az időközben (moribund állapot miatt, vagy tervezett kiírtás) megölt állatoktól vett vérből. A hematológiai vizsgálatokhoz hasonlóan az időközben vett vérmintákból a kémiai vizsgálatokat is el lehet végezni. Ajánlott a vérvételt megelőző éjszakán az állatokat éhezteni.⁽¹⁾ A következő meghatározásokat kell a szérumból vagy a plazmából elvégezni: nátrium, kálium, glukóz, összes koleszterin, karbamid, vér karbamid-nitrogén, kreatinin, összes protein és albumin, több mint két májkárosodást jelző enzim (alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, alkalikus foszfatáz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, szorbit-dehidrogenáz). A fentiek kiegészíthetők más (máj vagy más eredetű) enzimek és az epesavak meghatározásával is, amelyek bizonyos körülmények között további hasznos információkkal szolgálhatnak.

⁽¹⁾ Számos a szérumban és a plazmában végzett meghatározáshoz, mindenképp a vércukor meghatározáshoz, előnyben kell részesíteni a vérvételt megelőző éjszakán keresztüli éheztetést. Az előnyben részesítésnek fő oka a fokozott változékonyság, ami a nem-éhez állapotban elkerülhetetlen, és ami elfedheti a gyenge hatásokat, megnehezítheti az eredmények értelmezését. Más oldalról viszont az éjszakai éhezés befolyásolhatja az állatok általános metabolizmusát, és különösen az etetési vizsgálatoknál megzavarhatja a vizsgálati anyag naponta jelentkező hatását. Amennyiben az éjszakai éheztetést elfogadják, a klinikai kémiai meghatározásokat a funkcionális vizsgálatok után kell végezni.

Választhatóan a következő meghatározások végezhetőek el az utolsó héten, meghatározott ideig gyűjtött vizeletből: megjelenés, térfogat, ozmolalitás vagy sűrűség, pH, fehérje, glukóz és vér/vérsejtek.

Azonkívül mérlegelni kell az általános szövethárosodásra utaló mutatóknak a szérumból történő meghatározását is. De más meghatározások is végezhetőek a vizsgálati anyag ismert tulajdonságai miatt, vagy az olyan tulajdonságokra utaló gyanúnál, mint amilyenek a metabolikus profil megváltoztatása, beleértve a kalciumot, foszfort, éhezési triglicerideket, specifikus hormonokat, methemoglobint és a kolinszterázt. Ezeknek az elvégzését indokolhatja bizonyos kémiai osztályokba való tartozás, vagy végezhetik esetről-esetre történő mérlegelés alapján is.

Általánosságban rugalmas megközelítésre van szükség, ami a fajtól, és a vizsgálati anyag megfigyelt vagy várható hatásaitól függ.

Amennyiben a történelmi alapértékek/tartományok nem használhatók, meg kell fontolni, hogy melyik hematológiai vagy klinikai kémiai paramétert szükséges meghatározni a kezelés megkezdése előtt; általánosságban nem ajánlott ezeket a kezelés megkezdése előtt meghatározni (7).

1.5.2.3. Boncolás

Valamennyi, a vizsgálatban részt vett állatot teljesen és részletesen fel kell boncolni, ami magában foglalja a testfelszín, valamennyi testnyílás, a koponya-, mell- és hasüreg és valamint ezek szerveinek a gondos vizsgálatát. Valamennyi állatnak (beleértve a haldoklókat és/vagy az időközi megölteket) a máját, veséit, mellékveséit, heréit, mellékheréit, méhét, ováriumait, csecsemőmirigyét, lépét, agyát és szívét megfelelő módon meg kell tisztítani a környező szövetektől, és a kiszáradás elkerülése érdekében, amilyen gyorsan csak lehet, nedves tömegüket meg kell mérni.

A következő szöveteket kell konzerválni a legmegfelelőbb fixálószerben a későbbi szövettani vizsgálatokhoz: valamennyi makroszkópos elváltozást, az agy reprezentatív régióit (beleértve a nagy- és kisagyat, valamint a hidat/nyúltagyat), gerincagy három szelvényét (nyaki, mellkas-középi és ágyéki), agyalapi mirigyét, pajzsmirigyét, mellékpajzsmirigyét, csecsemőmirigyét, nyelöcsövet, nyálmirigyeket, gyomrot, vékony- és vastagbeleket (beleértve a Peyer-plaque-okat), májat, hasnyálmirigyét, veséket, mellékveséket, lépét, szívet, légsövet és a tüdőt (fixálószerrel való feltöltés után belemérés), aortát, heréket és ováriumokat, méhet, járulékos ivarszerveket, emlőt (nőstényekből), prosztatát, húgyhólyagot, epehólyagot (egerekből), nyirokcsomókat (előnyben részesítve a beadás helyéhez közeli /tájéki/, és a lehetséges szisztémás hatások miatt, az attól távoli nyirokcsomókat), perifériás ideget (N. ischiadicust vagy N. tibialist) szorosan az izom proximális végénél, csontvelő metszetet (és/vagy friss csontvelő aspirátumot), bőrt és szemeket (ha a szemészeti vizsgálat kóros eltérést mutatott). A klinikai és más leletek, más szövetek vizsgálatának a szükségességére is utalhatnak. De minden olyan szövet vizsgálatát is meg kell fontolni, ami a vizsgálati anyag ismert tulajdonságai alapján célszerűként felmerülhet.

1.5.2.4. Kórszövetten

El kell végezni valamennyi nagy dózissal kezelt és kontroll állat fixált szöveteinek és szerveinek teljes körű kórszövetten vizsgálatát. Amennyiben a nagy dózissal kezelt állatokban valamilyen szerhatás állapítható meg, a szövettani vizsgálatot ki kell terjeszteni valamennyi dóziscsoport valamennyi állatára.

Valamennyi makroszkópos elváltozást meg kell vizsgálni.

Amennyiben kiegészítő csoport is volt, azokból a szervekből és szövetekből kell szövettani vizsgálatot végezni, amelyek elváltozást mutattak a kezelt csoportokban.

2. ADATOK ÉS JELENTÉS

2.1. Adatok

Az adatokat egyedileg kell megadni. Továbbá valamennyi adatot össze kell foglalni táblázatos formában, megadva minden csoportra az állatszámot a vizsgálat megkezdésekor, valamint az elhullott vagy humánus okokból megölt állatok számát minden időpontban, a toxikus tüneteket mutató állatok számát, a megfigyelt toxikus tünetek leírását, beleértve jelentkezésük kezdetét, tartamukat, minden toxikus hatás súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusait, és minden egyes típusú elváltozást hordozó állatok százalékos megoszlását.

Amennyiben alkalmazható, a számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel kell értékelni. A feldolgozandó adatokat és statisztikai módszereket már a vizsgálati terv összeállításakor meg kell választani.

2.2. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmazni:

2.2.1. Vizsgálati anyag:

fizikai jellemzése, tisztasága, fizikai-kémiai tulajdonságai, azonosítására vonatkozó adatok,

vivőszer (ha volt): amennyiben nem víz volt a vivőszer, indoklás.

2.2.2. Állatfaj:

használt faj és törzs,
az állatok száma, kora és neme,
származásuk, tartási körülmények, táp stb.,
minden állat egyedi testtömege a vizsgálat megkezdésekor.

2.2.2. Vizsgálati körülmények:

a dóziszintek kiválasztásának a logikája,
a vizsgálati anyag formulálásának/a táp elkészítésének a részletei, az elért koncentrációk, a preparátum stabilitása és homogenitása,

a vizsgálati anyag beadásának a részletezése,
aktuális dózisok (mg/testtömeg kg/nap) és ha lehetséges, átszámítási faktor a vizsgálati anyag aktuális dózisaira a tápba vagy ivóvízbe kevert anyag koncentrációiból (ppm),

a táp és az ivóvíz minőségének a részletezése.

2.2.3. Eredmények:

testtömeg és testtömegváltozások,
táp- és vízfogyasztás (ha indokolt),
toxikus reakciók nemenként és dóziszintenként, beleértve a toxicitás tüneteit,
a klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek-e vagy sem),
a szemészeti vizsgálat eredményei,

szenzoros aktivitás, kapaszkodási erő, motoros aktivitás felmérése (ha történt),

hematológiai adatok a megfelelő normál értékekkel,

klinikai kémiai adatok a megfelelő normál értékekkel,

terminális testtömeg, szervtömeg, szervtömeg/testtömeg hányadosok,

boncolási leletek,

valamennyi kórszövettani elváltozás részletes leírása,

a felszívódásra vonatkozó adatok, ha vannak,

az eredmények statisztikai értékelése, ha indokolt.

Az eredmények megvitatása.

Következtetések.

2. HIVATKOZÁSOK

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp. 999-1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, pp. 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, pp. 267-283.

(5) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C., Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Foreand Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, pp. 233-236.

(6) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, pp. 599-609.

(7) Weingand, K., Brown, G., Hall, R. et al. (1996). 'Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies', *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, pp. 198-201.

B.27. SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT - 90 NAPOS ISMÉTELT ORÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT NEM-RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

Ez a szubkrónikus orális toxicitási vizsgálati módszer az OECD TG 409 (1998) másolata.

1.1. Bevezetés

Valamely vegyi anyag toxikus jellemzőinek meghatározásához és értékeléséhez az ismételt adagolású orális szubkrónikus toxicitás meghatározását az akut, vagy 28 napos ismételt adagolású toxicitási vizsgálatokból nyert korábbi információk alapján lehet elvégezni. A 90 napos vizsgálat olyan hosszabb időtartamú ismételt expozícióból származó lehetséges egészségkárosodás veszélyeiről szolgáltat információkat, ami időben átfogja a fiatal felnőttkorig terjedő gyors növekedés szakaszát. A vizsgálat információkkal szolgál a fő toxikus hatásokról, jelzi a célszerveket és a felhalmozódás lehetőségét, lehetőséget nyújt az expozíció kimutatható káros hatással nem járó szintjének (NOAEL) a felméréséhez, ami felhasználható a krónikus vizsgálatok dózisszintjeinek kiválasztásához, továbbá a humán expozíció biztonsági kritériumainak a megállapításához.

A módszer lehetőséget ad a vegyi expozíció káros hatásainak kimutatására nem-rágcsáló fajokban, de csak akkor kell elvégezni:

- ha ezeknek egy nem-rágcsáló fajban történő tisztázását/jellemzését más vizsgálatokban észlelt hatások indokolják, vagy
 - amikor toxikokinetikai vizsgálatok utalnak arra, hogy egy specifikus nem-rágcsáló faj alkalmazása a legalkalmasabb laboratóriumi állat, vagy
 - amikor más, speciális ok indokolja egy nem-rágcsáló faj használatát.
- Lásd még az Általános Bevezetés B. részét is.

1.2. Fogalom meghatározások

Dózis: a beadott vizsgálati anyag mennyisége. A dózis megadható mint tömeg (g, mg), vagy mint tömeg a kísérleti állat egységnyi testtömegére vonatkoztatva (pl. mg/kg), vagy mint állandó tápkoncentráció (ppm).

Dozírozás (adagolás): általános meghatározás, ami magában foglalja a dózist, a kezelés gyakoriságát és a kezelés időtartamát.

NOAEL: a kimutatható káros hatással nem járó dózisszint (no observed adverse effect level) rövidítése. Ez a legmagasabb olyan dózisszint, ahol még nem figyelhető meg kezelésnek tulajdonítható káros elváltozás.

1.3. A vizsgálati módszer alapelve

A vizsgálati anyagot 90 napon keresztül naponta szájon át adják lépcsőzetesen emelkedő dózisban a kísérleti állatok csoportjainak (egy dózisszint jelent egy csoportot). Az adagolás alatt az állatokon a toxikus tüneteket gondosan meg kell figyelni. A vizsgálat alatt elhullott vagy megölt állatokat fel kell boncolni. A vizsgálat végén a túlélő állatokat is megölik és azokat is fel kell boncolni.

1.4. A vizsgálati módszer leírása

1.4.1. Az állatfaj kiválasztása

Általánosan használt nem-rágcsáló faj a meghatározott tenyészetből származó kutya; gyakran használják a beagle kutyát. Más fajok, pl. sertés, törpesertés is használható. Főemlősök nem ajánlottak, használatukat meg kell indokolni. Fiatal, egészséges állatokat kell használni, kutyáknál a kezelés megkezdésére előnyben részesítendő a 4–6 hónapos kor, de nem későbbi mint a kilenchnapos életkor. Amennyiben a vizsgálat, egy hosszantartó krónikus toxicitási vizsgálat előkísérlete, mindkét vizsgálatban ugyanazt az állattörzset/tenyészetet kell használni.

1.4.2. Az állatok előkészítése

Egészséges fiatal állatokat kell használni, amelyek már alkalmazkodtak a laboratóriumi körülményekhez, és amelyekben korábban semmilyen vizsgálatot nem végeztek. Az akklimatizálódás időtartama a választott állatfajtól és annak származásától függ. Legalább 5 nap az állandó forrásból származó kutyáknál és az e célból tenyésztett sertéseknél, de ugyanezen fajknál legalább két hét, ha külső forrásból származókat ajánlanak. Meg kell adni a kísérleti állatok fajtát, törzsét, származását, nemét, testtömegét és/vagy életkorát. Az állatokat véletlenszerűen (random) sorolják be kontroll és kezelt csoportokba. Az állattartó ketreceket úgy kell elrendezni, hogy a ketrecek elhelyezéséből fakadó lehetséges hatások a minimálisak legyenek. Minden állatot egyedi azonosító számmal kell megjelölni.

1.4.3. A dózisok elkészítése

A vizsgálati anyagot a tápba keverve vagy az ivóvízzel, szondával vagy kapszulában adják be. Az orális kezelés módja a vizsgálat céljától, valamint a vizsgálati anyag fizikai-kémiai tulajdonságaitól függ.

Amennyiben szükséges, a vizsgálati anyagot egy megfelelő vivőszerben oldják vagy szuszpendálják. Amennyiben lehetséges, ajánlott, hogy először valamely vizes oldat/szuszenzió, majd ezután egy olajjal (kukorica olajjal) készített oldat/emulzió alkalmazását mérlegetljék, és csak akkor az egyéb vivőszerekkel készített oldatokét. Amennyiben nem vizet használnak, ismerni kell a vivőszer toxikus jellemzőit. Meg kell határozni a vizsgálati anyag stabilitását a kezelés körülményei között.

1.5. A vizsgálat kivitelezése

1.5.1. Állatszám és nem

Minden dózisszinten legalább 8 állatot (4 nőtényt és 4 hímét) kell használni. Amennyiben időközi ölést is terveznek, annyi állatot kell még beállítani, amennyit az időközi ölésre szántak. A vizsgálat befejezésekor megfelelő számú állatnak kell maradnia a toxikus hatások egyértelmű értékeléséhez. A vizsgálati anyagra vagy közeli analógjára vonatkozó előzetes információk alapján fontolóra kell venni kiegészítő kontroll és nagy dózissal kezelt csoportok (nemenként 4 állat) beállítását a kezelés utáni megfigyelésre, a toxikus hatások reverzibilitásának vagy tartósságának a megállapítására. A kezelés után megfigyelés megfelelő időtartamának a megállapításánál figyelembe kell venni az észlelt toxikus hatást.

1.5.2. Adagolás

A határérték vizsgálat kivételével (lásd az 1.5.3. pontot) legalább 3 dózisszintet és egy egyidejű kontrollt kell beállítani. A dózisszintek alapulhatnak egy előzetes ismételt adagolású vagy a dóziskereső vizsgálat eredményein, de figyelembe kell venni minden rendelkezésre álló, a vizsgálati anyagra, vagy a hasonló anyagokra vonatkozó toxikológiai és toxikokinetikai adatot is. Amennyiben a vizsgálati anyag fizikai-kémiai tulajdonságai, vagy biológiai hatásai nem korlátozzák, a legmagasabb dózisszintet úgy kell megválasztani, hogy toxikus tünetek legyenek, de ne okozzon elhullást, vagy súlyos szenvedést az állatoknak. Fokozatosan csökkenő dózissort kell választani, hogy bármilyen dózisfüggő válasz kimutatható legyen és a legalacsonyabb dózis megfeleljen a kimutatható káros hatással nem járó dózisszintnek (NOAEL). A csökkenő dózissornál gyakran a két-négyszeres dóziskülönbség az optimális. Továbbá gyakran hasznos egy negyedik csoportot is beállítani igen nagy különbséggel a dózisok között (pl. több mint hat-tízszerez különbség).

A kontroll csoportnak kezeletlennek, vagy vivőszeres kontrollnak kell lennie, amennyiben a beadás vivőszerrel történt. A kontroll csoport állataival, a vizsgálati anyag adását kivéve, ugyanúgy kell bánni, mint a vizsgálati anyaggal kezelt állatokkal. Amennyiben vivőszert használnak, a kontroll csoportnak a vivőszert az alkalmazott legnagyobb térfogatban kell adni. Amennyiben a vizsgálati anyagot a tápban adják, és ez csökkent tápfelvételt okoz, hasznos lehet egy azonos tápbevitelű kontroll csoportot beállítani annak elkülönítésére, hogy a csökkenést a táp íze okozza-e vagy az a toxikus hatás következménye.

A vivőszernek vagy más adalékanyagoknak a következő jellemzőit kell mérlegetlni: a vizsgálati anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára, vagy tárolására gyakorolt hatások; a vizsgálati anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek befolyásolhatják annak toxikus jellemzőit; valamint a táp- és a vízfelvétele, vagy az állatok tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

1.5.3. Határérték vizsgálat (limit teszt)

Amennyiben a vizsgálat egy dózisszinten, ami legalább 1 000 mg/testtömeg kg/nap, az erre a vizsgálatra leírt eljárást használva nem okoz kimutatható káros hatást, és ha a hasonló szerkezetű vegyi anyagokra vonatkozó adatok alapján nem is várható toxicitás, akkor a teljes vizsgálat három dózisszinttel nem tartható szükségesnek. A határérték vizsgálat minden esetben alkalmazható, kivéve, amikor a humán expozíció indokolja a magasabb dózisszint használatát.

1.5.4. A dózisok beadása

Az állatokat 90 napon át a hét mindennapján kezelni kell a vizsgálati anyaggal. Bármilyen más kezelési sémát, pl. hetente csak öt kezelést, meg kell indokolni. Amennyiben a vizsgálati anyagot szondával adják be, ezt egy megfelelő gyomorszondát vagy intubációs kanült használva egyszerre (egy adagban) kell beadni. Az egyszeri kezeléssel beadható maximális folyadékterfogat az állat nagyságától függ. Általában olyan kis térfogatban kell beadni, amilyen kevésben csak lehetséges. Az irritációt és felmaródást okozó anyagok kivételével, amelyek nagyobb koncentrációban általában igen súlyos tüneteket okoznak, a dózistérfogatot a lehető legkisebb mértékben szabad csak változtatni, úgy, hogy a vizsgálati anyag koncentrációjának a beállításával minden dózisszinten azonos legyen a dózistérfogat.

A táppal vagy az ivóvízzel beadott anyagoknál fontos annak a biztosítása, hogy a vizsgálati anyag mennyisége ne befolyásolja a szokásos táplálkozást és ne borítsa fel a folyadék egyensúlyt. A vizsgálati anyagot a táppal adják, vagy állandó koncentrációjú (ppm) tápot adnak, vagy az állatok testtömegére vonatkoztatott állandó dózisszintet alkalmaznak; bármelyik lehetőséget is használják, azt pontosan meg kell adni. Azokat az anyagokat, amelyeket szondával vagy kapszulában adnak be, mindennap azonos időpontban kell adni úgy, hogy a dózisszintek az állatok testtömegére vonatkoztatva állandóak legyenek. Amennyiben a 90 napos vizsgálat egy hosszantartó krónikus toxicitási vizsgálat előkísérlete, mindkét vizsgálatban hasonló tápot kell használni.

1.5.5. Megfigyelések

A megfigyelésnek legalább 90 napig kell tartania. A kiegészítő csoport állatait, amelyeket a toxikus hatások tartósságának vagy gyógyulásának a megállapítására a kezelés utáni megfigyelésre szánnak, kezelés nélkül megfelelő ideig kell tartani.

Általános klinikai megfigyelést kell végezni mindennap legalább egyszer, lehetőség szerint mindig ugyanabban az időpontban, figyelembe véve, a tünetek jelentkezésének a kezelést követő várható maximumát. Az állatok klinikai állapotáról jegyzőkönyvet kell vezetni. Naponta legalább kétszer, rendszerint a munkanap kezdetén és végén, a megbetegedések és elhullások tüneteit valamennyi állaton meg kell figyelni.

Az első expozíció előtt legalább egyszer, majd még egyszer a kezelés megkezdése után egy héttel, minden állaton részletes klinikai megfigyelést kell végezni (lehetővé téve a kezelt és kezeletlen állapot összehasonlítását). A megfigyelést a ketrecen kívül kell végezni állandó helyen, minden alkalommal hasonló időpontban. Arra kell törekedni, hogy a megfigyelési körülmények változásai minimálisak legyenek. A toxikus tüneteket gondosan jegyzőkönyvezni kell, beleértve jelentkezésük időpontját, mértéküket és tartamukat. A megfigyelt tüneteknek ki kell terjedniük, de nem korlátozandók a bőrelváltozásokra, szőrzetre, szemekre, nyálkahártyákra, a szekrétumokra és exkrétumokra és a vegetatív funkciókra (pl. könnyezés, szőrzet, pupilla tágasság, szokatlan légzésmód). A változások a járásmódban, a testtartásban, reakciók a kézbevitelnél, valamint a tónusos vagy klónusos görcsök jelentkezése, sztereotípiák (pl. fokozott mosakodás/tisztálkodás, megkegyülés), vagy bármilyen bizarr viselkedésmód is jegyzőkönyvezendő.

Szemetükörrel vagy erre a célra alkalmas más eszközzel szemészeti vizsgálatot kell végezni a kezelés megkezdése előtt és a kezelés befejezésekor lehetőség szerint minden állaton, de legalább a nagy dózissal és a kontroll csoport állatain. Amennyiben van valamilyen elváltozás a szemben, valamennyi állatot meg kell vizsgálni.

1.5.5.1. Testtömeg és táp/vízfogyasztás

Valamennyi állat testtömegét hetente legalább egyszer meg kell mérni. A tápfogyasztást legalább hetente kell mérni. Amennyiben a vizsgálati anyag beadása az ivóvízzel történik, a vízfogyasztást is legalább hetente kell mérni. A vízfogyasztás mérését akkor is mérlegelni kell, ha a beadás szondával, vagy a táppal történik, mert ez megváltoztathatja az ivási szokásokat.

1.5.5.2. Hematológia és klinikai kémia

Egy megnevezett helyről vérmintákat kell venni, és amennyiben lehetséges, azt megfelelő körülmények között tárolni. A vizsgálat végén, közvetlenül az állatok megölése előtt, esetleg annak részeként vért kell venni.

A vizsgálat megkezdésekor, majd havonta, vagy a vizsgálat közepén és a végén vett vérből a következő vizsgálatokat kell elvégezni: hematokrit, hemoglobinn koncentráció, vörösvértest szám, összes fehérvérsejtszám, minőségi vérkép, trombocitaszám, véralvadási idő/képesség, protrombin idő vagy trombolasztin idő.

Klinikai kémiai meghatározásokat kell végezni a szövetekre gyakorolt fő toxikus hatások és speciálisan a vesékre és a májra kifejtett hatások vizsgálatára minden egyes állatnál a vizsgálat kezdetekor, majd havonta, vagy a vizsgálat közepén és végén. Elsősorban az elektrolitegyensúly, a szénhidrát anyagcsere, valamint a máj- és vesefunkció vizsgálatát kell mérlegelni. A speciális vizsgálatok kiválasztását a vizsgálati anyag hatásmódjára vonatkozó megfigyelések befolyásolhatják. Az állatokat vérvétel előtt megfelelő ideig éheztetni kell. A javasolt meghatározások: kalcium, foszfát, klorid, nátrium, kálium, éhgyomri glukóz, alanin-aminotranszferáz, aszpartát-aminotranszferáz, ornitin-dekarboxiláz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, karbamid nitrogén, albumin, vér kreatinin, összes bilirubin és összes szérumprotein.

Vizeletvizsgálatot legalább a vizsgálat kezdetén, közepén és a végén kell végezni meghatározott ideig gyűjtött vizeletből. A meghatározások kiterjednek a megjelenésre, térfogatra, ozmolalításra vagy sűrűsége, pH-ra, fehérjére, glukózra és vérre/vérsejtekre. Amennyiben szükséges, további vizsgálatok is végezhetők, kiterjesztve azok körét a megfigyelt hatások vizsgálatára.

Ezenkívül meg kell fontolni az általános szövetkárosodásra utaló mutatók meghatározását is. De a megfelelő toxikológiai értékeléshez egyéb meghatározások is szükségesek lehetnek, beleértve a lipidek, hormonok, sav-bázis egyentömeg, methemoglobin és kolineszterázgátló hatás vizsgálatát is. Amennyiben szükséges, további klinikai kémiai paraméterek is meghatározhatók, kiterjesztve azok körét a megfigyelt hatások vizsgálatára is.

Ezeknek az elvégzését bizonyos kémiai osztályhoz való tartozás indokolhatja, vagy végezhetik esetről-esetre történő mérlegelés alapján is.

Általánosságban rugalmas megközelítésre van szükség, ami a fajtól és a vizsgálati anyag megfigyelt vagy várható hatásaitól függ.

1.5.5.3. Boncolás

Valamennyi, a vizsgálatban részt vett állatot teljesen és részletesen fel kell boncolni, ami magában foglalja a testfelszín, valamennyi testnyílás, a koponya-, mell- és hasüreg és valamint ezek szerveinek a gondos vizsgálatát. A májat az epehólyaggal, veséket, mellékveséket, heréket, mellékheréket, petefészkeket, méhet, pajzsmirigyet

(a mellékpajzsmirigyekkel), csecsemőmirigyét, lépet, agyat és a szívet valamennyi állatból (beleértve a haldoklónak talált és/vagy időközben megölt állatokat) ki kell venni, megfelelő módon meg kell tisztítani a környező szövetektől, és a kiszáradás elkerülése érdekében, amilyen gyorsan csak lehet, meg kell mérni a nedves tömegüket.

A következőszöveteket kell konzerválni a legmegfelelőbb fixálószerben későbbi szövettani vizsgálathoz: valamennyi makroszkópos elváltozást, az agy reprezentatív régióit (beleértve a nagy- és kisagyat, valamint a hidat/nyúltagyat), gerincagy három szelvényét (nyaki, mellkas-középi és ágyéki), agyalapi mirigyét, szemeket, pajzsmirigyét, mellékpajzsmirigyét, csecsemőmirigyét, nyelöcsövet, nyálmirigyeket, gyomrot, vékony- és vastagbeleket (beleértve a Peyer-plaque-okat), májat, epehólyagot, hasnyálmirigyét, veséket, mellékveséket, lépet, szívet, légcsövet és a tüdőt, aortát, heréket és petefészkeket, méhet, járulékos ivarszerveket, emlőt (nőstényekből), prosztátát, húgyhólyagot, nyirokcsomókat (előnyben részesítve a beadás helyéhez közeli /tájéki/, és a lehetséges szisztémás hatások miatt attól távoli nyirokcsomókat), perifériás ideget (N. ischiadicust vagy N. tibialist) szorosan az izom proximális végénél, csontvelő metszetet (és/vagy friss csontvelő aspirátumot) és bőrt. A klinikai és más leletek más szövetek vizsgálatának a szükségességére is utalhatnak. És minden olyan szövet vizsgálatát is mérlegelni kell, amely a vizsgálati anyag ismert tulajdonságai alapján célszerűként felmerülhet.

1.5.5.4. Kórszövettan

El kell végezni legalább valamennyi nagy dózissal kezelt és kontroll állat fixált szöveteinek és szerveinek teljes körű kórszövettani vizsgálatát. Amennyiben a nagy dózissal kezelt állatokban valamilyen szerhatás állapítható meg, a szövettani vizsgálatot ki kell terjeszteni valamennyi dóziscsoport valamennyi állatára.

Valamennyi makroszkópos elváltozást meg kell vizsgálni.

Amennyiben volt kiegészítő csoport, azokból a szervekből és szövetekből kell szövettani vizsgálatot végezni, amelyeknél a kezelt csoportokban elváltozások voltak.

2. ADATOK ÉS JELENTÉS

2.1. Adatfeldolgozás

Az adatokat egyedileg kell megadni. Továbbá, valamennyi adatot össze kell foglalni táblázatos formában, megadva minden csoportnál az állatszámot a vizsgálat megkezdésekor, valamint az elhullott vagy humánus okokból megölt állatok számát minden időpontban, a toxikus tüneteket mutató állatok számát, a megfigyelt toxikus tünetek leírását, beleértve jelentkezésük kezdetét, időtartamát, minden toxikus tünet súlyosságát, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusait, és minden egyes típusú elváltozást hordozó állatok százalékos megoszlását.

Amennyiben alkalmazható, a számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel kell értékelni. A feldolgozandó adatokat és statisztikai módszereket már a vizsgálati terv összeállításakor meg kell választani.

2.2. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmazni:

2.2.1. Vizsgálati anyag:

fizikai jellemzése, tisztasága, fizikai-kémiai tulajdonságai, azonosítására vonatkozó adatok, vivőszer (ha volt): amennyiben nem víz volt a vivőszer, indoklás.

2.2.2. Állatfaj:

használt faj és törzs, az állatok száma, kora és neme, származásuk, tartási körülmények, táp stb., minden állat egyedi testtömege a vizsgálat megkezdésekor.

2.2.3. Vizsgálati körülmények:

a dóziszintek kiválasztásának a logikája,

a vizsgálati anyag formulálásának/táp preparálás részletezése, elért koncentrációk, a preparátum stabilitása és homogenitása,

a vizsgálati anyag beadásának a részletezése,

aktuális dózisok (mg/testtömeg kg/nap), ha lehetséges, átszámítási faktor a vizsgálati anyag tápbeli vagy ivóvízbéli koncentrációjának (ppm) az aktuális dózisokra történő átszámításához (ha tápban vagy vízben adták),

a táp és az ivóvíz minőségének a részletezése.

2.2.4. Eredmények:

testtömeg és testtömegváltozások,

táp- és vízfogyasztás (ha indokolt),

toxikus reakciók nemenként és dóziszintenként, beleértve a toxicitás tüneteit,

a klinikai tünetek természete, tömegossága és tartama (reverzibilisek-e vagy sem),

a szemészeti vizsgálat eredményei,
hematológiai adatok a megfelelő normál értékekkel,
klinikai kémiai adatok a megfelelő normál értékekkel,
terminális testtömeg, szervtömegok, szerv/testtömeg hányadosok,
boncolási leletek,
valamennyi kórszövettani elváltozás részletes leírása,
felszívódásra vonatkozó adatok, ha vannak,
az eredmények statisztikai elemzése, ha indokolt.
Az eredmények megvitatása.
Következtetések.

B.28. SZUBKRÓNIKUS DERMÁLIS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT - 90 NAPOS ISMÉTELT DERMÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot naponta kell a csoportokba sorolt kísérleti állatok bőrére helyezni, fokozatosan növekvő dózisokban, csoportonként egy dózist használva, 90 napon keresztül. A kezelés időtartama alatt az állatokon naponta meg kell figyelni a toxicitási tüneteket. A vizsgálat alatt elhullott és a vizsgálat befejezésekor a túlélő állatokat fel kell boncolni.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig kísérleti tartási és táplálási körülmények között kell tartani. A vizsgálat előtt a fiatal egészséges állatokat véletlenszerűen kiválasztva kontroll és kísérleti csoport(ok)ba kell sorolni.

Kevéssel a vizsgálat megkezdése előtt a vizsgálatban részt vevő kísérleti állatok szőrét a törzs háti részén le kell nyírni. Borotválni is lehet, azonban ezt a vizsgálat megkezdése előtt körülbelül 24 órával kell végezni. Ismételt nyírás illetve borotválás hetenként lehetséges. A szőrzet nyírásakor, illetve borotválásakor ügyelni kell arra, hogy a bőrt ne sértjük meg. A vizsgálati anyag bőrre helyezéséhez a testfelület legalább 10 százalékát szőrteleníteni kell. A megtisztítandó testfelületnek, illetve a fedőkötés méretének a meghatározásakor az állat testtömegét figyelembe kell venni. Szilárd anyag vizsgálatokor, amelyet szükség esetén poríthatunk, a vizsgálati anyagot vízzel vagy egyéb arra alkalmas vivőszerral meg kell nedvesíteni, hogy minél jobban tapadjon a bőrhöz. A folyékony anyagokat általában hígítás nélkül kell a bőrre helyezni. Az anyagot naponta egyszer, hetente öt-hét alkalommal kell a bőrre helyezni.

Vizsgálati körülmények

Kísérleti állatok

Kifejlett patkányokat, nyulakat vagy tengerimalacokat lehet használni. Más állatfaj is használható, azonban ezt meg kell indokolni. A vizsgálat megkezdésekor az állatok testtömegének az átlaghoz viszonyított szóródása nem haladhatja meg a $\pm 20\%$ -ot. Amennyiben a szubkrónikus dermális vizsgálatot a hosszú időtartamú vizsgálat előzetes vizsgálatoként végezzük, akkor mindkét vizsgálatban ugyanazt a fajt és törzset kell használni.

Állatszám és nem

Minden egyes dózisonál legalább 20 egészséges bőrű állatot (10 hím és 10 nőstényt) kell használni. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni. Amennyiben közbenső kiírtást tervezünk, akkor az állatok számát meg kell növelni a vizsgálat befejezése előtt kiírtani tervezett állatok számával. Ezenkívül 20 (nemenként 10-10) állatból álló kísérő csoportot lehet kezelni 90 napon keresztül a nagy dózissal, hogy a toxikus hatás reverzibilitását, tartósságát vagy késleltetve történő jelentkezését a kezelés utáni 28 napon át meg lehessen figyelni.

Dózisszintek

Legalább három különböző dózist, valamint kontroll csoportot – illetve ha vivőszert használunk, vivőszer kontroll csoportot – kell használni. Az expozíció időtartama naponta legalább 6 óra kell, hogy legyen. A vizsgálati anyagot mindennap hasonló időpontban kell a bőrre helyezni, a dózisokat pedig időközönként (hetente vagy kéthetente) módosítani kell, hogy az állatok testtömegéhez viszonyított dózis állandó maradjon. A kontroll csoport állatait – a vizsgálati anyag alkalmazásának a kivételével – a vizsgálati csoport állataival azonos módon kell kezelni. Amennyiben a kezelés megkönnyítésére vivőszert használnak, akkor a kontroll állatok bőrre ugyanúgy fel kell helyezni a vivőszert, mint a kezelt állatoknál, és ugyanannyi vivőszert kell felhelyezni, mint a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál. A legmagasabb dózisszinten toxikus tüneteknek kell jelentkezniük, azonban elhullásnak nem, vagy csak kis mértékben. A legkisebb dózisszinten mérgezési tünetek nem jelentkezhetnek. Amennyiben vannak használható adatok a humán expozícióról, legkisebb dózisonak ezt az értéket meg kell haladnia. Ideális esetben a középső dózisonak csak minimális megfigyelhető toxikus tüneteket kell okoznia. Amennyiben több mint egy közbenső dózist használunk, a dózisokat úgy kell növelni, hogy a toxikus hatás fokozatosan erősödjön. A kis és a közepes dózissal kezelt csoportban, valamint a kontroll csoportban az elhullás előfordulási gyakoriságának alacsonynak kell lennie, hogy az eredményeket megfelelően értékelni lehessen.

Amennyiben a vizsgálati anyag súlyos bőrirritációt okoz, a koncentrációt csökkenteni kell, ami azzal járhat, hogy a magas dózisszinten az egyéb mérgező hatások előfordulási gyakorisága csökken vagy azok egyáltalán nem jelentkeznek. Amennyiben a bőr súlyosan károsodott, akkor a vizsgálat megszakítása szükségessé válhat, és kisebb koncentrációval új vizsgálatot kell indítani.

Határérték vizsgálat (limit teszt)

Amennyiben az elővizsgálatban 1000 mg/kg, vagy ha vannak a lehetséges humán expozícióra vonatkozó adatok, és ennél magasabb dózisszintnél nem voltak toxikus tünetek, további vizsgálatra nincs szükség.

Megfigyelési időszak

A kísérleti állatokon a toxicitási tüneteket naponta meg kell figyelni. A halál időpontját, illetve a toxicitási tünetek jelentkezésének és megszűnésének idejét fel kell jegyezni.

Eljárás

Az állatokat egyesével kell ketrecben tartani. Az állatokra naponta kell a vizsgálati anyagot felhelyezni, ideális esetben hetente hét alkalommal, 90 napon keresztül.

A kísérő csoport lévő állatait a toxikus hatás megszűnésének vagy tartósságának a megfigyelésére további 28 napon keresztül kezelés nélkül kell tartani. Naponta hatórási expozíció szükséges.

A vizsgálati anyagot a kijelölt bőrfelületre, amely a teljes testfelületnek hozzávetőleg 10 százaléka, egyenletesen kell a bőrre helyezni. Az erősen mérgező anyagoknál a felület kisebb is lehet, azonban a lehető legnagyobb felületet kell a lehető legvékonyabban és legegyszerűsebben befedni a vizsgálati anyaggal.

A vizsgálat során porózus gézkötéssel és nem-irritáló ragasztószalaggal kell a vizsgálati anyagot a bőrön tartani. Emellett a gézkötés és a vizsgálati anyag bőrön tartására, illetve a vizsgálati anyag lenyelésének a megakadályozására a vizsgálati felületet megfelelő módon be kell fedni. A vizsgálati anyag lenyelésének a megakadályozására mozgáskorlátozó eszközt lehet alkalmazni, a mozgás teljes megakadályozása azonban nem ajánlatos.

A vizsgálati időszak végén a megmaradt vizsgálati anyagot, amennyiben lehetséges, vízzel vagy más megfelelő módon el kell távolítani a bőrrel.

Naponta valamennyi állatot meg kell figyelni és a toxicitási tüneteket – beleértve a megjelenés időpontját, intenzitását és időtartamát – fel kell jegyezni. A ketrecbeni megfigyeléseknek ki kell terjedni a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártyák elváltozásaira, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, valamint a szomato-motoros aktivitás és a viselkedés változásaira. A tápfogyasztást és az állatok testtömegét hetente kell mérni. Az állatokat rendszeresen figyelni kell, hogy a vizsgálatból lehetőség szerint ne essenek ki olyan okok miatt, mint pl. a kannibalizmus, a szövetek autolízise vagy az állatok elkeveredése. A vizsgálati időszak végén az összes túlélő állatot – a kísérő csoport állatainak kivételével – fel kell boncolni. A haldokló állatokat a csoportból ki kell emelni és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat szokásosan valamennyi állaton – a kontrollokat is beleértve – el kell végezni:

a) A kezelés megkezdése előtt és a vizsgálati időszak végén szemtükrrel vagy ennek megfelelő hasonló eszközzel szemészeti vizsgálatot kell végezni, lehetőség szerint valamennyi állatnál, azonban legalább a nagy dózissal kezelt csoportnál és a kontroll csoportnál. Amennyiben szemelváltozások vannak, valamennyi állatot meg kell vizsgálni.

b) A vizsgálati időszak végén hematológiai vizsgálatot kell végezni, beleértve a haematokrit, a hemoglobin koncentráció, a vörösvértestszám, fehérvérsejtszám meghatározását, a minőségi vérképet, valamint az alvadási tulajdonságok – az alvadási idő, prothrombin idő, thromboplastin idő, thrombocita szám – mérését.

c) A vizsgálati időszak végén el kell végezni a vér klinikai biokémiai vizsgálatát. A valamennyi vizsgálati területet felölelő és alkalmasnak tartott vizsgálatok a következők: az elektrolit háztartás, a szénhidrát anyagcsere, a máj- és vesefunkció vizsgálata. Az egyes vizsgálatok kiválasztását az anyag hatásmódjára vonatkozó megfigyelések befolyásolhatják. A javasolt vizsgálatok a következők: kalcium, foszfor, klorid, nátrium, kálium, éhgyomri vércukor (a fajnak megfelelő koplalási időszakkal), szérumban glutamin piruvát-transzamináz¹, szérumban glutamin oxalacetát - transzamináz², ornitin-dekarboxiláz, gamma-glutamil-transzpeptidáz, vizelet-nitrogén, albumin, vér-kreatinin, össz-bilirubin és össz-szérumban fehérje. A megfelelő toxikológiai értékeléshez szükség lehet még lipidanalízisre, hormonanalízisre, a sav/bázis arány meghatározására, a methemoglobin és a kolineszteráz-aktivitás vizsgálatára. A hatások további vizsgálatára szükség esetén további klinikai biokémiai vizsgálatok végezhetők.

d) Rutin vizeletvizsgálat csak akkor kell, ha a várt vagy megfigyelt toxikus hatások miatt ez szükségesnek látszik.

Amennyiben a történelmi kontroll alapadatok nem alkalmasak, a hematológiai és a klinikai biokémiai paraméterek meghatározását a kezelés megkezdése előtt meg kell fontolni.

B o n c o l á s

Valamennyi állatot fel kell boncolni, amihez hozzátartozik a test külső felületeinek, az összes nyílásnak, valamint a koponya, a mellkas és a hasüreg és ezek tartalmának a vizsgálata. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a boncolást követően a kiszáradás elkerülésére a lehető leggyorsabban, még nedves állapotban meg kell mérni. Az esetleges későbbi kórszövettani vizsgálatokra megfelelő közegben a következő szerveket és szöveteket kell megőrizni: minden makroszkópos elváltozás, agy – a nyúltaggyal/nyúltagyi híddal(pons) együtt, kisagykéreg és agykéreg, hypophysis, pajzsmirigy és mellékpajzsmirigy, thymus, (légcső), tüdő, szív, aorta, nyálmirigy, máj, lép, vese, mellékvese, hasnyálmirigy, ivarmirigy, méh, járulékos nemi szervek, epehólyag (amennyiben van), nyelöcső, gyomor, epésbél, éhbél, csípőbél, vakbél, vastagbél, végbél, húgyhólyag, jellemző nyirokmirigy, (nőstény tejmirigy), (combizom), perifériás ideg, (szemek), (szegycsont csontvelővel), (combcson az ízületi felülettel együtt), (gerincagy három szinten – nyak, közép-mellkas, ágyék), (exorbitális könnymirigyek). A említett szövetek közül a zárójelben lévőket csak akkor kell vizsgálni, ha toxikus tüneteket figyelnek meg rajtuk, illetve azt, amelyikük célszerv.

K ó r s z ö v e t t a n i v i z s g á l a t

a) A kontroll csoportnál és a nagy dózissal kezelt csoportnál a normál és a kezelt bőr, valamint a szervek és szövetek teljes kórszövettani vizsgálatát el kell végezni.

b) Minden makroszkópos elváltozást meg kell vizsgálni.

c) A célszerveket a más dózissal kezelt csoportokban is meg kell vizsgálni.

d) Amennyiben patkányokat használunk, a kis és közepes dózissal kezelt állatok tüdejét meg kell vizsgálni, hogy vannak-e fertőzésre utaló tünetek, mivel ezzel az állatok egészségi állapotát megfelelően értékelhetjük. E két csoportnál rutinszerűen további kórszövettani vizsgálatra nincs szükség, azonban minden olyan szervet meg kell vizsgálni, amelynél a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál elváltozások voltak.

e) Amennyiben kísérő csoportot használunk, akkor azokon a szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatot végezni, amelyeken a többi kezelt csoportnál is elváltozások voltak.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat megkezdésekor, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozás típusát, valamint az adott elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelően megválasztott statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

¹ Újabban úgy ismert, mint szérumban alinin aminotranszferáz

² Újabban úgy ismert, mint szérumban aszpartát aminotranszferáz

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- faj, törzs, forrás, környezeti feltételek, táplálék;
- a vizsgálat körülményei;
- dózisszintek (amennyiben van, a vivőszerral együtt) és koncentrációk;
- toxikus tünetek nem és dózis szerint;
- hatástalan dózisszint (ha lehetséges);
- a halál ideje a vizsgálat alatt, illetve a túlélő állatok kiirtásának ideje;
- a toxikus és egyéb hatások ismertetése;
- a kóros tünetek észlelésének ideje, és azok ezt követő alakulása;
- táp- és testtömeg adatok;
- a szemészeti vizsgálat eredményei;
- az alkalmazott hematológiai vizsgálatok és valamennyi eredmény;
- az alkalmazott klinikai biokémiai vizsgálatok és valamennyi eredmény (a vizeletvizsgálat eredményeivel együtt);
- boncolási leletek;
- valamennyi kórszövettani lelet részletes ismertetése;
- az eredmények statisztikai feldolgozása (amennyiben lehetséges);
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd: Bevezetés B. rész (G)

4. IRODALOM

Lásd: Bevezetés B. rész (H)

B.29. SZUBKRÓNIKUS INHALÁCIÓS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT - 90 NAPOS ISMÉTELT INHALÁCIÓS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A csoportokba sorolt kísérleti állatokat naponta exponáljuk a vizsgálati anyag fokozatosan növekvő koncentrációival, csoportonként egy koncentrációt használva, 90 napon keresztül. Csoportonként egy meghatározott koncentrációt kell használni. Amennyiben vivőszert használunk, hogy elősegítsük a vizsgálati anyag megfelelő koncentrációjának a beállítását a légtérben, akkor vivőszert kontroll csoportot kell használni. A kezelés időtartama alatt az állatokon a toxikus tüneteket naponta meg kell figyelni. A vizsgálat alatt elhullott és a vizsgálat befejezésekor a túlélő állatokat fel kell boncolni.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a kísérleti tartási és táplálási körülmények között kell tartani. A vizsgálat előtt a véletlenszerűen kiválasztott egészséges fiatal állatokat kezelési és kontroll csoport(ok)ba kell sorolni. Amennyiben szükséges, annak érdekében, hogy elősegítsük a vizsgálati anyag megfelelő koncentrációjának a beállítását a légtérben, a vizsgálati anyaghoz megfelelő vivőszert lehet adni. Amennyiben az expozícióhoz vivőszert

vagy más segédanyagot használunk, akkor ezek nem lehetnek toxikus hatásúak. Amennyiben lehetséges, történelmi kontroll adatokat lehet használni.

Vizsgálati körülmények

Kísérleti állatok

Amennyiben nincs ellenjavallat, a patkány az előnyben részesített állatfaj. Szokásosan használt, fiatal, egészséges laboratóriumi törzseket kell használni. A vizsgálat megkezdésekor a patkányok testtömegének az átlaghoz viszonyított szóródása nem haladhatja meg a $\pm 20\%$ -ot. Amennyiben a subkrónikus inhalációs vizsgálatot a hosszú időtartamú vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük, akkor mindkét vizsgálatban ugyanazt a fajt és törzset kell használni.

Állatszám és nem

Minden egyes expozíciós koncentrációhoz legalább 20 állatot (10 hím és 10 nőstényt) kell használni. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni. Amennyiben közbenső kiírtást tervezünk, akkor az állatok számát meg kell növelni a vizsgálat befejezése előtt kiírtani tervezett állatok számával. Ezenkívül 20 (nemenként 10-10) állatból álló kísérő csoportot lehet exponálni 90 napon keresztül nagy koncentrációval és a kezelés után 28 napon át meg kell figyelni a mérgező hatás reverzibilitását, tartósságát vagy késleltetve történő jelentkezését.

Expozíciós koncentráció

Legalább három különböző koncentrációt, valamint kontrollcsoportot, illetve – amennyiben vivőszert használunk – vivőszer kontroll csoportot kell használni. A kontroll csoport állatait – a vizsgálati anyaggal történő kezelés kivételével – a vizsgálati csoport állataival azonos módon kell kezelni. A legnagyobb koncentrációval exponált csoportnál toxikus hatásnak kell jelentkezni, azonban elhullásnak nem, vagy csak kis mértékben. Amennyiben vannak használható adataink a humán expozíció mértékéről, a legkisebb dózisonk ezt az értéket meg kell haladnia. Ideális esetben a középső koncentrációnak csak minimális megfigyelhető toxikus hatást szabad okozni. Amennyiben több mint egy közbenső koncentrációt használunk, a koncentrációkat úgy kell növelni, hogy a toxikus hatás fokozatosan erősödjön. A kis és a közepes koncentrációval exponált, valamint a kontroll csoportban az elhullás előfordulási gyakoriságának kicsinek kell lenni, hogy az eredményeket megfelelően értékelni lehessen.

Expozíciós idő

Napi hatórás expozíció szükséges, azt követően, hogy a kamrában beállt az egyenletes koncentráció. A speciális igényeknek megfelelően más expozíciós időt is lehet használni.

Berendezés

Az állatokat olyan inhalációs berendezésben kell vizsgálni, amelyben állandó dinamikus levegőáramlással tizenkétszeres légcseré biztosítható, annak érdekében, hogy az expozíciós légtérben megfelelő legyen az oxigén koncentráció, és a vizsgálati anyag eloszlása a légtérben egyenletes legyen. Amennyiben kamrát használunk, azt úgy kell megtervezni, hogy abban a vizsgálati állatok a lehető legkisebb mértékben zsúfolódjanak össze és a lehető legjobb feltételeket biztosítsa a vizsgálati anyag belégzéséhez. Általános szabályként adható meg, hogy a kísérleti állatok térfogata ne haladja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 százalékát. Száj-orr, fej- vagy teljestest egyéni expozíció is alkalmazható; az első kettő minimálisra csökkenti a vizsgálati anyag más módon történő szervezetbe jutását.

Megfigyelési időszak

A toxicitási tüneteket a vizsgálat, illetve az utómegfigyelési időszak alatt naponta minden állaton meg kell figyelni. A halál időpontját, illetve a toxicitási tünetek jelentkezésének és megszűnésének idejét fel kell jegyezni.

Eljárás

Az állatokat naponta, hetente öt-hét alkalommal exponáljuk a vizsgálati anyaggal, 90 napon át. Utómegfigyelésre a kísérő csoport állatait további 28 napon keresztül kezelés nélkül kell tartani, hogy a toxikus hatás megszűnését vagy tartósságát meg lehessen figyelni. A vizsgálat alatt a hőmérsékletet 22 ± 3 °C értéken kell tartani. Ideális esetben a relatív páratartalomnak 30–70% között kell lenni, azonban bizonyos esetekben (például aeroszolok vizsgálatánál) ezt nem lehet megvalósítani. Az expozíció alatt az állatoknak nem szabad tápot és vizet adni.

Az analitikai koncentráció ellenőrzésére alkalmas dinamikus inhalációs rendszert kell használni. A megfelelő expozíciós koncentráció beállítására célszerű elővizsgálatot végezni.

A levegőáramlást úgy kell szabályozni, hogy az expozíciós feltételek az egész kamrában azonosak legyenek. A rendszernek biztosítani kell, hogy a stabil viszonyok a lehető leggyorsabban beálljanak.

A következőket kell mérni illetve megfigyelni:

a) A levegőáramlás sebességét (folyamatosan).

b) A vizsgálati anyag tényleges koncentrációját a légzési zónában. A napi expozíciós időszak alatt a koncentráció az átlagértéktől legfeljebb ± 15 százalékkal térhet el. Azonban előfordulhat, hogy poroknál és aeroszoloknál ezt a pontosságot nem lehet elérni, ebben az esetben szélesebb koncentráció tartomány is elfogadható. A vizsgálat teljes időszaka alatt a koncentrációt, amennyire csak lehetséges, az egymást követő napokon állandó értéken kell tartani. Az aeroszol expozíciós technika kidolgozásánál a stabil aeroszol-koncentráció előállításához meg kell határozni a részecske

méret eloszlást. A részecske méret eloszlás állandóságát az expozíció alatt olyan gyakran kell ellenőrizni, amilyen gyakran csak lehet.

c) Hőmérséklet és nedvességtartalom.

d) Az expozíció alatt és azt követően az állatokat rendszeresen figyelni kell és a megfigyeléseket fel kell jegyezni; minden állatról feljegyzést kell készíteni. Naponta minden állatot meg kell figyelni és a toxicitási tüneteket – beleértve megjelenésük időpontját, intenzitását és időtartamát – fel kell jegyezni. A ketrecbeni megfigyeléseknek tartalmazniuk kell a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártyák elváltozását, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, a szomato-motoros aktivitás és a viselkedés megfigyelését. A tápfogyasztást és az állatok testtömegét naponta mérni kell. Az állatokat rendszeresen figyelni kell, hogy a vizsgálatból lehetőség szerint ne essenek ki olyan okok miatt, mint pl. a kannibalizmus, a szövetek autolízise vagy az állatok elkeveredése. A vizsgálati időszak végén az összes túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat a csoportból ki kell emelni és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat szokásosan valamennyi állaton – beleértve a kontroll csoportot is – el kell végezni:

a) Az expozíció előtt és a vizsgálati időszak végén szemtükörrel vagy ennek megfelelő hasonló eszközzel lehetőség szerint valamennyi állatnál, de legalább a nagy dózissal kezelt csoportnál és a kontroll csoportnál szemészeti vizsgálatot kell végezni. Amennyiben szemelváltozást figyelünk meg, valamennyi állatot meg kell vizsgálni.

b) A vizsgálati időszak végén hematológiai vizsgálatot kell végezni, beleértve a haematokrit, a hemoglobinkoncentráció, a vörösvértestek, a fehérvérsejtek minőségi és mennyiségi vizsgálatát, valamint az alvadási tulajdonságok – alvadási idő, prothrombin-idő, thromboplastin-idő, trombocita-szám – mérését.

c) A vizsgálati időszak végén el kell végezni a vér klinikai biokémiai vizsgálatát. A valamennyi vizsgálati területre kiterjedő és alkalmasnak tartott vizsgálatok a következők: az elektrolit háztartás, a szénhidrát anyagcsere, a máj- és vesefunkció vizsgálata. Az egyes vizsgálatok kiválasztását az anyag hatásmódjára vonatkozó megfigyelések befolyásolhatják. A javasolt meghatározások a következők: kalcium, foszfor, klorid, nátrium, kálium, éhgyomri vércukor (a fajnak megfelelő koplalási időszakkal), szérum glutamin piruvát transzamináz¹, szérum glutamin oxalacetát transzamináz² ornitin-dekarboxiláz gamma-glutamil-transzpeptidáz, vizelet-nitrogén, albumin, vér kreatinin, össz-bilirubin és össz-szérumfehérje. A megfelelő toxikológiai értékeléshez szükség lehet még lipidanalízisre, hormonanalízisre, a sav/bázis arány, a methemoglobin- és kolineszteráz-aktivitás meghatározására. Ha szükséges, az észlelt hatások elemzésére a klinikai biokémiai vizsgálatokat ki lehet terjeszteni.

d) Rutin vizeletvizsgálat csak akkor szükséges, ha a várt vagy megfigyelt toxikus hatás alapján ez szükségesnek látszik.

Amennyiben a történelmi kontroll alapadatok nem alkalmasak, még a kezelés megkezdése előtt meg kell fontolni a hematológiai és a klinikai biokémiai paraméterek meghatározását.

B o n c o l á s

Valamennyi állatot fel kell boncolni, amihez hozzátartozik a test külső felületeinek, az összes nyílásnak, valamint a koponya, a mellkas- és a hasüreg és ezek tartalmának a vizsgálata. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a boncolást követően a kiszáradás elkerülésére a lehető leggyorsabban, még nedves állapotban meg kell mérni.

Az esetleges későbbi kórszövettani vizsgálatokra a következő szerveket és szöveteket megfelelő közegben kell megőrizni: minden makroszkópikus elváltozás, tüdő – a tüdőt sértetlenül ki kell venni, meg kell mérni és megfelelő fixálószerrel kell kezelni a tüdő szerkezetének a megőrzésére (a fixálószerrel történő átáramoltatást hatásos módszernek lehet tekinteni), orr-garatszövetek, agy – a nyúltaggyal/nyúltagyi híddal (pons) együtt, kisagykéreg és agykéreg, hypophysis, pajzsmirigy és mellékpajzsmirigy, thymus, légcső, tüdő, szív, aorta, nyálmirigy, máj, lép, vese, mellékvese, hasnyálmirigy, ivarmirigy, méh (járulékos nemi szervek), (bőr), epehólyag (amennyiben van), nyelvcső, gyomor, epésbél, éhbél, csípőbél, vakbél, vastagbél, végbél, húgyhólyag, jellemző nyirokmirigy, (nőstény tejmirigy), (combizom), perifériás ideg, (szemek), szegycsont csontvelővel, (combcsont az ízületi felülettel együtt), (gerincagy három szinten – nyak, középmellkas, ágyék). Az említett szövetek közül a zárójelben lévőket csak akkor kell vizsgálni, ha toxikus tüneteket figyelnek meg rajtuk, illetve azt, amelyikük célszerv.

K ó r s z ö v e t t a n i v i z s g á l a t o k

a) A kontroll csoportnál és a nagy koncentrációval exponált csoportnál el kell végezni a légutak, valamint más szervek és szövetek teljes kórszövettani vizsgálatát.

b) Minden makroszkópos elváltozást meg kell vizsgálni.

c) A célszerveket a többi koncentrációval exponált csoportban is meg kell vizsgálni.

d) A kis és közepes koncentrációval exponált állatok tüdejét meg kell vizsgálni, mivel az állatok egészségi állapotát így megfelelően értékelhetjük. Ezeknél a csoportoknál további rutin kórszövettani vizsgálatra nincs szükség,

¹ Újabban úgy ismert, mint szérum alanin aminosztransferáz.

² Újabban úgy ismert, mint szérum aszpartát aminosztransferáz.

azonban minden olyan szervet meg kell vizsgálni, amelynél a legnagyobb koncentrációval exponált csoportnál elváltozást észleltünk.

e) Amennyiben kísérő csoportot használunk, akkor azokon a szerveken és szöveteken kell kórszövettani vizsgálatot végezni, amelyeken a kezelt csoportnál elváltozást észleltünk.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, az elváltozásokat mutató állatok számát, az elváltozások típusát, valamint az adott elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelően megválasztott statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- faj, törzs, forrás, környezeti viszonyok, táplálék;
- vizsgálati feltételek.

Az inhalációs kamra ismertetése: kialakítás, típus, méretek, levegőforrás, a részecskék és az aeroszolok előállítására szolgáló rendszer, a légkondicionálás módja, az eltávozó levegő kezelése, az állatok elhelyezése a vizsgálati kamrában (amennyiben ezt alkalmazzuk). A hőmérséklet, a nedvességtartalom, valamint szükség esetén az aeroszol koncentráció vagy a részecske méret stabilitásának a mérésére szolgáló berendezést ismertetni kell.

Az expozícióra vonatkozó adatok: ezeket táblázatban kell megadni az átlagértékekkel és a szóródás mértékével (például: standard deviáció) együtt, és a következőket kell tartalmaznia:

a) az inhalációs berendezésen keresztül áramló levegő sebessége;

b) a levegő hőmérséklete, nedvességtartalma;

c) névleges koncentráció (a vizsgálati anyag inhalációs berendezésbe juttatott mennyisége, osztva a levegő térfogatával);

d) a vivőszer jellege (amennyiben használunk vivőszert);

e) a légzési zónában mért tényleges koncentráció;

f) a részecske átmérők mediánban megadott középértéke (ha lehetséges);

– toxikus tünetek nem és koncentráció szerint;

– hatástalan dózisszint (ha lehetséges);

– a halál ideje a vizsgálat során, illetve a túlélő állatok kiirtásának ideje;

– a toxikus és egyéb hatások ismertetése;

– a toxikus tünetek észlelésének ideje, és azok ezt követő alakulása;

– táp- és testtömegadatok;

– a szemészeti vizsgálat eredményei;

– az alkalmazott hematológiai vizsgálatok és az eredmények;

– az alkalmazott klinikai biokémiai vizsgálatok és az eredmények (a vizeletvizsgálat eredményeivel együtt);

– boncolási leletek;

– az összes kórszövettani lelet részletes ismertetése;

– az eredmények statisztikai feldolgozása (amennyiben szükséges);

– az eredmények megvitatása;

– az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd: Bevezetés B. rész (G)

4. IRODALOM

Lásd: Bevezetés B. rész (H)

B.30. KRÓNIKUS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot megfelelő adagolásmóddal kell a csoportokba sorolt kísérleti állatok szervezetébe juttatni, csoportonként egy dózist használva, szokásosan naponta, hetente hét alkalommal, az állatok élettartamának nagyobb részét kitevő időszakon át. Az expozíció előtt és után a kísérleti állatokon naponta meg kell figyelni a toxicitási tüneteket.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt a napig kísérleti tartási és táplálási körülmények között kell tartani. A vizsgálat előtt a véletlenszerűen kiválasztott egészséges fiatal állatokat kezelési és kontrollcsoport(ok)ba kell sorolni.

Vizsgálati feltételek

Kísérleti állatok

Az előnyben részesített állatfaj a patkány. A korábbi vizsgálatok alapján más fajokat (rágcsálókat és nem rágcsálókat) is lehet használni. Szokásos laboratóriumi törzsek egészséges fiatal állatait kell használni. Az adagolást az elválasztás után a lehető leghamarabb meg kell kezdeni.

A vizsgálat megkezdésekor a patkányok testtömegének az átlaghoz viszonyított szóródása nem haladhatja meg a $\pm 20\%$ -ot. Amennyiben a szubkrónikus orális vizsgálatot a hosszú időtartamú vizsgálat előzetes vizsgálatként végezzük, akkor mindkét vizsgálatban ugyanazt a fajt/fajtát és törzset kell használni.

Állatszám és nem

Rágcsálóknál dózisonként és a kontroll csoportban legalább 40 állatot (20 hímét és 20 nőtényt) kell használni. Egyszer sem szült és nem vemhes nőtényeket kell használni. Amennyiben közbenső kiírtást tervezünk, akkor az állatok számát meg kell növelni a vizsgálat befejezése előtt kiírtani tervezett állatok számával.

Nem rágcsálóknál kevesebb állat is elfogadható, azonban nemenként minden csoportban legalább négy állatnak kell lenni.

Dózisszintek és az expozíció gyakorisága

A kontroll csoport mellett legalább három különböző dózist kell használni. A legnagyobb dózison határozott toxicitási tüneteket kell okozni, azonban nagyobb elhullás nélkül. A legkisebb dózis nem okozhat toxicitási tüneteket.

A közbenső dózis(oka)t a legkisebb és a legnagyobb dózis közötti tartomány középső részén kell kijelölni.

A dózisok kiválasztásánál figyelembe kell venni a korábbi toxicitási vizsgálatok adatait.

Az expozíció gyakorisága szokásosan a napi egy kezelés. Amennyiben a vizsgálati anyagot az ivóvízbe vagy a táplálékba bekeverve adjuk, akkor annak folyamatosan rendelkezésre kell állni.

Kontrollok

A kontroll csoportot – a vizsgálati anyaggal való kezelés kivételével – a kezelt csoporttal minden szempontból azonosan kell kezelni.

Különleges vizsgálati feltételeknél – például aeroszollokkal végzett inhalációs vizsgálatok, vagy nem jellemzett biológiai aktivitású emulgeálószer használata orális vizsgálatoknál – negatív kontroll csoportot is használni kell. A negatív kontroll csoportot a vizsgálati csoportokkal azonos módon kell kezelni, kivéve, hogy az állatokat sem a vizsgálati anyaggal, sem semmilyen vivőszerezrel nem kezelik.

Vizsgálati anyag adagolási módja

A két legfontosabb módszer az orális beadás és az inhaláció. A vizsgálati anyag adagolási módját a vizsgálati anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint a valószínűsíthető humánexpozíciótól függően kell megválasztani.

A dermális vizsgálat jelentős gyakorlati problémákat vet fel. A bőrön keresztül történő felszívódás után a krónikus szisztémás toxicitásra általában valamelyik orális toxicitási vizsgálat eredményeiből és a korábbi perkután toxicitási vizsgálatokból származó, a bőrfelszívódás mértékére vonatkozó adatokból lehet következtetni.

Orális vizsgálatok

Amennyiben a vizsgálati anyag a gyomor bélrendszerből felszívódik, továbbá az anyag lenyelése az egyik olyan lehetőség, amely révén az ember az anyaggal érintkezhet, akkor, hacsak nincs ellenjavallat, célszerű orális vizsgálatot végezni.

A vizsgálati anyagot az állatoknak a táplálékkal, az ivóvízben oldva, vagy kapszulában lehet adni.

Ideális esetben a vizsgálati anyagot naponta, hetente hét alkalommal kell adni, mivel a heti öt alkalommal történő adásnál az adagolás szüneteltetése alatt lehetőség van a toxikus hatás csökkenésére vagy megszűnésére, ami az eredményeket és a vizsgálat értékelését befolyásolhatja. Azonban elsősorban gyakorlati megfontolások alapján, a vizsgálati anyag heti öt alkalommal történő adását el lehet fogadni.

Inhalációs vizsgálatok

Mivel az inhalációs vizsgálatok kivitelezése jóval bonyolultabb műszaki problémát jelent, mint a többi kezelési mód, ezért itt részletesebb útmutatást adunk, mint a többi kezelési módnál. Meg kell említeni, hogy az intratracheális beadásmód bizonyos esetekben elfogadható alternatív módszert jelenthet.

A hosszú időtartamú expozíció vizsgálatát általában a várt emberi expozíciónak megfelelően kell végezni. Ilyenkor az állatokat – miután a kamrában a koncentráció kiegyenlítődt – hetente öt napon át, naponta hat órán keresztül kell exponálni (szakaszos v. intermittáló expozíció) vagy pedig – a valós környezeti expozíciónak megfelelően – hetente hét napon át, naponta 22-24 órán keresztül kell exponálni (folyamatos expozíció). Ilyenkor az állatokat naponta egy órán keresztül, mindig ugyanazon időben, a kamrában tartva kell etetni. Az állatok mindkét esetben általában a vizsgálati anyag adott koncentrációjával kell exponálni. A szakaszos és a folyamatos expozíció között a döntő különbség az, hogy az előbbi módszernél az állatoknak 17-18 óra áll rendelkezésre ahhoz, hogy a naponta kapott kezelés hatását kiheverjék, és ez az időszak hétvégeken még hosszabb is lehet.

A szakaszos és a folyamatos expozíció között a vizsgálat célkitűzéseinek, valamint az utánozni kívánt humán expozíciónak megfelelően kell választani. Azonban bizonyos technikai nehézségeket figyelembe kell venni. Például a folyamatos expozíció előnyeit hátrányosan befolyásolja az állatok kezelése alatti itatása és etetése, továbbá a jóval bonyolultabb (megbízható) aeroszol- és gőz-előállítási, valamint ellenőrzési technika alkalmazásának szükségessége.

Inhalációs kamrák

Az állatokat olyan inhalációs kamrában kell vizsgálni, amelyekben állandó dinamikus levegőáramlással tizenkétszeres légcserre biztosítható, annak érdekében, hogy megfelelő legyen az oxigéntartalom, és az anyag eloszlása az expozíciós légterben egyenletes legyen. A vizsgálati és a kontroll kamrának azonosnak kell lenni, és – a vizsgálati anyaggal történő kezelés kivételével – minden szempontból hasonló expozíciós feltételeket kell biztosítani. A kamrában általában enyhe vákuumot szokás alkalmazni, hogy megakadályozzuk a vizsgálati anyag kikerülését a környezetbe. A kamra kialakításának olyannak kell lenni, hogy minimális legyen a kísérleti állatok egy helyre történő összezsúfolódása. Általános szabályként adható meg, hogy a kamra légterének stabilitása érdekében a kísérleti állatok térfogata ne haladja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 százalékát.

A következő paramétereket kell mérni vagy ellenőrizni:

(i) A levegő áramlási sebessége: a kamrán átáramló levegő sebességét célszerű folyamatosan ellenőrizni.

(ii) Koncentráció: a vizsgálati anyag naponkénti expozíciós koncentrációja az átlagértéktől legfeljebb ± 15 százalékkal térhet el.

(iii) Hőmérséklet és nedvességtartalom: rágcsálóknál a vizsgálat alatt a hőmérsékletnek $22 \pm 2^\circ\text{C}$ -nak kell lenni; a relatív páratartalmat 30-70% között kell tartani, kivéve, amikor a vizsgálati anyagnak a kamra légterében történő bejuttatására vizet használunk. Célszerű mindkét paramétert folyamatosan ellenőrizni.

(iv) Részecske méret meghatározás: A részecske méret eloszlást, a folyadék, illetve szilárd aeroszolókat is beleértve, a kamrák légterében meg kell határozni. Az aeroszol részecskéknél a vizsgálatban használt kísérleti állatok részére belelegezhető részecske mérettartományba kell esni. A kamra légteréből történő mintavételkor a mintát az állatok légzési zónájából kell venni. A mintának azt a részecske méret eloszlást kell reprezentálnia, amivel az állatok érintkezésbe kerülnek, és gravimetriás módszerrel kell az összes aeroszolt mérni, még akkor is, ha az aeroszol nagyobb része nem lélegezhető be. Az aeroszol expozíciós technika kidolgozásánál a stabil aeroszol koncentráció előállításához meg kell határozni a részecske méret eloszlást. A részecske méret eloszlás állandóságát az expozíció alatt olyan gyakran kell ellenőrizni, amilyen gyakran csak lehet.

A vizsgálat időtartama

A kezelésnek legalább 12 hónapig kell tartani.

Eljárás

Megfigyelések

Legalább egyszer mindennap alapos klinikai vizsgálatot kell végezni és külön figyelni kell arra, a lehető legkevesebb állat essen ki a vizsgálatból. Az elhullott állatokat fel kell boncolni vagy le kell fagyasztani, a gyenge vagy haldokló állatokat pedig el kell különíteni vagy ki kell írtani. Gondosan meg kell figyelni a toxikus hatások megjelenését és a mérgezés lefolyását, hogy a betegség, a szövetek autólízise vagy a kannibalizmus miatti veszteség minimális legyen.

A klinikai tüneteket, beleértve a neurológiai, illetve a szemelváltozásokat, valamint az elhullást valamennyi állatnál fel kell jegyezni. A tünetek megjelenésének idejét, valamint a toxikus állapot kifejlődését – a tumor gyanúját is ideértve – fel kell jegyezni.

A vizsgálati időszak első 13 hete alatt minden állat testtömegét hetente egyszer, majd ezt követően négyhetente legalább egyszer meg kell mérni. A vizsgálat első 13 hete alatt a tápfogyasztást hetente, majd ezt követően körülbelül háromhavonta kell mérni, kivéve, ha az állatok egészségi állapota vagy testtömegének változása miatt ezen módosítani kell.

Hematológiai vizsgálatok

Hematológiai vizsgálatokat (például hemoglobinn tartalom, haematokrit, sejttérfogat, vörösvértestszám, fehérvérsejtszám, trombocitaszám vagy a véralvadási képesség más mérése) három havonta, hathavonta, majd ezt követően hozzávetőleg hathavonta, végül pedig a vizsgálat befejezésekor kell végezni. Vérmintát nem-rágcsálóknál minden állattól, patkányoknál pedig minden csoportnál nemenként 10 állattól kell venni. Amennyiben lehetséges, a vért minden esetben ugyanazoktól a patkányoktól kell venni. Nem-rágcsálóktól a vizsgálat előtt is vérmintát kell venni.

Amennyiben a klinikai megfigyelések arra utalnak, hogy a vizsgálat alatt az állatok egészségi állapota romlik, az érintett állatoknál a minőségi vérképet kell készíteni.

A legnagyobb dózissal kezelt és a kontroll csoport állatainál minőségi vérképet kell készíteni. Minőségi és mennyiségi vérképet a további, kisebb dózissal kezelt csoport(ok)nál csak akkor kell készíteni, ha a legnagyobb dózissal kezelt és a kontroll csoport eredményei között jelentősebb eltérés van, vagy ezt a patológiai leletek indokoltá teszik.

Vizeletvizsgálat

Vizeletmintát nem-rágcsálóknál minden állattól, patkányoknál pedig minden csoportnál nemenként 10 állattól kell venni. Amennyiben lehetséges, ugyanazoktól a patkányoktól kell vizeletmintát venni, mint amelyektől a vérmintát is vesszük. A vizsgálatokat a hematológiai vizsgálatokkal megegyező időben kell végezni. Az egyes állatok vizeletéből, illetve rágcsálóknál a csoportonként és nemenként gyűjtött vizeletből a következő vizsgálatokat kell elvégezni:

- külső megjelenés: mennyiség és sűrűség állatonként;
- fehérje, glükóz, ketonok, véralvadék (szemikvantitatív meghatározás);
- az üledék mikroszkópos vizsgálata (szemikvantitatív meghatározás).

Klinikai kémia

Hozzávetőleg hathavonta, valamint a vizsgálat végén, nem-rágcsálóknál minden állattól, patkányoknál pedig minden csoportból nemenként 10 állattól klinikai kémiai vizsgálatokra vérmintát kell venni. Amennyiben lehetséges, minden alkalommal mindig ugyanazoktól a patkányoktól kell a vérmintát venni. Ezenkívül nem-rágcsálóktól a vizsgálat előtt is vérmintát kell venni. A vérplazma mintákból a következő vizsgálatokat kell elvégezni:

- össz-fehérjekoncentráció;
- albumin-koncentráció;
- májfunkciós vizsgálatok (alkalikus foszfatáz, szérumban glutamin piruvát transzamináz¹, szérumban glutamin oxalacetát transzamináz²), gamma-glutamil transzpeptidáz, ornitin-dekarboxiláz;
- szénhidrát metabolizmus, mint az éhgyomri vércukor;
- vesefunkciós vizsgálatok, mint vér-, vizelet-nitrogén.

Boncolás

Valamennyi állatot fel kell boncolni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat alatt elhullottak, illetve amelyeket kiírtottak, mivel haldokló állapotban voltak. A kiírtás előtt a minőségi és mennyiségi vérkép elkészítéséhez valamennyi állattól vérmintát kell venni. Az összes látható elváltozást, tumort, illetve tumorgyanús elváltozást meg kell őrizni. Meg kell keresni a párhuzamot a makroszkópos megfigyelések és a mikroszkópos vizsgálat megállapításai között.

¹ Újabban úgy ismert, mint szérumban alanin aminoszénvegyület.

² Újabban úgy ismert, mint szérumban aszpartát aminoszénvegyület.

Kórszövettani vizsgálatra valamennyi szervet és szövetet meg kell őrizni. Általában a következő szerveket és szöveteket kell vizsgálni:

agy – (a nyúltaggyal/nyúltagyi híddal [pons], kisagykéreggel és agykéreggel együtt), hypophysis, pajzsmirigy (a mellékpajzsmiriggyel együtt), thymus, tüdő (a légsővel együtt), szív, aorta, nyálmirigy, máj³, lép, vese³, mellékvese³, nyelöcső, gyomor, epésbél, éhbél, csípőbél, vakbél, vastagbél, végbél, méh, húgyhólyag, nyirokmirigyek, ivarmirigyek³, hasnyálmirigy, járulékos nemi szervek, nőstény tejmirigy, bőr, izomzat, perifériás ideg, gerincagy (nyak, közép-mellkas, ágyék) szegycsont csontvelővel, combcsont (az ízülettel együtt), szemek. A tüdő és a húgyhólyagnak fixálószerrel történő feltöltése az említett szövetek megőrzésének legjobb módja; az inhalációs vizsgálatoknál a tüdő feltöltése lényeges a szükséges kórszövettani vizsgálatok miatt. Bizonyos vizsgálatoknál, például az inhalációs vizsgálatoknál a teljes légzőrendszert – beleértve az orrot, a torkot és a géget – meg kell vizsgálni.

Amennyiben további klinikai vizsgálatokat végzünk, az ebből származó információknak a mikroszkópos vizsgálatok előtt rendelkezésre kell állni, mivel azok a patológusok számára fontos útmutatást adhatnak.

Kórszövettani vizsgálat

Minden látható elváltozást, különösen a tumorokat és bármelyik szervben fellépő egyéb elváltozást mikroszkóposan kell megvizsgálni. Ezen kívül még a következő vizsgálatok elvégzése javasolt:

a) az összes megőrzött szerv és szövet mikroszkópos vizsgálata, az elváltozások részletes ismertetésével,

1. a vizsgálat alatt elhullott vagy kiírtott állatoknál,
2. a nagy dózissal kezelt csoportnál és a kontroll csoportnál;

b) a vizsgálati anyag által ténylegesen, vagy feltehetően általa okozott rendellenességet mutató szervek vagy szövetek vizsgálata a kisebb dózissal kezelt csoportoknál;

c) amennyiben a vizsgálat eredményei az állatok szokásos élettartamának lényeges csökkenésére, vagy olyan hatásokra utalnak, amelyek a toxikus hatást befolyásolhatják, a legnagyobb dózissal kezelt csoport utáni kisebb dózissal kezelt csoportot a fentiek szerint kell vizsgálni;

d) a használt állattörzsnél azonos laboratóriumi körülmények között szokásosan megtalálható elváltozások előfordulásának gyakoriságára vonatkozó információk, azaz történelmi kontroll adatok megadását a kezelt állatokon megfigyelt változások jelentőségének helyes értékelésénél nem lehet mellőzni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint a különböző típusú elváltozásokat mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- faj, törzs, forrás, környezeti viszonyok, táplálék;
- vizsgálati körülmények.

Az inhalációs berendezés ismertetése:

Kialakítás, típus, méretek, levegőforrás, a részecskék és az aeroszolok előállítására szolgáló rendszer, a légkondicionálás módszere, a távozó levegő kezelése, az állatok elhelyezése a vizsgálati kamrában (amennyiben ilyen alkalmazunk). A hőmérséklet, a nedvességtartalom, valamint szükség esetén az aeroszol koncentráció vagy a részecske méret stabilitásának mérésére szolgáló berendezést ismertetni kell.

Az expozícióra vonatkozó adatok:

Ezeket táblázatban kell megadni az átlagértékekkel és a szóródás mértékével (pl. standard deviáció) együtt, és a következőket kell tartalmaznia:

a) az inhalációs berendezésen átáramló levegő sebessége;

³ A rágszálóknál csoportonként és nemenként tíz állattól, nem-rágszálóknál a felsorolt szerveket minden állattól, valamint minden nem-rágszálónál a pajzsmirigyet (a mellékpajzsmiriggyel együtt) meg kell mérni.

⁴ Újabban úgy ismert, mint szérumin alanin aminoszén-átvitel.

- b) a levegő hőmérséklete, nedvességtartalma;
- c) névleges koncentráció (az inhalációs berendezésbe bejuttatott vizsgálati anyag összmenyisége, osztva a levegő térfogatával);
- d) a vivőszer jellege (amennyiben használunk vivőszert);
- e) a belélegzési zónában mért tényleges koncentráció;
- f) a részecske méretek mediánban kifejezett középátlaga (amennyiben szükséges);
 - dóziszintek (amennyiben van, a vivőszerrel együtt) és koncentrációk;
 - toxikus tünetek nem és dózis szerint;
 - hatástalan dóziszint;
 - a halál ideje a vizsgálat során, illetve a túlélő állatok kiirtásának ideje;
 - a toxikus és egyéb hatások ismertetése;
 - a toxikus tünetek észlelésének ideje, és azok ezt követő alakulása;
 - táp- és testtömeg adatok;
 - a szemészeti vizsgálat eredményei;
 - az alkalmazott hematológiai vizsgálatok és az összes eredmény;
 - az alkalmazott klinikai biokémiai vizsgálatok és az összes eredmény (a vizeletvizsgálat eredményeivel együtt);
 - boncolási leletek;
 - az összes kórszövettani lelet részletes ismertetése;
 - az eredmények statisztikai feldolgozása, amikor csak lehetséges;
 - az eredmények megvitatása;
 - az eredmények értelmezése.

3.2. *Értékelése és értelmezés*

Lásd: Bevezetés B. rész (G).

4. *IRODALOM*

Lásd: Bevezetés B. rész (H).

B.31. TERATOGENITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON ÉS NEM-RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A csoportokba sorolt kísérleti állatokat a vizsgálati anyag fokozatosan növekvő dózisaival vagy koncentrációival kell kezelni, legalább a vemhességnek abban az időszakában, amikor a szervek kialakulása megtörténik. Csoportonként egy dózist kell használni. Az ellés várt időpontja előtt az anyaállatot humánusan ki kell irtani, a méhet el kell távolítani, tartalmát pedig meg kell vizsgálni. Az ismertetett vizsgálati módszer az embrió- és a magzati toxicitást jelzi.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Hasonló korú és testtömegű egészséges, fiatal, virgo nőstényeket a vizsgálat kezdete előtt legalább öt napig akklimatizálódás céljából a laboratóriumi körülményeknek megfelelő viszonyok között kell tartani, majd a pároztatást termékeny hímekkel kell végezni. A megtermékenyített nőstényeket véletlenszerűen kiválasztva csoportokba kell sorolni.

A megtermékenyítést természetes és mesterséges úton is el lehet végezni. A vizsgálati anyagot a nőstényeknek a megtermékenyítés után azonnal vagy az organogenezis időszaka alatt naponta kell adni. Az ellés előtt egy nappal a méh eltávolítása után magzatot ki kell venni, és a külső- és belsőszervi és csontrendszeri rendellenességeket – retardáció, késleltetett csontképződés, belsőszervi elváltozások – meg kell vizsgálni.

Vizsgálati feltételek

Kísérleti állatok

A szokásosan használt fajok a patkány, az egér, a hörcsög és a nyúl. A javasolt faj a patkány és a nyúl. Laboratóriumban általánosan használt törzseket kell használni. Az alkalmazott törzs nem lehet kis termékenységű, és jellegzetes teratogén érzékenységgel kell rendelkeznie. Az állatokat egyesével kell elhelyezni.

Állatszám és nem

A vizsgálati anyag különböző dózisaihoz legalább 20 vemhes patkány, egér vagy hörcsög, illetve 12 vemhes nyúl szükséges. A cél az anyag teratogén hatásának értékeléséhez szükséges elegendő számú utód biztosítása.

Dózisszintek

Legalább három különböző dózist, valamint kontroll csoportot kell használni. Amennyiben a vizsgálati anyagot vivőszerven adjuk, akkor vivőszert kontroll csoportot is kell használni. Amennyiben vivőszert használunk, akkor annak toxikológiai tulajdonságait ismerni kell; a vivőszert nem lehet teratogén hatású, illetve nem lehet hatása a reprodukcióra. A kontroll csoport állatait – a vizsgálati anyaggal történő kezelés kivételével – a vizsgálati csoport állataival azonos módon kell kezelni. Amennyiben a vizsgálati anyag fizikai/kémiai jellemzői, illetve biológiai tulajdonságai nem szabnak határt, ideális esetben a nagyobb dózisonk enyhe, de egyértelmű anyai toxikus hatást, például kismértékű testtömeg csökkenést kell okoznia; azonban nem okozhat 10%-nál nagyobb anyai halálozást. A kis dózis nem válthat ki észrevehető, vizsgálati anyagnak tulajdonítható toxikus hatást. A közbelső dózis(ok) a kis és a nagy dózis között egyenletesen kell elosztani.

Határértékvizsgálat (limit teszt)

Kis toxicitású anyagnál, amennyiben a vizsgálati anyag legalább a 1000 mg/kg dózisének nincs embriotoxikus vagy teratogén hatása, akkor szükségtelen további dózissal vizsgálatot végezni.

Expozíciós idő

A vizsgálat 0. napja a vaginális dugó és/vagy a hüvelykenetben spermiumok megfigyelésének a napja. A kezelési időszaknak le kell fednie a legfontosabb szervek kialakulásának (organogenezis) idejét. Ez a patkánynál és az egérnél a vemhesség 6–15. napjának, a hörcsögnél a 6–14. napnak, a nyúlánál pedig a 6–18. napnak felel meg. Amennyiben a 0. napot a párzás vagy a mesterséges megtermékenyítés alapján állapítjuk meg, a fent megadott időket egy nappal meg kell hosszabbítani.

Megfigyelési periódus

Az állatokon mindennap legalább egyszer klinikai vizsgálatot kell végezni és a megfelelő lépéseket kell tenni, hogy a vizsgálatban részt vevő állatok elvesztése a lehető legkisebb legyen.

Kezelés

A vizsgálati anyagot orálisan, gyomorszondán keresztül mindennap hozzátétőlegesen azonos időben kell adni.

A nőstényeket a megadott kezelési időszakon keresztül kell a vizsgálati anyaggal kezelni. A dózist a nőstényeknek a vizsgálat indulásakor mért testtömegükre számítva kell megállapítani, vagy – tekintettel arra, hogy a vemhesség során gyors testtömeg gyarapodás következik be – az állatok testtömegét rendszeresen meg kell mérni, és a dózist a legutolsó mérés alapján kell meghatározni. A toxikus tüneteket – beleértve a megjelenés időpontját, a tünetek intenzitását és időtartamát – fel kell jegyezni. A vetélés vagy a koraszülés jeleit mutató nőstényeket ki kell írtani, és azokon alapos makroszkópos vizsgálatot kell végezni. A kezelés utáni megfigyelési időszak hozzátétőleg az ellést megelőző napig tart; a célkitűzés az, hogy a vemhesség legnagyobb része a megfigyelési időszakba essen, hogy elkerüljék az eredmények értelmezésének a megnehezítését, amit a természetes ellés okozhat. A megfigyeléseknek minimálisan tartalmazniuk kell a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártyák elváltozását, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, a szomato-motoros aktivitás és az állatok magatartásának megfigyelését. A tápfogyasztást és az állatok testtömegét hetente kell mérni.

Boncolás

A vizsgálat alatt vagy végén, vagy az elhullott állatoknál az anyaállaton az olyan strukturális rendellenességeket vagy kóros elváltozásokat, amelyek a vemhességre hatást fejthetnek ki, makroszkóposan alaposan meg kell vizsgálni. Közvetlenül a halál után a méhet ki kell venni, és meg kell vizsgálni, hogy az embrió vagy a magzat halott-e, illetve hány élő magzat van. Amennyiben elhullást észlelnek, az in utero halál idejét meg kell állapítani. A patkányoknál és a nyulaknál a corpus lutea (sárgatestek) számát meg kell határozni. A magzatok nemét testtömegét külön-külön kell meghatározni, a testtömeg adatokat fel kell jegyezni, és az átlagértéket ki kell számítani. Valamennyi magzat külsejét meg kell vizsgálni. Patkányoknál, egereknél és hörcsögöknél az utódok egyharmadát-felét elő kell készíteni a csontváz rendellenességek vizsgálatára, a magzatok fennmaradó részét elő kell készíteni, – megfelelő módszereket használva – a lágy szervek rendellenességeinek vizsgálatára. Nyulaknál a belsőszervi rendellenességeket, majd csontrendszeri rendellenességeket valamennyi magzaton meg kell vizsgálni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vemhes állatok számát, továbbá az élő magzatok, valamint a bármilyen lágyszöveti és csontrendszeri rendellenességgel rendelkező magzatok számát, és fészekaljakra vonatkozó százalékos arányát. Az eredményeket megfelelően megválasztott statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- faj, törzs, forrás, környezeti viszonyok, takarmányozás;
- vizsgálati feltételek;
- dóziszintek (amennyiben van, a vivőszerrel együtt) és koncentrációk;
- toxikus dózis-válasz adatok;
- hatástalan dóziszint (ha lehetséges);
- a halál időpontja a vizsgálat alatt, illetve a túlélő állatok kiírtásának ideje;
- a toxikus és egyéb hatások ismertetése;
- a kóros tünetek észlelésének ideje, és azok ezt követő alakulása;
- táp- és testtömeg adatok;
- a vemhesség időtartama és a fészekaljak adatai (a kórtörténeti adatokkal együtt);
- a magzatok adatai (élő/halott magzatok, nem, lágyszöveti, illetve csontrendszeri rendellenességek);
- a fészekaljak adatai (élő/halott magzatok, nem, lágyszöveti, illetve csontrendszeri rendellenességek valamennyi fészekaljnál);
- az eredmények statisztikai feldolgozása;
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd: Bevezetés B. rész (G).

4. IRODALOM

Lásd: Bevezetés B. rész (H).

B.32. A RÁKKELTŐ HATÁS VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot megfelelő adagolásmóddal kell a csoportokba sorolt kísérleti állatok szervezetébe juttatni, csoportonként egy dózist használva, szokásosan naponta, hetente hét alkalommal, az állatok élettartamának nagyobb részét kitevő életszakaszon át. Az expozíció alatt és után a kísérleti állatokon a toxicitási tüneteket, különös tekintettel a tumorok kifejlődésére, naponta figyelni kell.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a kísérleti tartási és táplálási körülmények között kell tartani. A vizsgálat előtt az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kiválasztva kezelési és kontroll-csoportokba kell sorolni.

Kísérleti állatok

Korábbi vizsgálatok alapján más fajokat (rágcsálókat és nem rágcsálókat) is lehet használni. Szokásosan használt laboratóriumi törzsek egészséges fiatal állatait kell használni, a vizsgálati anyag adagolását pedig az elválasztás után a lehető leghamarabb meg kell kezdeni.

A vizsgálat megkezdésekor az állatok testtömegének az átlaghoz viszonyított szórása nem haladhatja meg a $\pm 20\%$ -ot. Amennyiben a szubkrónikus orális vizsgálatot a hosszú időtartamú vizsgálat előzetes vizsgálatoként végezzük, akkor mindkét vizsgálatban ugyanazt a fajt/fajtát és törzset kell használni.

Állatszám és nemek

Rágcsálóknál legalább 100 állatot (50 hím és 50 nőstényt) kell használni minden dózis-csoportban és az egyidejű kontroll csoportban. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni. Amennyiben közbenső kiírtást tervezünk, akkor az állatok számát meg kell növelni a vizsgálat befejezése előtt kiírtani tervezett állatok számával.

Dózisszintek és az expozíció gyakorisága

A kontroll csoport mellett legalább három különböző dózisa van szükség. A legnagyobb dózisa minimális toxicitási tüneteket kell okozni, például enyhe visszamaradást a testtömeg gyarapodásban (kevesebb, mint 10%), és a szokásos élettartam csak a kialakuló tumorok miatt csökkenhet, más tényezők azt nem befolyásolhatják.

A legkisebb dózis nem befolyásolhatja a normális növekedést, a fejlődést és az állatok élettartamát, és nem okozhat toxikus tüneteket. A legkisebb dózis általában ne legyen kisebb, mint a legnagyobb dózis 10 százaléka.

A közbenső dózis(oka)t a kis és a nagy dózis közötti tartomány középső részén kell kijelölni.

A dózisok megválasztásánál a korábbi toxicitási vizsgálatok adatait figyelembe kell venni.

A szokásos kezelési gyakoriság a naponta történő kezelés. Amennyiben a vizsgálati anyagot az ivóvízbe vagy a tápba keverve adjuk, akkor annak folyamatosan rendelkezésre kell állni.

Kontrollok

Egyidejű kontroll csoportot kell használni, amelyet – a vizsgálati anyaggal történő kezelés kivételével – a kezelt csoporttal minden szempontból azonosan kell kezelni.

Különleges körülmények között – például aeroszollokkal végzett inhalációs vizsgálatok, vagy nem jellemzett biológiai aktivitású emulgeálószer használata orális vizsgálatokban – olyan kontroll csoportra is szükség van, amelyet a vivőszerral sem kezelünk.

A vizsgálati anyag beadásának módja

A három legfontosabb eljárás az orális adás, a dermális kezelés és az inhaláció. A vizsgálati anyag beadásának módját a vizsgálati anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint a humán expozíció valószínű módjától függően kell kiválasztani.

Orális vizsgálatok

Amennyiben a vizsgálati anyag a gyomor bélrendszerből felszívódik, továbbá az anyag lenyelése az egyik olyan lehetőség, amely révén az ember az anyaggal kapcsolatba kerül, akkor, hacsak nincs ellenjavallat, célszerű orális vizsgálatot végezni. A vizsgálati anyagot az állatoknak a táppal, az ivóvízben feloldva, vagy kapszulában lehet adni.

Ideális esetben a vizsgálati anyagot naponta, hetente hét alkalommal kell adni, mivel a heti öt alkalommal történő adásnál lehetőség van a mérgezésből való felgyógyulásra, illetve a toxicitás megszűnésére az anyag adásának a szüneteltetése alatt, ami befolyásolhatja az eredményeket és a vizsgálat értékelését. Azonban elsősorban gyakorlati megfontolások alapján, a vizsgálati anyag heti öt alkalommal történő adagolását is el lehet fogadni.

Dermális vizsgálatok

Az egyik legfontosabb humánexpozíciós mód szimulálására, és mint modellt a bőrkárosodások előidézésére, a bőrexpozíció vizsgálatára a bőrcsetelési eljárást lehet választani.

Inhalációs vizsgálatok

Mivel az inhalációs vizsgálatok kivitelezése jóval bonyolultabb műszaki problémát jelent, mint a többi kezelési mód, ezért ezt itt részletesebben ismertetjük, mint a többi kezelési módot. Meg kell említeni, hogy az intratrachealis beadásmód bizonyos esetekben elfogadható alternatív módszert jelenthet.

A hosszú időtartamú vizsgálatot általában a várt humán expozíciónak megfelelően kell végezni. Ilyenkor az állatot – miután a kamrában a koncentráció kiegyenlítődt – hetente öt napon át, naponta hat órán keresztül kell az anyaggal exponálni (szakaszos v. intermittáló expozíció), vagy pedig – a lehetséges környezeti expozíciónak megfelelően – hetente hét napon át, naponta 22-24 órán keresztül kell az anyaggal exponálni (folyamatos expozíció), de nagyjából

ugyanabban az időpontban kb. egy órát kell hagyni az állatoknak az evésre, és a kamra karbantartására. Az állatokat rendszerint mindkét esetben a vizsgálati anyag megadott koncentrációjával exponáljuk.

Az intermittáló és a folyamatos expozíció között a döntő különbség az, hogy az előbbi módszernél az állatoknak 17-18 óra áll rendelkezésre ahhoz, hogy a naponta kapott kezelés hatását kiheverjék, és ez az időszak hétvégeken még hosszabb is lehet.

A szakaszos és a folyamatos expozíció között a választás a vizsgálat célkitűzéseitől, valamint az utána kívánt humán expozíciótól függ. Azonban bizonyos technikai nehézségeket figyelembe kell venni. Például a környezeti expozíciót utánzó folyamatos expozíció előnyeit hátrányosan befolyásolhatja az állatok expozíció alatti itatása és etetése, továbbá a jóval bonyolultabb (és megbízható) aeroszol- és gőz-előállítás, valamint ellenőrzési technika alkalmazásának a szükségessége.

Expozíciós kamrák

Az állatokat olyan inhalációs kamrában kell vizsgálni, amelyekben állandóan fenntartott dinamikus levegőáramlással tizenkétszeres légcserre biztosítható, annak érdekében, hogy megfelelő legyen az oxigéntartalom és az anyag eloszlása az expozíciós légtérben egyenletes legyen. A vizsgálati és a kontroll kamrának azonos kialakításának kell lennie, és abban – a vizsgálati anyaggal történő expozíció kivételével – minden szempontból hasonló kezelési körülményeket kell biztosítani. A kamrában szokásosan enyhe vákuumot idéznek elő, hogy megakadályozzák a vizsgálati anyag kijutását a környezetbe. A kamrában nem szabad az állatokat összezsúfolni. Általános szabályként adható meg, hogy a kamra légterének stabilitása érdekében a kísérleti állatok összterfogatata ne haladja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 százalékát.

A következő paramétereket kell mérni, vagy ellenőrizni:

(i) A levegő áramlási sebessége: a kamrán átáramló levegő sebességét célszerű folyamatosan ellenőrizni.

(ii) Koncentráció: a napi expozíciós idő alatt a vizsgálati anyag koncentrációja az átlagértéktől legfeljebb ± 15 százalékkal térhet el. A koncentrációt a vizsgálat teljes időszaka alatt napról napra olyan állandó értéken kell tartani, amilyen csak lehet.

(iii) Hőmérséklet és nedvességtartalom: rágcsálóknál a vizsgálat alatt a hőmérsékletnek 22 ± 2 °C-nak kell lenni; a relatív páratartalmat 30–70% között kell tartani, kivéve, amikor a vizsgálati anyagnak a kamra légterében történő eloszlására vizet használunk. Célszerű mindkét paramétert folyamatosan ellenőrizni.

(iv) Részecske méret mérés: A részecskeméret eloszlást, a folyékony, illetve szilárd aeroszolókat is beleértve, a kamrák légterében meg kell határozni. Az aeroszol részecskéknél a vizsgálatban használt kísérleti állatok által belélegezhető részecske méret tartományba kell esni. A kamra légteréből történő mintavételkor a mintát az állatok légzési zónájából kell venni. A mintának azt a részecske méret eloszlást kell reprezentálnia, amivel az állatokat exponáljuk, és gravimetriásan kell az összes aeroszolt meghatározni, még akkor is, ha az aeroszol nagyobb része nem lélegezhető be. Az aeroszol technika kifejlesztésénél a stabil aeroszol koncentráció biztosítására gyakran kell részecske méret meghatározást végezni, majd az expozíció alatt olyan gyakorisággal, amennyire az szükséges ahhoz, hogy a részecske méret eloszlás állandóságát megfelelően ellenőrizni lehessen.

A vizsgálat időtartama

A rákkeltő hatás vizsgálatának az időtartama a kísérleti állatok normális élettartamának legnagyobb részét felöleli. Egereknél és hörcsögöknél a vizsgálatot 18 hónap után, patkányoknál 24 hónap után kell befejezni, azonban bizonyos állattörzseknek, melyeknek élettartamuk hosszabb, és/vagy kisebb a spontán tumorok előfordulási aránya (egereknél és hörcsögöknél), a vizsgálatnak 24 hónapig, patkányoknál pedig 30 hónapig kell tartania. Alternatívaként, a meghosszabbított vizsgálat akkor is elfogadható, ha a legkisebb dózissal kezelt csoportban és a kontroll csoportban a túlélő állatok száma eléri a 25 százalékot. Olyan vizsgálatban, amelyben nemenként eltérő eredményt kapunk, a befejezéskor a nemeket külön-külön kell értékelni. Amennyiben a nyilvánvalóan toxikus hatás következtében csak a nagy dózissal kezelt csoportban hullanak el korán az állatok, a vizsgálatot nem kell befejezni, feltéve, hogy a toxikus tüneteknek nincs zavaró hatásuk a többi csoportban. Negatív vizsgálati eredménynek azt lehet elfogadni, ha kannibalizmus, a szövetek autolízise vagy fenntartási problémák miatt az egyes vizsgálati csoportokban az állatok elvesztésének aránya legfeljebb 10 százalék, a túlélő állatok aránya pedig egereknél és hörcsögöknél 18 hónap után, patkányoknál 24 hónap után minden csoportban legalább 50 százalék.

Eljárás

Megfigyelések

A ketrecben naponta történő megfigyeléseknek tartalmazni kell a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártyák elváltozását, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, a szomato-motoros aktivitás és a viselkedés megfigyelését.

Az állatokat rendszeresen figyelni kell, hogy lehetőség szerint kannibalizmus, a szövetek autolízise vagy az állatok elkeveredése miatt ne essenek ki a vizsgálatból. A haldokló állatokat a csoportból ki kell emelni és fel kell boncolni.

A klinikai tüneteket és a halálózást valamennyi állatnál fel kell jegyezni. Külön figyelmet kell fordítani a tumor kifejlődésére, minden már látható, vagy tapintható tumor kialakulásának kezdetét, helyét, méretét, megjelenését és kifejlődését fel kell jegyezni.

A tápfogyasztást (valamint – amennyiben a vizsgálati anyagot az ivóvízben adjuk – a vízfogyasztást) a vizsgálat első 13 hete alatt hetente, majd ezt követően körülbelül háromhavonta kell mérni, kivéve, ha az állatok egészségi állapota vagy testtömegének változása miatt ezen módosítani kell.

A testtömeget a vizsgálat első 13 hete alatt minden állatnál külön, hetente egyszer meg kell mérni és az adatokat fel kell jegyezni. A továbbiakban a mérést legalább négyhetente egyszer el kell végezni.

Klinikai vizsgálatok

Hematológiai vizsgálatok

Amennyiben a vizsgálat alatt a ketrecben végzett megfigyelések az állatok egészségi állapotának romlására utalnak, az érintett állatoknál minőségi vérképet kell készíteni.

12 hónap után, 18 hónap után és kiírtás előtt az állatoknál vérkenetet kell készíteni. A legnagyobb dózissal kezelt és a kontroll csoport állatainál minőségi vérképet kell készíteni, de különösen a kiírtás előtt, vagy ha a patológiai vizsgálatok adatai alapján ennek szükségességét indokolják, a minőségi vérképet a további, kisebb dózissal kezelt csoport(ok)nál is el kell készíteni.

Boncolás

Valamennyi állatot fel kell boncolni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat alatt elhullottak, illetve amelyeket haldoklás miatt kiírtottak. Az összes látható tumort, elváltozást, illetve tumorgyanús elváltozást meg kell őrizni.

Az esetleges későbbi kórszövettani vizsgálatra a következő szerveket és szöveteket kell tartósítani: agy (a nyúltaggyal, híddal [pons], kisagykéreggel és nagyagykéreggel együtt), agyalapimirigy, pajzsmirigy/mellékpajzsmirigy, összes thymus-szövet, légsző és tüdő, szív, aorta, nyálmirigyek, máj, lép, vesék, mellékvese, hasnyálmirigy, ivarmirigyek, méh, járulékos nemi szervek, bőr, nyelősző, gyomor, nyombél, éhbél, csípőbél, vakbél, vastagbél, végbél, húgyhólyag, jellemző nyirokmirigy, nőstény tejmirigyek, comb-izomzat, perifériás ideg, szegycsont csontvelővel, combcsont (az ízülettel együtt), gerincvelő három szinten (nyaki, háti, ágyéki) és a szemek.

A tüdő és a húgyhólyag tartósító oldattal (fixálóval) történő feltöltése az említett szövetek tartósításának legjobb módja; az inhalációs vizsgálatoknál a tüdő ilyen módon végzett tartósítása lényeges a megfelelő kórszövettani vizsgálatok miatt. Inhalációs vizsgálatoknál a teljes légzőrendszert beleértve az orrot, a torkot és a gégeét, tartósítani kell.

Kórszövettani vizsgálat

Minden látható elváltozást, különösen a tumorokat és bármelyik szervben fellépő egyéb elváltozásokat mikroszkóposan meg kell vizsgálni. Ezenkívül még a következő vizsgálatok elvégzése javasolt:

a) A vizsgálat alatt elhullott vagy kiírtott összes állatnál, továbbá a nagy dózissal kezelt csoport és a kontrollcsoport valamennyi állatánál el kell végezni a szervek és a szövetek teljes kórszövettani vizsgálatát.

b) Az összes már látható tumort vagy tumorgyanús elváltozást minden csoportnál mikroszkóposan kell megvizsgálni.

c) Amennyiben a daganatos elváltozások előfordulásában jelentős különbség van a nagy dózissal kezelt csoport és a kontroll csoport között, akkor a megfelelő szervben a kórszövettani vizsgálatot a többi csoportnál is el kell végezni.

d) Amennyiben a túlélés a nagy dózissal kezelt csoportnál lényegesen kisebb, mint a kontroll csoportnál, akkor a következő, kisebb dózissal kezelt csoportnál is el kell végezni a teljes vizsgálatot.

e) Amennyiben a nagy dózissal kezelt csoportban nyilvánvalóan kimutatható olyan toxikus vagy egyéb hatás, amely befolyásolhatja a daganatos választ, akkor a következő, kisebb dózissal kezelt csoportnál is teljes vizsgálatot kell végezni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, a daganatos állatok számát a vizsgálat alatt, az észlelés idejét, valamint az olyan állatoknak a számát, amelyeknél kiírtás után daganatos elváltozásokat észleltek. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- faj, törzs, forrás, környezeti viszonyok, takarmány,
- vizsgálati feltételek.

Az expozíciós berendezés ismertetése:

Kialakítás, típus, méretek, levegőforrás, a részecskék és az aeroszolok előállítására szolgáló rendszer, a légkondicionálás módja, a távozó levegő kezelése, az állatok elhelyezése a vizsgálati kamrában (amennyiben ilyeneket használtak). A hőmérséklet, a nedvességtartalom mérésére szolgáló berendezés, valamint szükség esetén az aeroszol-koncentráció vagy a részecskeméret stabilitását is meg kell adni.

Expozíciós adatok:

Ezeket táblázatban kell megadni az átlagértékekkel és a szórás mértékével (például standard eltérés) együtt, és a következőket kell tartalmaznia:

- a) az inhalációs berendezésen keresztül áramló levegő sebessége;
- b) a levegő hőmérséklete, nedvességtartalma;
- c) névleges koncentráció (a vizsgálati anyagnak az inhalációs berendezésbe juttatott teljes mennyisége, osztva a levegő térfogatával);
- d) a vivőszer jellege (amennyiben használunk vivőszert);
- e) a belélegzési zónában mért tényleges koncentráció;
- f) a közepes részecskeméret mediánban megadott értéke (amennyiben szükséges);
 - dózisszintek (amennyiben van, a vivőszerrel együtt) és koncentrációk;
 - a tumor előfordulási adatai, nemek, dózis és tumortípus szerint;
 - a halál ideje a vizsgálat alatt, illetve a kiírtásukig életben maradt állatok;
 - toxikus tünetek nemek és dózis szerint;
 - a toxikus és egyéb hatások ismertetése;
 - a kóros tünetek észlelésének ideje, és azok ezt követő alakulása;
 - táp- és testtömeg adatok;
 - az alkalmazott haematológiai vizsgálatok és az összes eredmény;
 - boncolási leletek;
 - az összes kórszövettani lelet részletes leírása;
 - az eredmények statisztikai feldolgozása az alkalmazott módszer ismertetésével;
 - az eredmények megvitatása;
 - az eredmények értelmezése.

3.2. *Értékelés és értelmezés*

Lásd: Bevezetés B. rész (G).

4. *IRODALOM*

Lásd: Bevezetés B. rész (H).

B.33. A KRÓNIKUS TOXICITÁS/RÁKKELTŐ HATÁS KOMBINÁLT VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A kombinált krónikus toxicitási/rákkeltő hatás vizsgálatok célja valamely anyag krónikus toxikus, illetve rákkeltő hatásának megállapítása emlősökön, hosszú időtartamú expozícióval.

Ebből a célból a rákkeltő hatást vizsgáló módszert legalább egy kezelt kísérő csoporttal és egy kísérő kontroll csoporttal kell kiegészíteni. A nagy dózissal kezelt kísérő csoportnál használt dózis nagyobb lehet, mint a nagyobb dózissal kezelt csoport dózisa a rákkeltő hatást vizsgálatánál. A rákkeltő hatást vizsgáló módszernél az állatokon az általános toxicitást, valamint a karcinogén hatást kell vizsgálni. A kezelt kísérőcsoport állatain a szisztémás toxicitást kell vizsgálni.

A vizsgálati anyagot megfelelő adagolásmóddal kell a csoportokba sorolt kísérleti állatok szervezetébe juttatni, csoportonként egy dózist használva, szokásosan naponta, hetente hét alkalommal, az állatok élettartamának a nagyobb részét felölelő időszakon át. Az expozíció alatt és után a kísérleti állatokon a toxicitási tüneteket és a daganatok kifejlődését naponta figyelni kell.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a kísérleti tartási és táplálási körülmények között kell tartani. A vizsgálat előtt az egészséges, fiatal állatokat véletlenszerűen kiválasztva kell kezelési és kontroll csoport(ok)ba sorolni.

Kísérleti állatok

A javasolt állatfaj a patkány. Korábbi vizsgálatok alapján azonban más fajokat (rágcsálókat és nem-rágcsálókat) is lehet használni. Szokásosan használt laboratóriumi törzsek egészséges fiatal állatait kell használni, a vizsgálati anyag adását pedig az elválasztás után a lehető leghamarabb meg kell kezdeni.

A vizsgálat megkezdésekor a patkányok testtömegének az átlaghoz viszonyított szórása nem haladhatja meg a $\pm 20\%$ -ot. Amennyiben a szubkrónikus orális vizsgálatot a hosszú időtartamú vizsgálat előzetes vizsgálatként végezzük, akkor mindkét vizsgálatban ugyanazt a fajt és fajtát/törzset kell használni.

Állatszám és nemek

Rágcsálónál legalább 100 állatot (50 hím és 50 nőstényt) kell használni dóziscsoportonként és a kontroll csoportban. Egyszer sem szült és nem vemhes nőstényeket kell használni. Amennyiben közbenső kiírtást tervezünk, akkor az állatok számát meg kell növelni a vizsgálat befejezése előtt kiírtani tervezett állatok számával.

A patológiai, de nem tumorértékeléshez használt kezelt kísérő csoport(ok)nak mindkét nemből 20-20 állatot, míg a kísérő kontroll csoportnak mindkét nemből 10-10 állatot kell tartalmazni.

Dózisszintek és az expozíció gyakorisága

Karcinogenitási vizsgálatokra az egyidejű kontroll csoport mellett legalább három különböző dózist kell használni. A legnagyobb dózist a minimális toxicitási tüneteket kell okozni, például kismértékű elmaradást a testtömeggyarapodásban (kisebb, mint 10%), és a szokásos élettartam csak a kialakuló tumorok miatt csökkenhet, más tényezők azt nem befolyásolhatják.

A legkisebb dózis nem befolyásolhatja a normális növekedést, a fejlődést és az állatok élettartamát, és nem idézhet elő toxicitási tüneteket. A legkisebb dózis általában nem lehet kisebb, mint a nagy dózis 10 százaléka.

A közbenső dózis(oka)t a kis és a nagy dózis közötti tartomány középső részén kell kijelölni.

A dózisok kiválasztásánál figyelembe kell venni a korábbi toxicitási vizsgálatok adatait.

A krónikus toxicitás vizsgálatára további kezelt csoportot és kísérő kontroll csoportot kell használni. A kezelt kísérő csoportnál alkalmazott legnagyobb dózist határozott toxicitási tüneteket kell okoznia.

A kezelés (expozíció) gyakorisága szokásosan a napi egy kezelés. Amennyiben a vizsgálati anyagot az ivóvízbe vagy a táplálékba keverve adjuk, akkor annak folyamatosan rendelkezésre kell állni.

Kontrollok

Egyidejűleg kontroll csoportot kell használni, amelyet a vizsgálati anyaggal történő expozíció kivételével, a kezelt csoporttal minden szempontból azonosan kell kezelni.

Különleges körülmények között – pl. aeroszollokkal végzett inhalációs vizsgálatok, vagy nem jellemzett biológiai aktivitású emulgeáló szer használata orális vizsgálatokban – további kontroll csoportot is be kell iktatni, amelyet nem kezelünk a vivőszerrel.

A vizsgálati anyag beadásának módja

A három legfontosabb eljárás az orális adás, a dermális kezelés és az inhaláció. A vizsgálati anyag beadásának módját a vizsgálati anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint a humán expozíció valószínűsíthető módjától függően kell kiválasztani.

Orális vizsgálatok

Amennyiben a vizsgálati anyag a gyomor-bélrendszerből felszívódik, továbbá az anyag lenyelése az egyik olyan lehetőség, amely révén az ember az anyaggal kapcsolatba kerülhet, akkor, hacsak nincs ellenjavallat, célszerű orális vizsgálatot végezni. A vizsgálati anyagot az állatoknak a táppal, az ivóvízben oldva, vagy kapszulában lehet beadni. Ideális esetben a vizsgálati anyagot naponta, hetente hét alkalommal kell adni, mivel a heti öt alkalommal történő adásnál lehetőség van a mérgezésből való felgyógyulásra, illetve a toxicitási megszűnésére az anyag adásának szüneteltetése alatt, ami az eredményeket és a vizsgálat értékelését befolyásolhatja. Azonban, elsősorban gyakorlati megfontolások alapján a vizsgálati anyag heti öt alkalommal történő adását is el lehet fogadni.

Dermális vizsgálatok

Az egyik legfontosabb humán expozíciós mód szimulálására, és mint modellrendszer a bőrkárosodások előidézésére, a bőrexpozíció vizsgálatára a bőrecseteléses eljárást lehet választani.

Inhalációs vizsgálatok

Mivel az inhalációs vizsgálatok kivitelezése jóval bonyolultabb műszaki problémát jelent, mint a többi kezelési mód, ezért itt a kezelésre részletesebb útmutatást adunk, mint a többi kezelési módnál. Meg kell említeni, hogy az intratrachealis beadásmód bizonyos esetekben elfogadható alternatív módszert jelenthet.

A hosszú időtartamú expozíciót általában a várt emberi expozíciónak megfelelően kell végezni. Ilyenkor az állatot, miután a kamrában a koncentráció kiegyenlítődt, hetente öt napon át, naponta hat órán keresztül kell az anyaggal exponálni (szakaszos, ún. intermittáló expozíció), vagy pedig – a lehetséges környezeti expozíciónak megfelelően – hetente hét napon át, naponta 22-24 órán keresztül kell az anyaggal exponálni (folyamatos expozíció), de nagyjából ugyanabban az időpontban kb. egy órát kell hagyni az állatok etetésére és a kamra karbantartására. Az állatokat általában mindkét esetben a vizsgálati anyag megadott koncentrációjával exponáljuk. A szakaszos és a folyamatos expozíció között a döntő különbség az, hogy az előbbi módszernél az állatoknak 17-18 óra áll rendelkezésére ahhoz, hogy a naponta kapott kezelés hatását kiheverjék, és ez az időszak hétvégeken még hosszabb is lehet.

A szakaszos és a folyamatos expozíció közötti választás a vizsgálat célkitűzéseitől, valamint az utána kívánt humán expozíció módjától függ. Azonban bizonyos technikai nehézségeket figyelembe kell venni. Például, a környezeti expozíciót utánzó folyamatos expozíció előnyeit hátrányosan befolyásolhatja az állatok expozíció alatti itatása és etetése, továbbá a jóval bonyolultabb (és megbízható) aeroszol- és gőz-előállítási, valamint ellenőrzési technika alkalmazásának szükségessége.

Expozíciós kamrák

Az állatokat olyan inhalációs kamrában kell az anyaggal exponálni, amelyben állandóan fenntartott dinamikus levegőáramlással tizenkétszeres légcseré biztosítható, annak érdekében, hogy megfelelő legyen az oxigénkoncentráció és az anyag eloszlása az expozíciós légtérben egyenletes legyen. A vizsgálati és a kontroll kamrának azonos kialakításúnak kell lennie és, a vizsgálati anyaggal történő expozíció kivételével, minden szempontból hasonló kezelési körülményeket kell biztosítani. A kamrában általában enyhe vákuumot szokás alkalmazni, hogy megakadályozzuk a vizsgálati anyag kikerülését (szökését) a környezetbe. A kamrában nem szabad az állatokat összezsúfolni. Általános szabályként adható meg, hogy a kamra légterének stabilitása érdekében a kísérleti állatok összterfoglata ne haladja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 százalékát.

A következő paramétereket kell mérni vagy ellenőrizni:

(i) A levegő áramlási sebessége: a kamrán átáramló levegő sebességét célszerű folyamatosan ellenőrizni.

(ii) Koncentráció: a napi expozíciós idő alatt a vizsgálati anyag koncentrációja az átlagértéktől legfeljebb ± 15 százalékkal térhet el. A koncentrációt a vizsgálat teljes időtartama alatt, naprólnapra olyan állandó értéken kell tartani, amilyen csak lehet.

(iii) Hőmérséklet és nedvességtartalom: rágcslóknál a vizsgálat alatt a hőmérsékletnek 22 ± 2 °C-nak kell lennie; a relatív páratartalmat 30-70% között kell tartani, kivéve, amikor a vizsgálati anyagnak a kamra légterében történő eloszlására vizet használunk. Célszerű mindkét paramétert folyamatosan ellenőrizni.

(iv) Részecske méret mérés: A részecske méret eloszlást, a folyadék-, illetve szilárd aeroszolókat is beleértve, a kamrák légterében meg kell határozni. Az aeroszol részecskéknél a vizsgálatban használt kísérleti állatok által belélegezhető részecske méret tartományba kell esni. A kamra légteréből történő mintavételkor a mintát az állatok légzési zónájából kell venni. A mintának azt a részecske méret eloszlást kell reprezentálnia, amivel az állatokat exponáljuk, és gravimetriásan kell az összes aeroszolt meghatározni, még akkor is, ha az aeroszol nagyobb része nem lélegezhető be. Az aeroszol expozíciós technika kifejlesztésénél, a stabil aeroszol koncentráció biztosítására gyakran kell részecskeméret meghatározást végezni, majd az expozíció alatt olyan gyakorisággal, amennyire az szükséges ahhoz, hogy az aeroszol szemcse méret eloszlás állandóságát megfelelően ellenőrizzük.

A vizsgálat időtartama

A vizsgálatnak a rákkeltő hatás meghatározását szolgáló része a kísérleti állatok normális élettartamának legnagyobb részét felöleli. Egereknél és hörcsögöknél a vizsgálatot 18 hónap után, patkányoknál 24 hónap után kell befejezni, azonban bizonyos állattörzseknek, melyeknek hosszabb az élettartamuk, és/vagy kisebb a spontán tumorok előfordulási aránya, egereknél és hörcsögöknél a vizsgálatnak 24 hónapig, patkányoknál 30 hónapig kell tartania. Alternatívaként, a meghosszabbított vizsgálat akkor is elfogadható, ha a legkisebb dózissal kezelt csoportban és a kontroll csoportban a túlélő állatok száma eléri a 25%-ot. Olyan vizsgálatnál, amelynél nemenként eltérő eredményt kaptunk, befejezéskor a nemeket külön-külön kell értékelni. Amennyiben nyilvánvaló toxikus hatás következtében csak a nagy dózissal kezelt csoportban hullanak el korán az állatok, a vizsgálatot nem kell befejezni, feltéve, hogy a toxikus tüneteknek nincs zavaró hatásuk a többi csoportban. Negatív vizsgálati eredménynek azt lehet elfogadni, ha kannibalizmus, a szövetek autolízise, vagy tartási problémák miatt az egyes vizsgálati csoportokban az állatok

elvesztésének aránya legfeljebb 10 százalék, a túlélő állatok aránya pedig egereknél és hörcögöknél 18 hónap után, patkányoknál pedig 24 hónap után, minden csoportban legalább 50 százalék.

A nemenként 20-20 állatból álló kísérő csoporttal és nemenként 10-10 állatból álló kontroll csoporttal legalább 12 hónapon keresztül tartó krónikus toxicitási vizsgálatot kell végezni. Ezeknek az állatoknak a kiírtási idejét meg kell tervezni, hogy a gerontológiai elváltozások ne nehezítsék meg a vizsgálati anyag által okozott kóros elváltozások értékelését.

Eljárás

M e g f i g y e l é s e k

A ketrecben naponta történő megfigyeléseknek tartalmazniuk kell a bőr és a szőrzet, a szem és a nyálkahártyák elváltozását, valamint a légzőrendszer, a keringési rendszer, a vegetatív és a központi idegrendszeri funkciók, a szomato-motoros aktivitás és a viselkedés megfigyelését.

A kezelt kísérő csoport állatainak megfelelő időközönként klinikai vizsgálatokat kell végezni.

Az állatokat rendszeresen figyelni kell, hogy a vizsgálatból lehetőség szerint ne essenek ki az állatok olyan okok miatt, mint pl. a kannibalizmus, a szövetek autolízise vagy az állatok elkeveredése. A haldokló állatokat a csoportból ki kell emelni és fel kell boncolni.

A klinikai tüneteket, beleértve a neurológiai tüneteket és a szemelváltozásokat is, valamint a halálózást valamennyi állatnál fel kell jegyezni. Külön figyelmet kell fordítani a tumor kifejlődésére, minden már látható vagy tapintható tumor kialakulásának kezdetét, helyét, méretét, megjelenését és kifejlődését fel kell jegyezni; a toxikus tünetek megjelenésének idejét és alakulását fel kell jegyezni.

A tápfogyasztást (valamint – amennyiben a vizsgálati anyagot az ivóvízben adjuk – a vízfogyasztást) a vizsgálat első 13 hete alatt hetente, majd ezt követően körülbelül háromhavonta kell mérni, kivéve, ha az állatok egészségi állapota vagy testtömegének változása miatt ezen módosítani kell.

A testtömeget a vizsgálat első 13 hete alatt minden állatnál külön, hetente egyszer meg kell mérni és a testtömeg adatokat fel kell jegyezni. A továbbiakban a mérést legalább négyhetente egyszer el kell végezni.

Klinikai vizsgálatok

H e m a t o l ó g i a i v i z s g á l a t o k

Hematológiai vizsgálatokat (például hemoglobin tartalom, haematokrit sejttérfogat, vörösvértestszám, fehérvérsejtszám, thrombocitaszám vagy a véralvadási képesség egyéb mérése) a harmadik és a hatodik hónapban, majd ezt követően hozzávetőleg hathavonta, végül pedig a vizsgálat befejezésekor kell végezni. Vérmintát nem-rágcsálónál minden állattól, patkányoknál pedig minden csoportnál, nemenként 10-10 állattól kell venni. Amennyiben lehetséges, a vért minden esetben ugyanazoktól a patkányoktól kell venni.

Amennyiben a vizsgálat alatt a ketrecben végzett megfigyelések az állatok egészségi állapotának romlására utalnak, az érintett állatoknál el kell készíteni a minőségi vérképet.

A legnagyobb dózissal kezelt és a kontroll csoport állatainál el kell készíteni a minőségi vérképet. Minőségi vérképet a további, kisebb dózissal kezelt csoport(ok)nál csak akkor kell készíteni, ha a legnagyobb dózissal kezelt és a kontroll csoport eredményei között jelentősebb eltérés van, vagy ezt a patológiai leletek indokoltá teszik.

V i z e l e t v i z s g á l a t

Vizeletmintát minden csoportnál nemenként 5-10 patkánytól kell venni. Amennyiben lehetséges, ugyanazoktól a patkányoktól kell a vizeletmintát venni, mint amelyektől a vérmintát is vesszük. A vizsgálatokat a hematológiai vizsgálatokkal megegyező időben kell végezni. Az egyes állatok vizeletéből, illetve rágcsálónál a csoportonként és nemenként gyűjtött vizeletből a következő vizsgálatokat kell elvégezni:

- külső megjelenés: mennyiség és sűrűség állatonként;
- fehérje, glükóz, ketonok, rejtett (okkult) vér (szemikvantitatív meghatározás);
- az üledék mikroszkópos vizsgálata (szemikvantitatív meghatározás).

K l i n i k a i k é m i a i v i z s g á l a t o k

Hozzávetőleg hathavonta valamint a vizsgálat végén, nem-rágcsálónál minden állattól, patkányoknál pedig minden csoportnál nemenként 10 állattól, a klinikai kémiai vizsgálatokra vérmintát kell venni. Amennyiben lehetséges, minden alkalommal, mindig ugyanazoktól a patkányoktól kell a vérmintát venni. Ezenkívül, nem rágcsálóktól a vizsgálat előtt is vérmintát kell venni. A mintákból a plazmát el kell különíteni, majd a következő vizsgálatokat kell elvégezni:

- össz-fehérjekoncentráció;
- albumin koncentráció;

- májfunkciós vizsgálatok (alkálikus foszfatáz, szérum glutamin piroszölősav transzamináz¹ (SGPT), szérum glutamin oxálcetsav transzamináz² (SGOT), gamma-glutamil transzpeptidáz (GGT), ornitin-dekarboxiláz;
- szénhidrát metabolizmus (éhgyomri vércukor);
- vesefunkciós vizsgálatok, mint pl. vér karbamid nitrogén.

B o n c o l á s

Valamennyi állatot fel kell boncolni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat alatt elhullottak, illetve amelyeket haldoklás észlelésekor kiírtottak. A kiírtás előtt valamennyi állattól a minőségi vérképhez vérmintát kell venni. Az összes látható tumort, illetve tumorgyanús elváltozást tartósítani kell. Meg kell kísérelni korrelációt találni a makroszkópos megfigyelések és a mikroszkópos vizsgálattal kapott eredmények között.

Kórszövettani vizsgálatra valamennyi szervet és szövetet tartósítani kell.

Általában a következő szerveket és szöveteket kell vizsgálni:

agy³ – (a nyúltaggyal, híddal [pons], kisagykéreggel és nagyagykéreggel együtt), agyalapi mirigy, pajzsmirigy (a mellékpajzsmiriggyel együtt), thymus, tüdő (a légcsővel együtt), szív, aorta, nyálmirigyek, máj³, lép, vesék³, mellékvesék³, nyelöcső, gyomor, nyombél, epebél, csípőbél, vakbél, vastagbél, végbél, húgyhólyag, nyirokmirigyek, hasnyálmirigy, ivarmirigyek³, járulékos nemi szervek, nőstény tejmirigyek, bőr, izomzat, perifériás ideg, gerincvelő, (a nyaki, háti, és ágyéki szakaszból) szegycsont csontvelővel, combcsont (az ízülettel együtt) és a szemek.

Mínt hogy a tüdő és a húgyhólyag tartósító oldattal (fixálóval) történő feltöltése az említett szövetek tartósításának legjobb módja, az inhalációs vizsgálatoknál a tüdő feltöltése szükséges követelmény a megfelelő kórszövettani vizsgálatokhoz. Bizonyos vizsgálatoknál, például az inhalációs vizsgálatoknál, a teljes légzőrendszert – beleértve az orrot, a torkot és a géget is – meg kell vizsgálni.

Amennyiben további klinikai vizsgálatokat végzünk, az ebből származó információknak a mikroszkópos vizsgálatok előtt rendelkezésre kell állni, mivel azok a patológusok számára fontos útmutatást adhatnak.

K ó r s z ö v e t t a n i v i z s g á l a t

A krónikus toxicitási részvizsgálatánál:

A nagy dózissal kezelt kísérő csoport, valamint a kísérő kontroll csoport valamennyi állatánál az összes tartósított szervet részletesen meg kell vizsgálni. Ahol a nagy dózissal kezelt kísérő csoportnál a vizsgálati anyag hatásának tulajdonítható elváltozást találunk, ott a célszerven minden kezelt kísérő csoport valamennyi állatánál, valamint a vizsgálat rákkeltő hatást vizsgáló részének kezelt csoportjainál teljes és részletes kórszövettani vizsgálatot kell végezni.

A rákkeltő hatás részvizsgálatánál:

a) A vizsgálat alatt elhullott vagy kiírtott összes állatnál, továbbá a legnagyobb dózissal kezelt csoport és a kontroll csoport valamennyi állatánál a szervek és a szövetek teljes kórszövettani vizsgálatát el kell végezni.

b) A bármelyik szervben előforduló összes már látható tumort vagy tumorgyanús elváltozást minden csoportnál mikroszkópos módszerrel kell megvizsgálni.

c) Amennyiben jelentős különbség van a legnagyobb dózissal kezelt csoport és a kontroll csoport között a daganatos elváltozások előfordulásában, akkor a megfelelő szervben a kórszövettani vizsgálatot a többi csoportnál is el kell végezni.

d) Amennyiben a túlélés a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál lényegesen kisebb, mint a kontroll csoportnál, akkor a következő, kisebb dózissal kezelt csoportnál a teljes vizsgálatot el kell végezni.

e) Amennyiben a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál nyilvánvalóvá válik, hogy van olyan toxikus vagy más hatás, amely a daganatfejlődést befolyásolhatja, akkor a következő, kisebb dózissal kezelt csoportnál a teljes vizsgálatot el kell végezni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat kezdetekor, a daganatos elváltozásokat vagy toxikus tüneteket mutató állatok számát a vizsgálat alatt, az észlelés idejét, valamint az olyan állatoknak a számát, amelyeknél kiírtás után daganatos elváltozásokat észleltek. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

¹ Újabbban úgy ismert, mint szérum alanin aminotranszferáz.

² Újabbban úgy ismert, mint szérum aszpartát aminotranszferáz.

³ Rágcsálónál minden csoportból nemenként 10-10 patkány szerveit kell megmérni.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- faj, törzs, forrás, környezeti viszonyok, tápellátás,
- vizsgálati feltételek.

Az expozíciós berendezés ismertetése:

Kialakítás, típus, méretek, levegőforrás, a részecskék és az aeroszolok előállítására szolgáló rendszer, a légkondicionálás módja, a távozó levegő kezelése, az állatok elhelyezése a vizsgálati kamrában (amennyiben ilyen használtnak). A hőmérséklet, a nedvességtartalom mérésére szolgáló berendezést, valamint szükség esetén az aeroszol koncentrációt vagy a részecskeméret stabilitását is meg kell adni.

Expozíciós adatok:

Ezeket táblázatosan kell megadni az átlagértékekkel és a szórás mértékével (például: standard deviáció) együtt, és a következőket kell tartalmaznia:

- a) az inhalációs berendezésen átáramló levegő sebessége;
- b) a levegő hőmérséklete, nedvességtartalma;
- c) névleges koncentráció (a vizsgálati anyagnak az inhalációs berendezésbe juttatott teljes mennyisége, osztva a levegő térfogatával);
- d) a vivőszer jellege (amennyiben használunk vivőszert);
- e) a belélegzési zónában mért tényleges koncentráció;
- f) a közepes részecske méret mediánban kifejezett értéke (amennyiben szükséges);
 - dózisszintek (amennyiben van, a vivőszerrel együtt) és koncentrációk;
 - tumor előfordulási adatok, nemek, dózis és tumortípus szerint;
 - a halál ideje a vizsgálat alatt, illetve a túlélő állatok kiirtásának ideje;
 - toxikus tünetek nemek és dózis szerint;
 - a toxikus és egyéb hatások ismertetése;
 - a kóros tünetek észlelésének ideje, és azok ezt követő alakulása;
 - táp- és testtömeg adatok;
 - a szemészeti vizsgálat eredményei;
 - az alkalmazott hematológiai vizsgálatok és az összes eredmény;
 - az alkalmazott klinikai biokémiai vizsgálatok és az összes eredmény (a vizeletvizsgálat eredményeivel együtt);
 - boncolási leletek;
 - az összes kórszövettani lelet részletes leírása;
 - az eredmények statisztikai feldolgozása, az alkalmazott módszer ismertetésével;
 - az eredmények megvitatása;
 - az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd: Bevezetés B. rész (G).

4. IRODALOM

Lásd: Bevezetés B. rész (H).

B.34. EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot a csoportokba sorolt hímeknek és nőstényeknek fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni. A hímeknek a vizsgálati anyagot a növekedésük alatt, és legalább egy teljes spermiogenezis alatt kell adni (ez egereknél hozzávetőleg 56 nap, patkányoknál pedig hozzávetőleg 70 nap), hogy kiderüljön, a vizsgálati anyag káros hatást gyakorol-e a spermatogenezisre.

A szülői (P) generáció nőstényeinek legalább két ovariális ciklus alatt kell a vizsgálati anyagot adni, hogy kiderüljön, hogy a vizsgálati anyag károsítja-e a reprodukciót. Ezután az állatokat pároztatni kell. A párzási időszak alatt a vizsgálati anyaggal mindkét nemet, ezt követően pedig a vemhesség, illetve a szoptatás ideje alatt csak az anyákat kell folyamatosan kezelni.

Inhalációs kezelési módnál a módszert módosítani kell.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

A vizsgálat előtt az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kiválasztva kezelt és kontroll csoport(ok)ba kell sorolni. Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig laboratóriumi körülmények között kell tartani.

A vizsgálati anyagot célszerű a takarmányban (táp) vagy az ivóvízben adni. A vizsgálati anyag beadásának más módja is elfogadható. A kísérleti időszak alatt a vizsgálati anyagot valamennyi állatnak azonos módon kell adni. Amennyiben vivőszert vagy más segédanyagot alkalmazunk a vizsgálati anyag beadásának megkönnyítésére, akkor ezek nem lehetnek toxikus hatásúak.

A vizsgálati anyagot hetente hét napon át kell adni.

Kísérleti állatok

Az állatfaj kiválasztása

A javasolt állatfaj a patkány vagy az egér. A vizsgálatához előzőleg más vizsgálatra még nem használt egészséges állatokat kell használni. Kis termékenységű törzseket nem szabad használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, ivar, testtömeg és/vagy kor szerint jellemezni kell.

A reprodukció/fertilitás megfelelő értékeléséhez hímeket és nőstényeket kell használni. A vizsgálat megkezdése előtt valamennyi vizsgálati illetve kontroll állatot el kell választani.

Állatszám és nem

Mind a kezelt, mind a kontroll csoportnak elegendő számú állatot kell tartalmaznia ahhoz, hogy a vizsgálatához megfelelő időpontra körülbelül 20 vemhes nőstény álljon rendelkezésre.

A cél az, hogy elegendő számú vemhes állat, illetve utód legyen, hogy megállapíthassuk, a vizsgálati anyag hatással van-e a fertilitásra/reprodukcióra, a vemhességre és az anyai magatartásra, illetve a laktációra, valamint az F₁ utódgenerációnál a növekedésre és a fejlődésre, a fogamzástól az elválasztásig.

Állattartási körülmények

Tápot és vizet ad libitum kell adni. Az ellés kezdete előtt a vemhes nőstényeket egyenként külön ketrecbe kell helyezni, és a fészekkészítéshez megfelelő alomanyagot kell részükre biztosítani.

Dózis szintek

Legalább három különböző dózist, valamint kontroll csoportot kell használni. Amennyiben vivőszert használunk a vizsgálati anyag beadására, akkor a kontroll csoportnak az adott legnagyobb mennyiségű vivőszert kell adni. Amennyiben a vizsgálati anyag csökkent tápfogyasztást vagy táplálék hasznosítást okoz, akkor külön táplálék kontroll csoportra is szükség lehet. Ideális esetben, amennyiben ezt a vizsgálati anyag fizikai-kémiai tulajdonságai vagy biológiai hatásai nem korlátozzák, a legnagyobb dózissal kezelt csoportban a szülőknél (P) toxicitási tüneteknek kell jelentkezni, azonban elhullásnak nem. A középű dózis(ok)nak minimális, a vizsgálati anyagnak tulajdonítható toxicitási tüneteket kell okozni. A legkisebb dózis nem okozhat toxicitási tüneteket a szülőknél, illetve az utódokban. Amennyiben a vizsgálati anyagot gyomorszondával vagy kapszulában adjuk, akkor az adott dózist az állatok testtömege alapján kell megállapítani, és azt hetente, a testtömeg változásoknak megfelelően módosítani kell. Az anyáknál a vemhesség ideje alatt alkalmazott dózisokat a vemhesség első vagy hatodik napon mért testtömeg alapján kell megállapítani.

Határérték vizsgálat (limit teszt)

Kis toxicitású anyagoknál, amennyiben a legalább 1000 mg/kg dózissal végzett vizsgálat nem utal a reprodukcióra gyakorolt toxikus hatásra, akkor más dózisokkal további vizsgálatokat szükségtelen elvégezni. Amennyiben a nagy dózissal végzett elővizsgálat alapján az anyára kifejtett toxikus hatás nyilvánvaló, de nincs káros hatása a fertilitásra, más dózisokkal végzett további vizsgálatra nincs szükség.

A vizsgálat kivitelezése

Vizsgálati terv

A hím állatoknál (P) a vizsgálati anyag napi adagolását az elválasztás után, hozzávetőlegesen öt–kilenc hetes korokban, valamint legalább ötnapos akklimatizálódás után kell elkezdeni. Patkányoknál a vizsgálati anyag adagolását a pároztatási időszak előtt 10 héten (egereknél nyolc héten) keresztül kell folytatni. A hímeket a pároztatási időszak végén humánusan ki kell írtani és meg kell vizsgálni. Alternatív módszerként a hím állatokat, az esetleges második alom létrehozására, továbbra is a vizsgálati anyaggal kezelik, ebben az esetben röviddel a vizsgálat befejezése előtt kell az állatokat kiírtani és megvizsgálni. A nőstény állatoknál (P) a vizsgálati anyag adását legkevesebb öt nap akklimatizálódás után lehet megkezdeni, és a pároztatási időszak előtt legalább két hétig kell folytatni. A vizsgálati anyag adagolását a nőstény állatoknak (P) a háromhetes pároztatási időszakban, a vemhesség idején, egészen az F₁ utódgeneráció elválasztásáig kell folytatni. A vizsgálati anyagról rendelkezésre álló egyéb információk, pl. enzimindukció vagy bioakkumuláció, alapján esetleg meg kell fontolni a vizsgálati anyag adagolásának a módosítását.

Pároztatási eljárás

A reprodukciós toxicitási vizsgálatokban 1:1 (egy hím és egy nőstény) vagy 1:2 (egy hím és két nőstény) arányban lehet pároztatni.

Az 1:1 arányú pároztatás szerint egy nőstényt kell egy hím mellé tenni, amíg a vemhesség be nem következik, vagy három hét el nem telik. A nőstényeket minden reggel meg kell vizsgálni, hogy a hüvelykenetben meg tudunk-e figyelni spermát vagy hüvelydugót. A vizsgálat 0. napja a hüvelydugó vagy a sperma megjelenésének első napja.

Azokat a párokat, amelyek nyilvánvalóan nem párzanak, meg kell vizsgálni, és a látszólagos terméketlenség (infertilitás) okát meg kell állapítani. Ez a módszer lehet más apaállattal vagy anyaállattal való pároztatás, a reprodukciós szervek mikroszkópius vizsgálata, az ovariális ciklus vagy a spermatogenezis vizsgálata.

Fészekaljak száma

A fertilitási vizsgálatban a vizsgálati anyaggal kezelt állatok ellése és utódaik gondozása a fészekaljak standardizálása nélkül zajlik.

Amennyiben standardizálást végzünk, akkor a következő eljárást javasoljuk. A születés után 1–4 nappal minden alom méretét szabályozni kell, lehetőség szerint minél jobban megközelítve a négy hímet és négy nőstényt tartalmazó fészekaljat. Amennyiben a hím, illetve nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a négy hímet és négy nőstényt tartalmazó alom kialakítását, akkor ennek részleges módosítása (például öt hím és három nőstény) is elfogadható. Nem fogadható el módosítás az olyan almoknál, amelyekben nyolcnál kevesebb utód született.

Megfigyelések

A vizsgálati időszak alatt minden állatot legalább naponta egyszer meg kell figyelni. A magatartásváltozásokat, a nehéz vagy elhúzódó ellést, valamint a toxikus tüneteket – ideértve az elhullást is – fel kell jegyezni. A párzás előtti időszakban és a párzás idején a tápfogyasztást naponta kell mérni. Az ellés után és a szoptatás ideje alatt a tápfogyasztás (illetve, amennyiben a vizsgálati anyagot az ivóvízben adjuk, akkor a vízfogyasztás) mérését ugyanazon a napon kell végezni, mint az alom tömegének a mérését. A („P”) hím és nőstény szülők testtömegét a vizsgálati anyag adásának megkezdésekor, majd hetente kell mérni. A megfigyeléseket valamennyi állatnál egyedileg, külön kell feljegyezni.

A vemhesség időtartamát annak első „0” napjától kell számítani. Minden fészekaljat az ellés után, az utódok számának és nemének megállapítására, az élve, illetve a halva születések, illetőleg a jelentősebb rendellenességek megállapítására, a lehető legrövidebb időn belül meg kell vizsgálni.

A halva született, illetve a 4. napon kiírtott utódokon az előforduló rendellenességeket meg kell vizsgálni. Az élve született utódok számát és az almok tömegét az ellés utáni reggelen, az ezt követő 4. és 7. napon, és ezután hetente kell meghatározni, egészen a vizsgálat befejezéséig. A vizsgálat végén az állatok testtömegét egyedileg, minden állatnál külön kell megmérni. Az anyák és az utódok fizikai vagy magatartási rendellenességeit fel kell jegyezni.

Patológia

Boncolás

A vizsgálat alatt a „P” generáció kiírtott vagy elhullott állatainak mikroszkóposan meg kell vizsgálni a strukturális anatómiai rendellenességeket vagy kóros elváltozásokat, külön figyelmet fordítva a reprodukciós rendszer szerveire. Az elpusztult vagy haldokló utódokon meg kell vizsgálni a rendellenességeket.

Kórszövevtani vizsgálat

Az összes „P” állatnál (hím és nőstény szülői generáció) a petefészket, a méhet, a méhnyakat, a vaginát, a heréket, a mellékheréket, az ondóhólyagokat, a prosztatát, a hypophysist és a célszerv(ek)et mikroszkópos vizsgálatra meg kell őrizni. Amennyiben az említett szerveket más dózissal kezelt állatokban nem vizsgálták meg, akkor a nagy dózissal kezelt csoport és a kontroll csoport valamennyi állatát, valamint a vizsgálat alatt elpusztult állatokat, ahol ez lehetséges, mikroszkóposan meg kell vizsgálni.

Ha az előbbi állatoknál rendellenességeket találtak a szervekben, a vizsgálatot az összes „P” állatnál el kell végezni. Azokon a szerveken vagy szöveteken, melyeken látható elváltozásokat figyeltek meg, mikroszkópos vizsgálatot kell végezni. Azoknál az állatoknál, amelyeknél fennáll az infertilitás gyanúja, el lehet végezni a reprodukciós szervek mikroszkópos vizsgálatát.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat indulásakor, a nemzőképes hímek számát, a vemhes nőstények számát, az elváltozások típusát, valamint a különböző típusú elváltozásokat mutató állatok százalékos arányát.

Amennyiben lehetséges, a számszerű eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- alkalmazott faj, illetve törzs;
- toxikus tünetek nem és dózis szerint, beleértve a fertilitásra, az ellésre és az életképességre vonatkozó adatokat;
- az elhullás időpontja a vizsgálat alatt, vagy a túlélő állatok tervezett kiirtásának ideje, vagy a vizsgálat befejezéskor történő kiirtás ideje;
- az egyes fészekaljok tömege, az utódok átlagos testtömege, illetve az egyes utódoknak a vizsgálat végén mért testtömegét tartalmazó táblázatok;
- a reprodukcióra, az utódokra és a születés utáni növekedésre kifejtett toxikus és egyéb hatások ismertetése;
- a toxikus tünetek észlelésének napja, és azok ezt követő alakulása;
- a „P” generáció állatainak táp- és testtömegadatai;
- boncolási leletek;
- valamennyi mikroszkópos vizsgálat alapján tett megállapítás részletes ismertetése;
- az eredmények statisztikai feldolgozása (amennyiben szükséges);
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd: Bevezetés B. rész (G).

4. IRODALOM

Lásd: Bevezetés B. rész (H).

B.35. KÉTGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot a csoportokba sorolt hím és nőstény állatoknak fokozatosan növekvő dózisokban kell adni. A „P” szülői generáció hímjeinek a vizsgálati anyagot a növekedésük alatt, és a spermatogenezis legalább egy teljes ciklusa alatt szükséges adagolni (ez egereknél hozzávetőleg 56 nap, patkányoknál pedig hozzávetőleg 70 nap), hogy kiderüljön az, hogy a vizsgálati anyag káros hatást gyakorol-e a spermatogenezisre.

A szülői generáció nőstényeinek legalább két teljes ovarialis ciklus alatt kell a vizsgálati anyagot adni, hogy kiderüljön, a vizsgálati anyag káros hatást gyakorol-e a reprodukcióra. Ezután az állatokat pároztatni kell. A párzási időszak alatt a vizsgálati anyagot mindkét nemnek, ezt követően pedig csak a nőstényeknek kell adagolni a vemhesség, illetve a laktáció ideje alatt. Elválasztás után a vizsgálati anyag adását az F₁ utódokban kifejlett koruk eléréséig, párzási idejükig és az F₂ generáció létrehozásáig kell folytatni, egészen az F₂ generáció elválasztásáig. Inhalációs expozíciónál a módszert módosítani kell.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

A vizsgálat előtt az egészséges, fiatal állatokat véletlenszerűen kiválasztva kezelési és kontroll csoport(ok)ba kell sorolni. A „P” szülői állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig a vizsgálat laboratóriumi körülmények között kell tartani. A vizsgálati anyagot célszerű a takarmányban (táp) vagy az ivóvízben adni. A vizsgálati anyag adagolásának más módjai is elfogadhatóak. A vizsgálat teljes időszaka alatt a vizsgálati anyagot az összes állatnak azonos módon kell adagolni. Amennyiben vivőszert vagy más segédanyagot használunk a vizsgálati anyag adagolásának megkönnyítésére, akkor ezek nem lehetnek toxikus hatásúak. A vizsgálati anyagot hetente hét napon át kell adni.

Kísérleti állatok; az állatfaj kiválasztása

A javasolt állatfaj a patkány vagy az egér.

A vizsgálatához előzőleg kísérleti célra nem használt állatokat kell használni. Kis termékenységű törzseket nem szabad használni. A kísérleti állatokat faj, törzs, nem, testtömeg és/vagy kor szerint jellemezni kell.

A reprodukció megfelelő értékeléséhez hímeket, és nőstényeket kell vizsgálni. A vizsgálat megkezdése előtt a vizsgálatban résztvevő valamennyi állatot el kell választani.

Állatszám és nem

Mind a kezelt, mind a kontroll csoportnak elegendő számú állatot kell tartalmaznia ahhoz, hogy a pároztatás után a meghatározott időre körülbelül 20 vemhes nőstény legyen. A cél az, hogy elegendő számú vemhes anya, illetve utód álljon rendelkezésre ahhoz, hogy megállapíthassuk, a vizsgálati anyag hatással van-e a fertilitásra, a vemhességre és az anyai magatartásra a P generáció állatainál, továbbá az F₁ utódgenerációnál a laktációra, a növekedésre és a fejlődésre, a fogamzástól a teljes kifejlődésig, majd az F₁ generáció utódállatainak (F₂) az elválasztásig történő fejlődésére.

Vizsgálati körülmények

Táplálékot és vizet ad libitum kell biztosítani. Az ellés kezdete előtt a vemhes nőstényeket egyedileg kell elhelyezni, és megfelelő alomanyagot kell részükre biztosítani.

Dózis szintek

Legalább három dózist, valamint kontroll csoportot kell használni. Amennyiben vivőszert használunk a vizsgálati anyag beadására, akkor a kontroll csoportnak az adott legnagyobb mennyiségű vivőszert kell adni. Amennyiben a vizsgálati anyag csökkent tápfogyasztást vagy táplálékhasznosítást okoz, akkor külön táplálék kontroll csoportra lehet szükség. Ideális esetben, amennyiben ezt a vizsgálati anyag fizikai-kémiai tulajdonságai vagy biológiai hatásai nem korlátozzák, a vizsgálati anyag legnagyobb dózisa a szülőknél (P) toxicitási tüneteket, azonban elhullást nem okozhat. A középső dózis(ok)nak minimális, a vizsgálati anyagnak tulajdonítható toxicitási tüneteket kell okozni. A legkisebb dózis nem okozhat toxicitási tüneteket a szülőknél, illetve az utódokban. Amennyiben a vizsgálati anyagot gyomorszondával vagy kapszulában adjuk, az adott dózist az állatok testtömege alapján kell megállapítani, és azt hetente módosítani kell. A nőstényeknél a vemhesség ideje alatt – lehetőség szerint – a dózist a vemhesség első vagy hatodik napi testtömeg alapján lehet megállapítani.

Határérték vizsgálat (limit teszt)

Kis toxicitású anyagoknál, amennyiben a legalább 1000 mg/kg dózissal végzett vizsgálat nem szolgáltat bizonyítékot a reprodukció károsítására, akkor más dózissal további vizsgálatot szükségtelen végezni. Amennyiben a nagy dózissal végzett elővizsgálat határozott bizonyítékot szolgáltat az anyai toxicitásra, de nem befolyásolja a fertilitást, más dózissal további vizsgálatot nem kell végezni.

A vizsgálat kivitelezése

Vizsgálati terv

A hím szülőknél (P) a vizsgálati anyag napi adagolását elválasztás után, hozzávetőlegesen öt–kilenchetes korokban, valamint legalább ötnapos akklimatizálódás után kell elkezdni. Patkányoknál a vizsgálati anyag adagolását a pároztatás előtt 10 héten (egereknek nyolc héten) keresztül kell folytatni. A hímeket a pároztatási időszak végén ki kell irtani és meg kell vizsgálni, vagy pedig alternatív módszerként, egy esetleges második alom létrehozásához, a hímeket

továbbra is a vizsgálati anyaggal kell kezelni; a hím állatokat ilyenkor rövidebbel a kísérlet befejezése előtt ki kell kiírtani és meg kell vizsgálni.

A „P” nőstény szülőknél a vizsgálati anyag adagolását legkevesebb öt nap akklimatizálódási időszak után lehet megkezdeni, és a pároztatási időszak előtt legalább két hétig kell folytatni. A vizsgálati anyag adagolását a nőstény szülőknél (P) a háromhetes pároztatási időszakban, a vemhesség idején, egészen az F₁ utódgeneráció elválasztásáig kell folytatni. A vizsgálati anyagról rendelkezésre álló egyéb információk, például enzimindukció vagy bioakkumuláció, alapján esetleg meg kell fontolni a vizsgálati anyag adásának módosítását.

A vizsgálati anyagnak az F₁ állatok részére történő adagolása az elválasztáskor kezdődik, és azok kiírtásakor fejeződik be.

Pároztatási eljárás

A reprodukciós-toxicitási vizsgálatokban 1:1 (egy hím és egy nőstény) vagy 1:2 (egy hím és két nőstény) arányban lehet pároztatni.

Az 1:1 arányú pároztatás szerint egy nőstényt kell egy hím mellé tenni, amíg a vemhesség be nem következik, vagy három hét el nem telik. A nőstények hüvelykenetét minden reggel meg kell vizsgálni. A vizsgálat 0. napja az a nap, amikor hüvelydugó vagy a spermium megfigyelhető. Az F₁ utódállatokat nem lehet addig pároztatni, amíg egereknél a 11 hetes kort, patkányoknál pedig a 13 hetes kort el nem érik. Az F₁ utódállatok pároztatásához minden alomból egy hímet és egy nőstényt véletlenszerűen ki kell választani, más alomból származó, azonban azonos dózissal kezelt utódokkal történő keresztezett pároztatáshoz, az F₂ generáció létrehozásához. A pároztatásra fel nem használt F₁ hímeket és nőstényeket az elválasztás alkalmával humánus módon ki kell írtani.

Azokat a párokat, amelyek nem párzanak, meg kell vizsgálni, és az infertilitás okát meg kell állapítani. Ez a módszer lehet más apaállattal vagy anyaállattal való pároztatás, vagy a reprodukciós szervek mikroszkópos vizsgálata, vagy az ovarialis ciklus vagy a spermatogenezis vizsgálata.

Fészekaljak száma

A fertilitási vizsgálatban a vizsgálati anyaggal kezelt állatok ellése és utódaik gondozása a fészekaljak standardizálása nélkül zajlik.

Amennyiben standardizálást végeznek, akkor a következő eljárás javasolható. A születés után 1–4 nappal minden alom létszámát úgy kell szabályozni a számfeletti utódok kiemelésével, hogy az a négy hímet és négy nőstényt tartalmazó alomszámot megközelítse. Amennyiben a hím, illetve nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a négy hímet és négy nőstényt tartalmazó alom kialakítását, akkor ennek részleges módosítása (például öt hím és három nőstény) is elfogadható. Nem fogadható el módosítás az olyan alomnál, amelyek nyolcnál kevesebb utódot tartalmaznak. Az F₂ utód-alom szabályozását azonos módon kell végezni.

Megfigyelések

A vizsgálati időszak alatt minden állatot legalább naponta egyszer meg kell figyelni. A magatartásbeli változásokat, a nehéz vagy elhúzódó ellést, valamint a toxikus tüneteket, ideértve az elhullást is, fel kell jegyezni. A pároztatás előtti időszakban és a pároztatás idején a tápfogyasztást hetente kell mérni. A vemhesség alatt a tápfogyasztást esetleg naponta is mérhetjük. A születés után és a szoptatás ideje alatt a tápfogyasztást ugyanazon a napon kell mérni, mint az alom tömegének a mérését. A „P”, illetve a „F₁” szülők testtömegét a vizsgálati anyag adásának megkezdésekor, majd hetente kell mérni. A megfigyeléseket valamennyi állatnál egyedileg kell feljegyezni.

A vemhesség időtartamát annak „0” napjától kell számítani. Az ellések után minden almot – az utódok számának és nemének, az élve, illetve a halva születések, illetőleg a makroszkóposan megállapítható rendellenességek megállapítására – a lehető legrövidebb időn belül meg kell vizsgálni.

A halva született, illetve a 4. napon kiírtott utódokat meg kell őrizni és meg kell vizsgálni rajtuk a lehetséges rendellenességeket. Az élve, született utódokat meg kell számolni, az alom tömegét a születés utáni reggelen, majd a negyedik és a hetedik napon, ezt követően pedig a vizsgálat befejezéséig hetente kell megmérni. A vizsgálat befejezésekor az állatok testtömegét egyedileg, minden állatnál külön kell feljegyezni. Az anyaállatok és az utódok fizikai vagy magatartási rendellenességeit fel kell jegyezni.

Patológia

Boncolás

Az összes „P”, illetve „F₁” élő állatot ki kell írtani, ha már nem szükségesek a reprodukcióra kifejtett hatások értékeléséhez. A pároztatásra ki nem választott F₁ valamint az F₂ utódállatokat az elválasztás után kell kiírtani.

A vizsgálat alatt a kiírtott vagy elpusztult „P”, illetve „F₁” szülőknél a szervi rendellenességeket vagy kóros elváltozásokat mikroszkóposan meg kell vizsgálni, külön figyelmet fordítva a reprodukciós rendszer szerveire. Az elhullott vagy haldokló utódokon a rendellenességeket meg kell vizsgálni.

Kórszövettani vizsgálatok

Az összes „P”, illetve „F₁” szülőnél a petefészket, a méhet, a méhnyakat, a vaginát, a heréket, a mellékheréket, az ondóhólyagokat, a prosztatát, a hypophysist és a célszerv(ek)et mikroszkópos vizsgálatra meg kell őrizni. Amennyiben az említett szerveket más dózissal kezelt állatokon nem vizsgálták meg, akkor a nagy dózissal kezelt csoport és a

kontroll csoport valamennyi „P”, illetve „F₁” állatánál, a pároztatásra kiválasztott állatoknál, valamint ahol ez lehetséges, a vizsgálat alatt elhullott állatoknál mikroszkópos vizsgálatot kell végezni. Azokat a szerveket, melyeken rendellenes elváltozásokat észleltek, a más dózissal kezelt csoportok valamennyi állatánál meg kell vizsgálni és mikroszkópos vizsgálatot kell végezni.

Azoknál az állatoknál, amelyeknél fennáll az infertilitás gyanúja, el lehet végezni a reprodukciós szervek mikroszkópos vizsgálatát.

2. ADATOK

Az eredmények feldolgozása

Az adatokat táblázatosan kell összefoglalni. A táblázatban minden vizsgálati csoportnál meg kell adni az állatok számát a vizsgálat indulásakor, a vemhes állatok számát, az elváltozások típusát, valamint a különböző típusú elváltozásokat mutató állatok százalékos arányát.

Amennyiben lehetséges, a számszerű eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármelyik elfogadott statisztikai módszert alkalmazni lehet.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

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

- alkalmazott faj, illetve törzs;
- toxikus tünetek nem és dózis szerint, beleértve a reprodukcióra, az ellésre és az életképességre vonatkozó adatokat;
- a halál időpontja a vizsgálat alatt, illetve a túlélő állatok kiírtásának ideje;
- az egyes fészekaljok tömege, az utódok átlagos testtömege, illetve a vizsgálat végén az utódok egyedi testtömege táblázatosan összefoglalva;
- a szaporodásra, az utódokra és a születés utáni növekedésre kifejtett toxikus és egyéb hatások ismertetése;
- a toxikus tünetek észlelésének napja, és azok ezt követő alakulása;
- a párzásra kiválasztott „P” és „F₁” állatok táplálék- és testtömeg adatai;
- boncolási leletek;
- valamennyi kórszövettani lelet részletes ismertetése;
- az eredmények statisztikai feldolgozása (amennyiben szükséges);
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd: Bevezetés B. rész (G).

4. IRODALOM

Lásd: Bevezetés B. rész (H).

B.36. TOXIKOKINETIKA

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd: Bevezetés B. rész.

1.3. Referencia anyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot megfelelő módon kell beadni. A vizsgálat céljától függően az anyagot a csoportokba sorolt kísérleti állatoknak egyszeri dózisban, vagy meghatározott időszakon keresztül adott ismételt dózisokban lehet beadni. Ezt követően – a vizsgálat típusától függően az anyagot, és/vagy annak metabolitjait a testnedvekben, a szövetekben és/vagy az exkrétumokban meg kell határozni.

A vizsgálatokat a vizsgálati anyag jelzetlen vagy jelzett formáival lehet elvégezni. Amennyiben jelzett anyagot használunk, akkor azt olyan módon kell az anyagba építeni, hogy az a vegyület sorsáról a legtöbb információt szolgáltatassa.

1.5. Minőségi kritériumok

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

A fiatal, egészséges, kifejlett állatoknak a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig kell akklimatizálódni a laboratóriumi körülményekhez. A vizsgálat előtt az állatokat véletlenszerűen kiválasztva kezelt és kontroll csoport(ok)ba kell sorolni. Speciális esetekben fiatal, vemhes vagy előkezelt állatokat lehet használni.

Vizsgálati feltételek

Kísérleti állatok

A toxikokinetikai vizsgálatokat egy vagy több megfelelő állatfajjal lehet elvégezni. Figyelembe kell venni, hogy ugyanazzal a vizsgálati anyaggal végzett más toxikológiai vizsgálatokban milyen fajokat használtak vagy szándékoznak használni. Amennyiben valamely vizsgálatban rágcslókat használunk, akkor az állatok testtömegének az átlaghoz viszonyított szóródása nem haladhatja meg a $\pm 20\%$ -ot.

Állatszám és nem

A felszívódás és a kiválasztás vizsgálatához kezdetben minden dóziscsoportban négy állatnak kell lenni. Nemet nem kell választani, azonban bizonyos körülmények között mindkét nem vizsgálatára szükség lehet. Amennyiben a válasz nemek szerint eltérő, akkor mindkét nemből négy állatot kell vizsgálni.

Amennyiben a vizsgálatot nem-rágcslókon végezzük, akkor kevesebb állatot lehet használni.

Amikor a szöveti eloszlást vizsgáljuk, akkor a csoport kezdeti nagyságát a különböző időpontokban kiírtandó állatok számának, illetve a vizsgálandó időpontok számának figyelembevételével kell megállapítani.

A metabolizmus vizsgálatokor a csoport nagysága a vizsgálat szükségleteitől függ.

A több dózissal és a több időpontban végzett vizsgálatoknál a csoport nagyságát az időpontok száma és a tervezett kiírások figyelembevételével kell megállapítani, azonban a csoportban legalább két állatnak kell lenni. A csoport nagyságának elégségesnek kell lenni ahhoz, hogy a vizsgálati anyag és/vagy a metabolitok felvételét, a platóját és kiürülését (amennyiben szükséges) elfogadhatóan jellemezhessek.

Dózisszintek

Egyszeri beadásnál legalább két különböző dózist kell használni. Kell egy olyan kis dózist adni, amelynek nincs észlelhető mérgező hatása, valamint egy nagy dózist, amelynél a toxikus hatás mellett a toxikokinetikai paraméterek megváltozhatnak.

A dózis ismételt beadásánál a kis dózis általában elegendő, azonban bizonyos esetekben a nagy dózis beadására is szükség lehet.

A vizsgálati anyag beadásának módja

A toxikokinetikai vizsgálatok végzésekor a vizsgálati anyagot ugyanúgy, amennyiben szükséges, ugyanolyan vivőszerrrel, kell adni, mint ahogyan azt más toxikológiai vizsgálatban adták vagy szándékoznak adni. A vizsgálati anyagot a vizsgálati állatok csoportjainak általában gyomorszondával vagy a táplálékba keverve orálisan, a bőrre helyezve, vagy bizonyos ideig belélegeztetve kell adni. A vizsgálati anyag intravénás beadása hasznos lehet a többi beadásmód utáni felszívódás egymáshoz viszonyított meghatározásához. Ezenkívül nem sokkal az anyag beadása után hasznos információkat lehet kapni az anyag eloszlási viszonyairól.

A vizsgálati anyag és a vivőszer esetleges kölcsönhatását számításba kell venni. Figyelmet kell fordítani arra van-e különbség a vizsgálati anyag felszívódásában, ha gyomorszondával vagy a táplálékba keverve adjuk, valamint figyelmet kell fordítani a dózis pontos meghatározásának a szükségességére, különösen akkor, amikor a vizsgálati anyagot a táplálékban adjuk.

Megfigyelési időszak

Naponta minden állatot meg kell figyelni és a toxikus tüneteket, beleértve a tünetek megjelenésének idejét, intenzitását és időtartamát, fel kell jegyezni.

Eljárás

A vizsgálati állatok testtömegének a megmérése után a vizsgálati anyagot a megfelelő módon kell beadni. Amennyiben ez lényeges, a vizsgálati állatokat a vizsgálati anyag beadása előtt éheztetni lehet.

F e l s z í v ó d á s

Az adott vizsgálati anyag felszívódásának sebességét és mértékét referencia csoport¹ felhasználásával vagy anélkül, különböző módon lehet meghatározni, pl.:

- a vizsgálati anyag és/vagy a metabolitok mennyiségének meghatározása a kiválasztott anyagokban, például a vizeletben, az epében, a székletben, a kilélegzett levegőben, valamint a visszamaradó anyag mennyiségének meghatározása az állattetekben;
- a biológiai reakciók összehasonlítása (például akut toxicitási vizsgálatok) a vizsgálati csoporttal, a kontroll csoporttal és/vagy a referencia csoporttal;
- a vesével kiválasztott anyag és a metabolitok mennyiségi összehasonlítása a vizsgálati csoport és a referencia csoport között;
- a vizsgálati anyag és/vagy a metabolitok plazmaszint/idő görbe alatti területének meghatározása, összevetve a referencia csoport adataival.

E l o s z l á s

Jelenleg két módszert használnak, amelyek közül bármelyiket vagy mindkettőt használni lehet az eloszlási módok elemzésére:

- a teljestest autoradiografiás technikák alkalmazásával hasznos minőségi információkat lehet kapni;
- mennyiségi információkat a vizsgálati állatoknak az expozíció utáni, különböző időpontokban történő kiirtásával, majd a szövetekben és a szervekben található vizsgálati anyag és/vagy a metabolitok koncentrációjának vagy mennyiségének a meghatározásával lehet kapni.

K i v á l a s z t á s

A kiválasztási vizsgálatokban a vizeletet, a székletet, a kilélegzett levegőt, valamint bizonyos körülmények között az epét kell gyűjteni. A vizsgálati anyagnak és/vagy metabolitjainak koncentrációját ezekben az exkrétumokban az expozíció után több időpontban addig kell mérni, amíg az anyagnak hozzávetőleg 95 százaléka ki nem ürül, vagy a mérést hét napon keresztül folytatni kell, ahogy az éppen megfelelő.

Speciális esetekben szükség lehet a vizsgálati anyag szoptató állatok tejében történő kiválasztásának a vizsgálatára.

M e t a b o l i z m u s

A metabolizmus mértékének és módjának vizsgálatához a biológiai mintákat megfelelő módszerekkel kell elemezni. A metabolitok szerkezetét tisztázni kell, valamint megfelelő metabolikus utat kell javasolni, amennyiben a korábbi toxikológiai vizsgálatokban felmerült kérdések megválaszolására szükség van. Az *in vitro* vizsgálatok segíthetnek a metabolikus utakra vonatkozó információk megszerzéséhez.

A metabolizmus és a toxicitás kapcsolatára vonatkozó további információkhoz biokémiai vizsgálatokkal lehet hozzájutni. Ilyen vizsgálat például a metabolizmusban szerepet játszó enzimszisztéma meghatározása, az endogén nem-ferije szulfidril csoportok kiirtése, valamint a vizsgálati anyag kapcsolódása makromolekulákhoz.

2. ADATOK

A vizsgálat típusának megfelelően az adatokat táblázatosan kell összefoglalni, továbbá, ahol szükséges, grafikusán is ábrázolni kell. A mérési eredmények átlagértékét és az idő, a dózis, a szövetek és szervek szerinti statisztikai szórást, ahol lehetséges, valamennyi állatnál meg kell adni. A felszívódás mértékét, valamint a kiválasztás mennyiségét és sebességét a megfelelő módszerrel meg kell határozni. Amennyiben metabolizmus vizsgálatokat végzünk, az azonosított metabolit szerkezetét és a lehetséges metabolikus utakat meg kell adni.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálat típusának megfelelően a vizsgálati jelentésnek, amennyiben lehetséges, a következő információkat kell tartalmazni:

- faj, törzs, forrás, környezeti viszonyok, takarmány;
- a jelzett anyagok jellemzése, amennyiben ilyent használtunk;
- dóziszintek és a beadások közti időköz;
- a vizsgálati anyag beadásának módjai és a használt vivőszerek;
- a toxikus és egyéb megfigyelt hatások;

¹ Ennél a módszernél a referencia csoport olyan csoportot jelent, amely a vizsgálati anyagot más módon kapja, ami biztosítja a dózis teljes biológiai hozzáférhetőségét.

– a vizsgálati anyag és/vagy a vizsgálati anyag metabolitjainak meghatározási módszerei a biológiai mintákban, beleértve a kilélegzett levegőt is;

- a mérési eredmények táblázatos összefoglalása nem, dózis, étrend, idő, szövetek és szervek szerint;
- a felszívódás és a kiválasztás mértékének a megadása az idő függvényében;
- a biológiai mintákban található metabolitok minőségi és mennyiségi kimutatására szolgáló módszerek;
- a metabolizmussal kapcsolatos biokémiai mérési módszerek;
- javasolt metabolikus utak;
- az eredmények megvitatása;
- az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd: Bevezetés B. rész (G).

4. IRODALOM

Lásd: Bevezetés B. rész (H).

B.37. SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEK KÉSŐI NEUROTOXICITÁST OKOZÓ HATÁSA AKUT EXPOZÍCIÓ UTÁN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Az anyagok mérgező hatásának meghatározásánál és értékelésénél fontos annak figyelembevétele, hogy bizonyos anyagcsoportok speciális típusú neurotoxicitást okoznak, amelyeket esetleg nem lehet a többi toxicitási vizsgálattal kimutatni. A megfigyelések szerint egyes szerves foszforvegyületek késői neurotoxicitást okoznak, és ezeknél az anyagoknál ennek a hatásnak a vizsgálatát meg kell fontolni.

Azoknak az anyagoknak a meghatározására, amelyek késői polyneuropathiát okozhatnak, *in vitro* szűrővizsgálatokat lehet végezni; azonban az *in vitro* vizsgálatok negatív eredményei nem nyújtanak biztosítékot arra, hogy az anyagnak nincs neurotoxikus hatása.

Lásd a B. rész általános bevezetését.

1.2. Fogalommeghatározások

A szerves foszforvegyületekhez tartoznak a töltés nélküli, szerves foszfát-észterek, a tioészterek vagy a szerves foszforsavak, a foszfonsavak és a foszforamid-savak anhidridjei, illetve a rokon foszfortiosav, foszfontiosav vagy foszfortioamid-sav, továbbá egyéb olyan, ebben a vegyületcsoportban ritkán előforduló anyagok, amelyek késői neurotoxicitást okozhatnak.

Késői neurotoxicitás az a tünetcsoport, amely időben késve jelentkező ataxiával, a gerincvelő és a perifériás idegek axonopathiájával és az idegszövetben lévő neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlásával vagy öregedésével jár.

1.3. Referencia anyagok

A referencia anyagot a pozitív kontroll csoporttal lehet vizsgálni azért, hogy igazolják, hogy a laboratórium vizsgálati körülményei között ezeknek a fajoknak a reakciói lényegesen nem változtak.

Példa egy széleskörűen alkalmazott idegméregre a tri-*o*-tolil-foszfát [CAS 78-30-8, EINECS 210-103-5, CAS nevezéktan szerinti neve: foszforsav trisz-(2-metil-fenil)-észter], más néven trisz-*o*-krezilfoszfát.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot egyszeri dózisban, szájon keresztül adják be házityúknak, amelyet szükség esetén megvédtek a heveny kolínerg hatásoktól. Az állatokon 21 napon keresztül figyelik a viselkedési rendellenességekre, ataxiára és idegbénulásra utaló tüneteket. A biokémiai vizsgálatokat, különösen a neuropathiás cél-észterázok (NTE) gátlását a véletlenszerűen kiválasztott és csoportokba sorolt tyúkokon végzik, általában az adagolás után 24–48 órával. Az adagolás után huszonegy nappal a megmaradt tyúkokat kiirtják, és elvégzik a kiválasztott idegszövetek kórszövettani vizsgálatát.

1.5. A vizsgálati módszer leírása

1.5.1 Előkészületek

Egészséges fiatal felnőtt tyúkokat, amelyeknek nincsenek zavaró vírusos betegségei és nem állnak gyógyszeres kezelés alatt, továbbá nincs rendellenes járásuk, véletlenszerűen kiválasztva kezelt és kontroll csoportokba sorolnak. Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodni.

Olyan ketrecet vagy elkülönített területet használnak, amely elég nagy ahhoz, hogy lehetővé tegye a tyúkok szabad mozgását és a járásukat könnyű megfigyelni.

A vizsgálati anyagot szájon keresztül adják be, gyomorszondával, zselatin kapszulákban vagy egyéb hasonló eljárással. A folyadékokat hígítás nélkül vagy megfelelő vivőszerben, pl. kukoricaolajba keverve adják be; a szilárd anyagokat, amennyiben lehet, feloldják, mivel a kapszulából a nagy mennyiségű szilárd anyag esetleg nem szívódik fel teljesen. Nem-vizes vivőszerknél a vivőszer esetleges mérgező hatását ismerni kell. Ha nem ismerik, akkor azt a vizsgálat előtt meg kell határozni.

1.5.2. Vizsgálati feltételek

1.5.2.1. Vizsgálati állatok

A fiatal felnőtt, 8–12 hónapos házi tojó tyúk (*Gallus gallus domesticus*) ajánlott. Standard méretű törzseket és fajtákat kell használni, és a tyúkokat szokásosan szabad mozgást biztosító körülmények között kell tenyészteni.

1.5.2.2. Állatszám és nem

A kezelt csoport mellett vivőszeres kontroll csoportot és pozitív kontroll csoportot is használni kell. A vivőszeres kontroll csoporttal a kezelt csoporttal azonos módon járnak el, kivéve azt, hogy a vizsgálati anyag beadása elmarad.

Minden csoportban elegendő számú tyúkot kell használni, úgy hogy legalább hat tyúkot ki lehessen írtani a biokémiai meghatározásokhoz (hármát-hármát a két időpontban), és hat tyúknak kell túlélni a 21 napos megfigyelési időszakot a kórtani vizsgálatokhoz.

A pozitív kontroll csoport lehet egy egyidejűleg tartott csoport, vagy egy nem túl régi, történelmi kontroll csoport. Ennek legalább hat tyúkból kell állnia, és ezeket egy ismert késleltetett neurotoxicitást okozó anyaggal kezelik, hármát a biokémiai, hármát a kórtani vizsgálatokhoz. A történelmi adatok rendszeres felújítása javasolt. Ha a vizsgálat valamilyen lényeges eleme (pl. származás, takarmány, tartási körülmények) megváltozik a vizsgálati laboratóriumban, új pozitív kontroll adatok kellenek.

1.5.2.3. Dózisszintek

A fő vizsgálatban az egyes csoportok dózisszintjeinek meghatározására megfelelő számú tyúk felhasználásával előzetes vizsgálatot kell végezni. Ebben az előzetes vizsgálatban általában minimális elhullás szükséges, hogy a fő vizsgálat megfelelő dózist ki lehessen választani. Azonban a heveny kolinerg hatások miatti elhullások megelőzésére atropint vagy egyéb olyan védőhatású anyagot lehet használni, amely ismert módon nem lép kölcsönhatásba a késleltetett neurotoxikus hatással. A vizsgálati anyag legnagyobb nem halálos dózisének a meghatározására (lásd B.1bisz módszer) többféle vizsgálati módszert lehet használni. A dózis nagyságának a megállapításánál a tyúkokra vonatkozó történelmi vagy egyéb toxicitási adatok is hasznosak lehetnek.

A fő vizsgálatban használt vizsgálati anyag dózisszintje legyen az előzetes vizsgálat eredményeinek figyelembevételével meghatározott lehető legnagyobb, melynek 2000 mg/kg testtömeg a felső határa. Az esetleg időközben előforduló elhullás nem gátolhatja meg a szükséges számú állat túlélését a biokémiai (hat) és a kórtani (hat) vizsgálatokra a 21. napon. A heveny kolinerg hatások miatti elhullást atropinnal vagy olyan egyéb védőhatású anyaggal kell megelőzni, amely ismert módon nem lép kölcsönhatásba a késleltetett neurotoxikus hatásokkal.

1.5.2.4. Határérték vizsgálat (limit teszt)

Ha a vizsgálatot legalább 2000 mg/kg testtömeg dózissal végzik az ebben az eljárásban leírt módszer szerint, és az nem okoz észlelhető mérgezési tüneteket, és amennyiben a hasonló szerkezetű anyagok vizsgálatából származó adatok szerint mérgezés nem is várható, akkor nagyobb dózisszinten végzett vizsgálat nem feltétlenül szükséges. A határérték vizsgálat alkalmazható, kivéve, ha a humánexpozíció nagyobb dózisszint használatát indokolja.

1.5.2.5. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszak 21 nap.

1.5.3. Eljárás

Az akut kolinerg hatás miatti elhullás megakadályozására használt védőhatású anyag beadása után a vizsgálati anyagot egyszeri dózisban kell beadni.

1.5.3.1. Általános megfigyelések

A megfigyelést mindjárt a beadás után meg kell kezdeni. Az első két napon minden tyúkot többször, majd 21 napon keresztül legalább naponta egyszer, egészen a tervezett kiírtásig kell megfigyelni. A mérgezés minden tünetét gondosan fel kell jegyezni, beleértve a viselkedési rendellenesség kialakulásának időpontját, típusát, súlyosságát és időtartamát. Az ataxiát olyan besorolási skálán kell mérni, amelynek legalább négy fokozata van, továbbá a bénulást is

fel kell jegyezni. A tyúkokat hetente legalább kétszer ki kell venni a ketrecből, és fokozott mozgásra kell készíteni (pl. létramászás), hogy az enyhe mérgező hatások megfigyelését is megkönnyítsék. Az elhullott és a súlyosan szenvedő állatokat el kell távolítani, humánusan ki kell írtani, majd fel kell boncolni.

1.5.3.2. Testtömeg

Közvetlenül a vizsgálati anyag beadása előtt, majd legalább hetente egyszer minden tyúk testtömegét meg kell mérni.

1.5.3.3. Biokémia

Minden kezelt és vivőszeres kontroll csoportból hat véletlenszerűen kiválasztott tyúkot, a pozitív csoportból pedig három tyúkot (ha egyidejűleg használtak ilyent), néhány nappal az utolsó dózis beadása után ki kell írtani, az agyat és az ágyéki gerincvelőt ki kell preparálni, és azokban a neuropathiás cél-észteráz aktivitás (NTE) gátlást meg kell mérni. Ezenkívül hasznos lehet, ha az ülöideget is kipreparálják és abban a neuropathiás cél-észteráz aktivitás (NTE) gátlást megméri. A kezelt és a kontroll csoportban általában három tyúkot írtanak ki az utolsó dózis beadása után 24 órával és másik hármat 48 órával. Ha a mérgezés klinikai tünetei (ezt a kolinerg tünetek jelentkezésének idejéből gyakran meg lehet állapítani) arra utalnak, hogy a toxikus anyag lassan ürül, akkor három tyúktól javasolt szövetmintát venni, mindegyiktől kétszer, az anyag beadása után 24 és 72 órával.

Ha az célszerűnek tűnik, ezekből a mintákból az acetilkolin-észteráz (AChE) aktivitást is meg lehet határozni. Figyelembe kell azonban venni az AChE spontán újraaktiválódását, amely *in vivo* előfordulhat és így az anyag AChE gátlás alulértékeléséhez vezethet.

1.5.3.4. Boncolás

Minden (a tervezett módon és a haldoklás közben kiírtott) állatot fel kell boncolni, ami az agy és a gerincvelő vizsgálatát is magába foglalja.

1.5.3.5. Kórszöveti vizsgálat

A vizsgálati időszakot túlélő és a biokémiai vizsgálatokat elkerülő állatok idegszövetein mikroszkópos vizsgálatot kell végezni. A szöveteket átáramoltatásos módszerrel *in situ* tartósítják. A metszeteknek a kisagyat (középső hosszanti szinten), a nyúltagyat, a gerincvelőt és a perifériás idegeket kell tartalmazni. A gerincvelő metszeteit a felső nyaki, a középső mellkasi és az ágyék-keresztcsonti szakaszból kell készíteni. Metszeteket kell készíteni a n. tibialisból és annak a m. gastrocnemius ellátó elágazásaiból, valamint a n. ischiadicusból. A metszeteket megfelelő mielin- és axonspecifikus festékekkel kell megfesteni. A mikroszkópos vizsgálatot először minden állat tartósított szövetein a kontroll- és a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál végzik el. Ha a legnagyobb dózissal kezelt csoportnál bizonyítható a hatás, akkor a mikroszkópos vizsgálatot a középső és a kis dózissal kezelt csoport állatainak szövetein is elvégzik.

2. ADATOK

Az ebben a módszerben a kiválasztott végpontokon kapott negatív eredmények (biokémia, kórszövettan és viselkedési megfigyelések) alapján a késői neurotoxicitás megállapítására szokásosan nem szükséges további vizsgálat. Bizonytalan vagy nem meggyőző eredményeknél szükség lehet további vizsgálatra.

Az adatokat egyedileg, minden állatra külön kell megadni. Ezenkívül minden adatot táblázatos formában kell összefoglalni, ami minden vizsgálati csoportnál feltünteteti a felhasznált állatok számát a vizsgálat elején, a mérgezett állatok számát, a viselkedési vagy biokémiai változásokat, az elváltozások vagy hatások súlyosságát, az egyes elváltozások vagy hatásokat mutató állatok százalékos arányát, a hatás vagy a elváltozás típusa és súlyossága szerint csoportosítva.

Ennek a vizsgálatnak az eredményeit a kezelt és kontroll csoportnál az előfordulás gyakorisága, a súlyosság, a viselkedési, a biokémiai és a kórszöveti vizsgálati eredmények, valamint bármely más megfigyelt hatás alapján kell értékelni.

A számszerűen megadott eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel kell értékelni. Az alkalmazott statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell kiválasztani.

3. JELENTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek – amennyiben lehetséges – a következő információkat kell tartalmazni:

Vizsgálati állatok.

- az alkalmazott törzs;
- az állatok száma és kora;
- származás, tartási körülmények stb.;
- az egyes állatok tömege a vizsgálat kezdetekor.

Vizsgálati feltételek.

- a vizsgálati anyag előkészítésének, állandóságának és homogenitásának részletei, ha szükséges;
- a vivőszer kiválasztásának indoklása;
- a vizsgálati anyag beadásának részletei;
- táplálék és a víz minőségi adatai;
- a dóziszválasztás indoklása;
- a dózisek jellemzése, beleértve a vivőszert, térfogatot és a beadott anyag fizikai formáját;
- bármely beadott védőhatású anyag megnevezése, illetve beadásának részletei.

Eredmények:

- testtömeg adatok;
- mérgezési tünetek csoportonként, beleértve az elhullást;
- az észlelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilisek vagy nem);
- a biokémiai módszerek részletes leírása és eredményei;
- boncolási leletek;
- a kórszövettani leletek részletes leírása;
- ahol alkalmazható, az adatok statisztikai feldolgozásának módja.

Az eredmények megvitatása.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

Ez a módszer analóg az OECD TG 418-cal.

B.38. SZERVES FOSZFORVEGYÜLETEK KÉSŐI NEUROTOXICITÁST OKOZÓ HATÁSA – 28 NAPOS ISMÉTELT ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Az anyagok mérgező hatásainak meghatározásánál és értékelésénél fontos annak figyelembevétele, hogy bizonyos anyagcsoportok speciális típusú neurotoxicitást okozhatnak, amelyeket esetleg nem lehet a többi toxicitási vizsgálattal kimutatni. Egyes szerves foszforvegyületek a megfigyelések szerint késői neurotoxicitást okoznak, és ezek vizsgálatát meg kell fontolni.

Azoknak az anyagoknak a meghatározására, amelyek késői polyneuropathiát okozhatnak, *in vitro* szűrővizsgálatokat lehet végezni; azonban az *in vitro* vizsgálatok negatív eredményei nem nyújtanak biztosítékot arra, hogy az anyagoknak nincs neurotoxikus hatása.

Ez a 28 napos késleltetett neurotoxicitási vizsgálat információkat adhat azokról az egészséget fenyegető lehetséges veszélyekről, amelyeket a meghatározott időn keresztül ismétlődő expozíció okozhat. Ismereteket nyújthat a dóziszválasz összefüggésről, valamint megbecsülheti a még nem észlelhető ártalmas hatás szintjét, ami hasznos lehet az expozíciónál a biztonsági határértékek megállapításához.

Lásd a B. rész általános bevezetését.

1.2. Fogalom meghatározások

A *szerves foszforvegyületekhez* tartoznak a töltés nélküli, szerves foszfát-észterek, a tioészterek vagy a szerves foszforsavak, a foszfonsavak és a foszforamid-savak anhidridjei, illetve a rokon foszfortiosav, foszfontiosav vagy foszfortioamid-sav, továbbá egyéb, olyan, ebben az anyagcsoportban ritkán előforduló anyagok, amelyek késői neurotoxicitást okozhatnak.

Késői neurotoxicitás az a tünetcsoport, amely időben késve jelentkező ataxiával, a gerincvelő és a perifériás idegek disztális részeinek axonopathiájával és az idegszövetben lévő neuropathiás cél-észteráz (NTE) aktivitás gátlásával vagy öregedésével jár.

1.3. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot szájon keresztül naponta adják be a házi tyúkoknak, 28 napon keresztül. Az állatokat az utolsó dózist követő 14. nap végéig a viselkedési rendellenességekre, az ataxiára és az idegbénulásra utaló tüneteket legalább naponta meg kell figyelni. A biokémiai vizsgálatokat, különösen a neuropathiás cél-észteráz (NTE) aktivitás gátlásának a vizsgálatát a véletlenszerűen kiválasztott és csoportokba sorolt tyúkokon kell végezni, általában az utolsó dózis beadása után 24 és 48 órával. Az adagolás után két héttel a megmaradt tyúkokat ki kell irtani és a kiválasztott idegszövetekből kórszövettani vizsgálatot kell végezni.

1.4. A vizsgálati módszer leírása

1.4.1. Előkészületek

Egészséges fiatal felnőtt tyúkokat, melyeknek nincs zavaros vírusos betegsége és nem állnak gyógyszeres kezelés alatt, továbbá nincs rendellenes járásuk, véletlenszerűen kiválasztva kezelt és kontroll csoportba sorolnak. Az állatokat a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják a laboratóriumi körülményekhez alkalmazkodni.

Olyan ketrecet vagy elkülönített területet használnak, amely elég nagy ahhoz, hogy lehetővé tegye a tyúkok szabad mozgását és a járásukat könnyű megfigyelni.

A vizsgálati anyagot lehetőleg szájon keresztül adják be, gyomorszondával vagy zselatin kapszulákban, mindennap, hetente hétszer. A folyadékokat hígítás nélkül vagy megfelelő vívőszerezrel, pl. kukoricaolajba keverve adják be; a szilárd anyagokat, amennyiben lehetséges, feloldják, mivel a kapszulába helyezett nagy mennyiségű szilárd anyag esetleg nem szívódik fel teljesen. Nem-vizes vívőszereknél a vívőszer esetleges mérgező hatását ismerni kell, ha az ismeretlen, akkor azt a vizsgálat előtt meg kell határozni.

1.4.2. Vizsgálati körülmények

1.4.2.1. Vizsgálati állatok

A fiatal felnőtt, 8–12 hónapos házi tojó tyúk (*Gallus gallus domesticus*) ajánlott. Standard méretű törzseket és fajtákat kell használni, és a tyúkokat szokásosan szabad mozgást biztosító körülmények között kell tenyészteni.

1.4.2.2. Állatszám és nem

1.4.2.3. Általában legalább három kezelt és egy vívőszerez kontroll csoportot kell használni. A vívőszerez kontroll csoporttal a kezelt csoporttal azonos módon járnak el, kivéve azt, hogy a vizsgálati anyag beadása elmarad.

Minden csoportban elegendő számú tyúkot kell használni úgy, hogy legalább hat tyúkot ki lehessen irtani a biokémiai vizsgálatokhoz (három-három a két időpontban), és hat érje el a 14 napos utómegfigyelési időszakot a kórtani vizsgálatokhoz.

1.4.2.3. Dózisszintek

A dózisszintek meghatározását három heveny késői neurotoxicitási vizsgálat és a vizsgálati anyagra vonatkozó bármely egyéb létező toxicitási vagy kinetikai adatok figyelembevételével végzik. A legnagyobb dózisszintet azzal a céllal választják ki, hogy az mérgező hatásokat, lehetőleg késleltetett neurotoxicitást okozzon, de ne okozzon elhullást vagy nyilvánvaló szenvedést. Ezután csökkenő sorrendben kijelölik a dózisszinteket, azzal az igénnyel, hogy megállapítsanak minden dózis-válasz összefüggést, és a legalacsonyabb dózisszintnél meghatározzák a még nem észlelhető káros hatás szintjét.

1.4.2.4. Határérték vizsgálat (limit teszt)

Ha a vizsgálatot legalább 1000 mg/kg testtömeg dózissal végzik az ebben az eljárásban leírt módszer szerint, és az nem okoz észlelhető mérgezési tüneteket, és amennyiben a hasonló szerkezetű anyagok vizsgálataiból származó adatok alapján mérgezés nem várható, akkor nagyobb dózisszinten végzett vizsgálat nem feltétlenül szükséges. A határérték vizsgálat alkalmazható, kivéve, ha a humán expozíció nagyobb dózisszint használatát indokolja.

1.4.2.5. Megfigyelési időszak

Az expozíciós időszak alatt, majd azt követően 14 napon keresztül legalább naponta, minden állatot meg kell figyelni, kivéve, ha előre megtervezett boncolást végeznek.

1.4.3. Eljárás

Az állatoknak 28 napon keresztül hetente hétszer kell beadni a vizsgálati anyagot.

1.4.3.1. Általános megfigyelések

A megfigyelés mindjárt a kezelés megkezdése után meg kell kezdeni. A 28 napos kezelési időszak alatt, majd az adagolás után 14 napon keresztül, vagy a tervezett kiírtásig minden tyúkot legalább naponta egyszer gondosan meg kell figyelni. A mérgezés minden tünetét gondosan fel kell jegyezni, beleértve a tünetek megjelenésének időpontját, típusát, súlyosságát és időtartamát. A megfigyelésnek ki kell terjednie a viselkedési rendellenességekre, de nem korlátozódhat csak erre. Az ataxiát olyan besorolási skálán kell mérni, amelynek legalább négy fokozata van, valamint a bénulást is fel kell jegyezni. A tyúkokat hetente legalább kétszer kiveszik a ketrecből és fokozott mozgási tevékenységre készítik (pl. létramászás), hogy a még enyhe mérgező tünetek megfigyelését is megkönnyítsék. Az elhullott állatokat és a súlyosan szenvedő állatokat el kell távolítani, humánus módon ki kell irtani, majd fel kell boncolni.

1.4.3.2. Testtömeg

Közvetlenül a vizsgálati anyag beadása előtt, majd hetente legalább egyszer minden tyúk testtömegét meg kell mérni.

1.4.3.3. Biokémia

Minden kezelt és vivőszeres kontroll csoportból hat három véletlenszerűen kiválasztott tyúkot néhány nappal az utolsó dózis beadása után ki kell írtani, az agyat és az ágyéki gerincvelőt ki kell preparálni, és azokban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) aktivitás gátlást meg kell határozni. Ezenkívül, hasznos lehet a n. ischiadicus kiperarálása, és abban a neuropathiás cél-észteráz (NTE) aktivitás gátlás megmérése. Általában mind a kezelt, mind a kontroll csoportból három tyúkot írtanak ki 24 órával, és másik hármat 48 órával az utolsó dózis beadása után. Ha az akut vagy más vizsgálatokból származó (pl. toxikokinetikai vizsgálatok) adatok arra utalnak, hogy az utolsó dózis beadása után a kiírtásra más időpont a megfelelő, akkor ezt az időpontot kell választani, és ennek ésszerű indoklását meg kell adni.

Ha az célszerűnek tűnik, ezekből a mintákból az acetilkolin-észteráz (AChE) aktivitást is meg lehet határozni. Figyelembe kell azonban venni az AChE spontán újraaktiválódását, amely *in vivo* előfordulhat, és így az anyag AChE gátló hatásának alulértékeléséhez vezethet.

1.4.3.4. Boncolás

Minden (a tervezett módon és a haldoklás közben kiírtott) állatot fel kell boncolni, amihez az agy és a gerincvelő vizsgálata is hozzátartozik.

1.4.3.5. Kórszöveti vizsgálat

A vizsgálati időszakot túlélő és a biokémiai vizsgálatokat elkerülő állatok idegszövetein mikroszkópos vizsgálatot kell végezni. A szöveteket átáramoltatásos módszerrel *in situ* tartósítják. A metszeteknek a kisagyat (középső hosszanti szinten), a nyúltagyat, a gerincvelőt és a perifériás idegeket kell tartalmazni. A gerincvelő metszeteit a felső nyaki, a középső mellkasi és az ágyék-keresztcsonti szakaszból készítik. A perifériás idegi metszeteket a n. tibialisból és annak a m. gastrocnemiuszt ellátó elágazásaiból és a n. ischiadicusból készítik. A metszeteket a megfelelő mielinre és axonra érzékeny festékekkel kell megfesteni.

2. ADATOK

Az ebben a módszerben a kiválasztott végpontokon kapott negatív eredmények (biokémia, kórszövettan és viselkedési megfigyelések) alapján a késői neurotoxicitás általános megállapítására szokásosan nem szükséges további vizsgálat. Bizonytalan vagy nem meggyőző eredményeknél szükség lehet további vizsgálatra.

Az adatokat egyedileg, minden állatra külön kell megadni. Ezenkívül minden adatot táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportnál feltünteti a felhasznált állatok számát a vizsgálat elején, a beteg állatok számát, a viselkedési vagy a biokémiai változásokat, az elváltozások vagy a hatások súlyosságának leírását, valamint az egyes elváltozásokat vagy hatásokat mutató állatok százalékos arányát a hatás vagy elváltozás típusa és súlyossága szerint csoportosítva.

Ennek a vizsgálatnak az eredményeit a kezelt és kontroll csoportoknál az előfordulás gyakorisága, a súlyosság, a viselkedés, a biokémiai és a kórszöveti vizsgálatok eredményei, és bármely más megfigyelt hatás alapján kell értékelni.

A számszerűen megadott eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel kell értékelni. Az alkalmazott statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell kiválasztani.

3. JELENTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek – amennyiben lehetséges – a következő információkat kell tartalmazni:

Vizsgálati állatok:

- alkalmazott törzs;
- az állatok száma és kora;
- származás, tartási körülmények stb.;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Vizsgálati körülmények:

- a vizsgálati anyag előkészítésének, állandóságának és homogenitásának részletei, ha szükséges;
- a vivőszer kiválasztásának indoklása;
- a vizsgálati anyag beadásának részletei;
- a táplálék és a víz minőségi adatai;
- a dózis kiválasztásának indoklása;
- a dózisos jellemzése, beleértve a vivőszer, térfogatot és a beadott anyag fizikai formáját;
- a biokémiai meghatározásra választott időpontok indoklása, ha az 24 és 48 órától eltér.

Eredmények:

- testtömeg;
- mérgezési tünetek adatai csoportonként, beleértve az elhullást;
- a még nem észlelhető káros hatás szintje;
- a megfigyelt klinikai tünetek természete, súlyossága és tartama (reverzibilis vagy nem);
- a biokémiai módszerek részletes leírása és eredményei;
- boncolási leletek;
- a kórszövettani leletek részletes leírása;
- ahol alkalmazható, az adatok statisztikai feldolgozásának módja.

Az eredmények megvitatása.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

Ez a módszer analóg az OECD TG 419-cel.

B.39. NEM TERVEZETT DNS SZINTÉZIS (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) VIZSGÁLAT *IN VIVO* EMLŐS MÁJSEJTEKBEN

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 486, Nem tervezett DNS szintézis (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) vizsgálat *in vivo* emlős májsejtekben (1997) másolata.

1.1. Bevezetés

Az *in vivo* emlős májsejtekben végzett nem tervezett DNS szintézis (Unscheduled DNA Synthesis, UDS) vizsgálat azoknak a tesztanyagoknak a kimutatására szolgál, amelyek képesek DNS reparációt indukálni a kezelt állatok májsejtjeiben (1), (2), (3), (4).

Ez egy *in vivo* módszer a kémiai anyagok genotoxikus hatásának a vizsgálatára a májban. A vizsgált végpont (end point) jelzi a DNS károsodást és az ezt követő reparációt a májsejtekben. A felszívódott anyagok metabolizmusának rendszerint a máj a fő helye, ezért a máj megfelelő hely a DNS károsodás *in vivo* vizsgálatára.

Amennyiben van rá bizonyíték, hogy a tesztanyag nem fogja elérni a célszövetet, ez a teszt nem alkalmas erre a vizsgálatra.

Az UDS-t jelzett nukleozid felvételének a meghatározásával vizsgálják olyan sejtekben, amelyek nem mentek át tervezett (S fázisú) DNS szintézisen. A legszélesebb körben alkalmazott technikával a tríciummal jelölt timidin (³H-TdR) felvételt határozzák meg autoradiográfiás úton. Az *in vivo* UDS vizsgálatra előnyben részesítik a patkánymájat. Más szervek is használhatók UDS tesztre, de azokra nem vonatkozik ez a módszer/leírás.

Az UDS válasz kimutatása függ a károsodás helyén kivágott és a helyükre beépített DNS bázisok számától. Ezért az UDS teszt különösen értékes módszer a kémiai anyagok által indukált hosszú-szakaszú („long patch”, 20–30 bázispár) kivágásos reparációk kimutatására. Ezzel szemben a rövid-szakaszú („short patch”, 1–3 bázis) kivágásos reparációk iránt sokkal kisebb az érzékenysége. Mutagén történések is előfordulhatnak a reparáció elmaradása, hibás reparáció, vagy a DNS károsodás hibás replikációja révén. Az UDS válasz mértéke nem jelzi a reparációs folyamat pontosságát. Az is lehetséges továbbá, hogy a mutagén reagál a DNS-sel, de a károsodás nem kivágásos (excíziós) reparáció révén javítódik. A mutagén aktivitásra vonatkozó specifikus információk hiányát kompenzálja ennek a végpontnak a potenciális érzékenysége, mivel az UDS-t az egész genomon határozza meg.

Lásd még: Általános bevezetés B. rész.

1.2. Fogalmi meghatározások

Reparálódó sejtek: a vizsgálatot végző laboratórium által előre megadott értéknél magasabb nettó sejtmagi szemcseszám (net nuclear grains, NNG).

Nettó sejtmagi szemcseszám: az autoradiográfiás UDS tesztben az UDS aktivitás kvantitatív mértéke, amit úgy kapnak meg, hogy a sejtmagi szemcsék számából (NG) levonják a sejttaggal azonos területű citoplazmára eső szemcsék számát (CG): $NNG = NG - CG$. NNG-t kiszámolják sejtenként, majd összevonják a tenyésztet sejtjeire, a párhuzamos tenyészetekre stb.

Nem tervezett DNS szintézis (UDS): kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS szintézis.

1.3. A tesztmódszer alapelve

Az *in vivo* UDS teszt emlős májsejtekben jelzi a kémiai anyagok vagy fizikai ágensek által indukált DNS károsodást tartalmazó szakasz kivágása és eltávolítása után végbemenő reparációs DNS szintézist. A teszt rendszerint a

³H-TdR májsejtekbe történő beépülésén alapul, amelyek között alacsony az S-fázisú sejtek gyakorisága. A ³H-TdR beépülést általában autoradiográfiásan határozzák meg, mivel ez a technika kevésbé érzékeny az S-fázisú sejtek zavaró hatására, mint a folyadék szcintillációs technika.

1.4. A teszt módszer leírása

1.4.1. Előkészítendő anyagok

1.4.1.1. Az állatfaj kiválasztása

A leggyakrabban patkányokat használnak, de bármilyen más alkalmas emlős faj is használható. Általánosan alkalmazott laboratóriumi állattörzsek egészséges, fiatal felnőtt egyedeket kell alkalmazni. A kísérlet kezdetén az állatok között a testsúlybeli eltérés legyen minimális, egyik nemből se haladja meg az átlag testsúly $\pm 20\%$ -át.

1.4.1.2. Tartási és etetési körülmények

A tartási körülményeket illetően lásd az Általános bevezetés B. részét, de a páratartalom legyen 50–60% között.

1.4.1.3. Az állatok előkészítése

Fiatal felnőtt egészséges állatokat random módon (véletlenszerűen) sorolják be a kontroll és kezelt csoportokba. A dobozokat úgy kell elrendezni, hogy a dobozok elhelyezéséből adódó lehetséges hatások a minimálisra csökkenjenek. Az állatokat egyedileg jelölik, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt napig hagyják akklimatizálódni a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.1.4. A dózisok elkészítése

A szilárd tesztanyagokat az állatok kezelése előtt megfelelő oldószerben vagy vivőanyagban kell oldani vagy szuszpendálni, szükség esetén hígítani. A folyékony tesztanyagokat lehet közvetlenül vagy hígítás után adni. Frissen előkészített tesztanyagot kell adni. Kivételt csak akkor lehet tenni, amikor a stabilitásra vonatkozó adatok megengedik a tárolást.

1.4.2. Kísérleti körülmények

1.4.2.1. Oldószer/vivőanyag

Az oldószer/vivőanyag az alkalmazott mennyiségben nem lehet toxikus, és nem lehet rá gyanús, hogy képes kémiai reakcióba lépni a tesztanyaggal. Amennyiben nem a jól ismert oldószerek/vivőanyagok valamelyikét használják, a választott oldószer/vivőanyag kompatibilitását adatokkal kell igazolni. Ajánlott, hogy amennyiben lehetséges vizes oldószer/vivőanyag használata kerüljön mindenképp megfontolásra.

1.4.2.2. Kontrollok

A kísérlet minden, egymástól függetlenül végzett részéhez be kell állítani egyidejű negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontrollt. A kontroll csoportok állataival a tesztanyag adását kivéve ugyanúgy kell bánni, mint a tesztanyaggal kezelt állatokkal.

A pozitív kontrollok legyenek ismert UDS indukáló anyagok, amikor olyan dózisszinteken adják, amelyeken várhatóan kimutatható emelkedést okoznak a háttér felett. Hatásuk kifejtéséhez metabolikus aktivációt igénylő pozitív kontrollokat kell használni olyan dózisszinteken, amelyeken a hatás mérsékelt (4).

A pozitív kontroll dózisokat úgy kell megválasztani, hogy a hatás legyen egyértelmű, de ne legyenek olyan magasak, hogy a kódolt lemezek identitása (pozitív kontroll volta) nyomban lelepleződjön a vizsgáló előtt. A következő anyagok lehetnek például pozitív kontrollok:

Mintavételi idő	Pozitív kontroll	CAS szám	EINECS szám
Korai mintavételi idő (2–4 óra)	N-nirozo-dimetil-amin	62-75-9	200-249-8
Késői mintavételi idő (12–16 óra)	2-acetamido-fluorén	53-96-3	200-188-6

Más megfelelő pozitív kontroll anyagot is lehet használni. Elfogadható, ha a pozitív kontrollal más módon kezelnek, mint a tesztanyaggal.

1.5. A vizsgálat kivitelezése

1.5.1. Az állatok száma és neme

Megfelelő számú állatot kell használni, figyelembe véve az UDS válaszok biológiai változékonyságát. Legalább három értékelhető állatnak kell lenni minden csoportban. Amennyiben jelentős historikus adatbázissal rendelkezik a laboratórium, az egyidejű kontroll csoportokban elegendő lehet csak egy-két állatot beállítani.

Ha az adott időben rendelkezésre álló, ugyanazon fajra és ugyanolyan kezelési módra vonatkozó adatok bizonyítják, hogy a toxicitásban nincs alapvető különbség a két nem között, akkor elegendőnek tartható a csak egyik nemből végzett vizsgálat, a hímeket előnyben részesítve. Amennyiben az emberi expozíció szex-specifikus, mint pl. néhány gyógyszer esetében, akkor a tesztet csak a megfelelő nemű állatokon kell elvégezni.

1.5.2. A kezelés rendje (kezelési séma)

A tesztanyaggal általában egyszeri alkalommal kezelnek.

1.5.3. Dózisszintek

Általában legalább két dózisszintet használnak. A legmagasabb dózis úgy határozható meg, mint amelyik toxikus tüneteket okoz, és amelynél az ugyanolyan módon adott magasabb dózis várhatóan már elhullást okozna. Az alacsonyabb dózis legyen a nagy dózis 25–50%-a.

Azok az anyagok, amelyek már alacsony, nem-toxikus dózisszinteken specifikus biológiai hatásokkal rendelkeznek (pl. a hormonok és a mitogének) kivételt képezhetnek a fenti dóziszválasztási kritériumok alól, ezeknél esetről esetre kell döntenet. Amikor megfelelő adatok hiányában dóziskereső vizsgálatot végeznek, azt ugyanabban a laboratóriumban kell csinálni, ugyanazt a fajt, törzset, nemet és kezelési sémát használva mint a tervezett fő kísérletben.

A legmagasabb dózist az is meghatározhatja, ha toxikus tünetek állapíthatók meg a májban (pl. piknotikus sejtmagok).

1.5.4. Küszöb (limit) teszt

Amikor a 2000 mg/ts kg dózis egyszerre, vagy ugyanazon a napon kétszerre beadva nem okoz észrevehető toxikus tüneteket, és amikor a rokon kémiai szerkezetű vegyületekre vonatkozó adatok alapján nem is várható genotoxikus hatás, akkor a három dózisszinten végzett teljes körű vizsgálat nem tartható feltétlenül szükségesnek. Amennyiben a várható emberi expozíció indokolja, a limit teszt végezhető magasabb dózissal is.

1.5.5. A dózisok beadása

A tesztanyagot általában gyomorszondával vagy egy megfelelő intubációs kanüllel adják be. Más bejuttatási mód is elfogadható lehet, ha meg tudják indokolni. Az intraperitoneális kezelést nem ajánlják, mert ebben az esetben a máj közvetlenül exponálódhat a tesztanyaggal, nem pedig a keringési rendszeren keresztül. Az egyszeri alkalommal beadható folyadék maximális térfogata az állat testsúlyától függ. A térfogat nem lehet több mint 2 ml/100 ts g. Ennél nagyobb térfogat alkalmazását indokolni kell. Az irritatív vagy korrózív anyagok kivételével, amelyek magasabb koncentrációkban általában igen súlyos hatásúak, a dózistérfogat változását minimalizálni kell úgy, hogy a tesztanyag koncentrációjának beállításával minden dózisszinten azonos legyen a dózistérfogat.

1.5.6. Májsejtek preparálása

A kezelt állatokból a beadás után rendszerint 12–16 óra múlva preparálnak májsejteket. Egy további, korábbi mintavételi időpontra (általában a beadást követő 2–4. órában) akkor van szükség, amikor nincs egy egyértelmű pozitív válasz a 12–16 órás mintákban. De más mintavételi időpontok is használhatók, amennyiben azt toxikokinetikai adatok indokolják.

Az emlős májsejtek rövididejű (short term) tenyészeit általában a máj in situ kollagenáz perfúziójával indítják, majd a frissen disszociált májsejteket hagyják letapadni egy megfelelő felületre. A negatív kontroll állatokból származó májsejtek életképességének legalább 50%-osnak kell lenni (5).

1.5.7. Az UDS meghatározása

A frissen izolált emlős májsejteket általában ^3H -TdR-t tartalmazó tápfolyadékban inkubálják megfelelő ideig (pl. 3–8 órában keresztül). Az inkubációs periódus végén a tápfolyadékot eltávolítják a sejtekről, és magas jelöletlen timidin koncentrációjú tápfolyadékban inkubálják tovább a be nem épült radioaktivitás eltávolítására („cold chase”). A sejteket ezután öblítik, fixálják és megszárazítják. Hosszabb inkubációs idők esetén a cold chase esetleg elmaradhat. A lemezeket autoradiográfiás emulzióba mártják, és sötétben hűtve (pl. 7–14 napig) exponálják, előhívják, festik, és leszárolják az exponált ezüstszemcséket. Két vagy három lemezt preparálnak minden állatból.

1.5.8. Mikroszkópos vizsgálat

Az autoradiográfiás preparátumnak elegendő normális morfológiájú sejtet kell tartalmaznia ahhoz, hogy lehetővé váljon az UDS megfelelő felmérése. A sejteket mikroszkóposan vizsgálják citotoxicitási tünetekre (pl. piknózis, csökkent jelölődési szint).

A lemezeket a szemcseszámolás előtt kódolni kell. Állatonként általában 100 sejtet számolnak le legalább két lemezről; állatonként kevesebb mint 100 sejt leszárolását indokolni kell. Az S-fázisú sejtmagok felett nem számolnak szemcséket, de az S-fázisú sejtek aránya feljegyezhető.

A morfológiailag normális sejtekben a ^3H -TdR beépülés mértékét a sejtmagba és a citoplazmába, amit az ezüstszemcsék kiválása bizonyít, megfelelő módszerekkel kell meghatározni.

2. ADATFELDOLGOZÁS

2.1. Az eredmények kezelése

Meg kell adni a lemezek és az állatok egyedi adatait, továbbá valamennyi adatot össze kell foglalni táblázatos formában. A sejtmagi szemcseszámokból (NG) levonva a citoplazmára eső szemcseszámokat (CG), minden egyes sejtre, minden egyes állatra, minden egyes dózisszintre ki kell számolni a nettó sejtmagi szemcseszámokat (NNG). Amennyiben leszárolják a reparálódó sejteket, meg kell határozni a reparálódó sejtek kritériumait, amelyeknek a

historikus vagy egyidejű negatív kontroll adatokon kell alapulniuk. A számszerű eredményeket statisztikai módszerekkel lehet értékelni. Statisztikai módszerek alkalmazása esetén, azokat még a vizsgálat kivitelezése előtt ki kell választani, és a választást meg kell indokolni.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

Példák a pozitív és negatív eredmény kritériumaira:

- | | | |
|---------|------|---|
| pozitív | (I) | az NNG értékek meghaladják a laboratórium historikus adatain alapuló előre meghatározott küszöbértéket; |
| vagy | (II) | az NNG értékek szignifikánsan magasabbak, mint az egyidejű kontroll; |
| negatív | (I) | az NNG értékek a historikus kontroll küszöb alatt vannak; |
| vagy | (II) | az NNG értékek az egyidejű negatív kontrollnál nem szignifikánsan magasabbak. |

Az eredményeknek a biológiai vonatkozásait kell fontolóra venni: pl. az olyan paramétereket, mint az állatok közötti különbözőség, dózis-válasz összefüggés és a citotoxicitás. Az eredmények értékelésében segítséget nyújthatnak a statisztikai módszerek, de a statisztikai szignifikancia nem lehet a pozitív eredmény megállapításának egyedüli kritériuma.

Bár a legtöbb kísérlet egyértelműen pozitív vagy negatív eredményt ad, néhány esetben előfordul, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján nem lehet egyértelműen állást foglalni a tesztanyag aktivitását illetően. Az eredmények az újabb kísérletek számától függetlenül bizonytalanok vagy kérdésesek maradhatnak.

Az *in vivo* emlős máj UDS vizsgálatban kapott pozitív eredmény azt jelenti, hogy a kísérleti anyag DNS károsodást indukál az emlős májsejtekben *in vivo*, ami reparálódhat UDS-sel *in vitro*. Egy negatív eredmény azt jelenti, hogy a tesztanyag az adott kísérleti körülmények között nem indukál olyan DNS károsodást, ami ezzel a teszttel kimutatható.

Állást kell foglalni abban a kérdésben, hogy a tesztanyag vagy metabolitjai bekerülhettek-e a vérkeringésbe, és specifikusan elérték-e a célszövetet (pl. szisztémás toxicitás).

3. JELENTÉSKÉSZÍTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Tesztanyag, oldószer/vivőanyag:

– tesztanyag azonosítására szolgáló adatok, halmazállapot, releváns fiziko-kémiai adatok, ha vannak és tisztaság, ha ismert,

- a vivőanyag kiválasztásának indoklása,
- a tesztanyag oldékonysága és stabilitása az oldószerben/vivőanyagban, ha ismert.

Kísérleti állatok:

- a felhasznált faj és törzs,
- az állatok száma, életkora és neme,
- származás, tartási körülmények, táp stb.,
- az állatok egyedi testsúlya a kísérlet indításakor, beleértve a testsúlytartományokat, átlagokat és standard deviációkat minden egyes csoportra.

Kísérleti körülmények:

- pozitív és negatív (oldószer/vivőanyag) kontrollok,
- a dóziskereső kísérletre vonatkozó adatok, ha történt,
- a dózisszint választás magyarázata,
- a tesztanyag kezeléshez történő előkészítésének a részletei,
- a tesztanyag beadásának a részletei,
- az adás módjának magyarázata,
- amennyiben lehetséges, azoknak a módszereknek a megadása, amelyekkel igazolható, hogy a tesztanyag bejutott a keringésbe, vagy elérte a célszövetet,
- tesztanyagnak a tápban vagy az ivóvízben beállított koncentrációjának (ppm) átszámítása az aktuális dózisra (mg/ts kg/nap),
- a táp és a víz minőségének részletei,
- a kezelés és a mintavétel rendjének részletes ismertetése,
- a toxicitás megállapítására szolgáló módszerek,
- májsejtek izolálásának és tenyésztésének módszere,

- az alkalmazott autoradiográfias technika,
- az elkészített lemezek és a leszámolt sejtek száma,
- az értékelés kritériumai,
- a negatív, pozitív és bizonytalan eredmények kritériumai.

Eredmények:

- lemezenkénti, állatonkénti és csoportonkénti sejtmagi és citoplazmai szemcseszám átlagok, nettó sejtmagi szemcseszám átlagok,
- dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,
- az alkalmazott statisztikai módszerek, ha voltak,
- toxikus tünetek,
- egyidejű negatív (oldószer/vivőanyag) és pozitív kontroll adatok,
- historikus negatív és pozitív kontroll adatok, a tartományokkal, átlagokkal és a standard deviációkkal,
- reparálódó sejtek száma, ha meghatározták,
- S-fázisú sejtek száma, ha meghatározták,
- a sejtek életképessége.

Az eredmények megbeszélése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Ashby, J. Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 156, pp.1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), *In Vivo* Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEMS 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.

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J. Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*, *Mutation Res.*, 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl. C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ. Mutagen*, 4, pp. 553-562.

B.40. BŐRKORRÓZIÓ

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Az Európai Bizottság Egyesült Kutató Központja (1) (2) (3), az Alternatív Módszerek Validálására alakult Európai Központ (EVCAM) a bőrkorrózió vizsgálatára két *in vitro* módszert, a transzkután elektromos rezisztencia (TER) vizsgálatot patkánybőrön és az emberi bőrt modellanyagként alkalmazó módszert ismert el tudományosan igazoltnak. Az EVCAM hitelességet vizsgáló tanulmányának kimutatása szerint mindkét módszer alkalmas arra, hogy az ismert bőrkorróziót kiváltó és nem-korrózív anyagok között megbízhatóan különbséget tegyen. Továbbá, az emberi bőrmoddellen alapuló vizsgálat pontos megkülönböztetést tesz lehetővé a korrózív hatás fokozatai között (ismert, kifejezett bőrkorróziót okozó anyagok, R 35 és más bőrkorróziót kiváltó anyagok R 34) (2). Mindkét módszernél megadják a vizsgálati eljárást: a módszer kiválasztása a speciális igényektől és a felhasználó döntésétől függ.

Lásd: az „Általános Bevezetésnél is”

1.2. Fogalommeghatározások

Bőrkorrozíó: a vizsgálandó anyag által a bőr szöveteinek irreverzibilis károsodását okozó hatás.

1.3. Referencia anyagok

Nincs meghatározva, de lásd az 1.5.3.4. és 1.7.2.3. pontokat.

1.4. A vizsgáló módszer alapelve – TER próba patkánybőrön

A vizsgálandó anyagot 24 óra időtartamra kéméletes módon megölt fiatal patkányok bőréből kivágott bőrkorongok epidermális felszínére helyezjük. Azokat az anyagokat nevezzük korrozívnak, melyek képesek a stratum corneum integritásának és barrier funkciójának elvesztését okozni, ez, egy bizonyos küszöbhatár érték alatt (5 kOhm), az inherens TER módszerrel mérhető (4) (5). Irritatív és nem irritatív anyagok a küszöbszint alatt nem csökkentik a TER-t. Felületaktív és neutrális szerves anyagok [a fogalommeghatározást lásd a (6) hivatkozásnál] vizsgálatánál a vizsgáló módszerbe egy festékmegkötéses lépés iktatható be, melynek célja, hogy a speciálisan ezeknél a vegyi anyagoknál előforduló hamis pozitív eredmények számát csökkentse (2) (7).

1.5. A vizsgálat leírása – TER próba patkánybőrön

1.5.1. Állatok

A bőrkorongok elkészítéséhez fiatal 20–23 napos (Wistar vagy hasonló törzsből) patkányok szükségesek. A háton és a törzsön a szőrt kisméretű, állatok részére készült nyírógéppel gondosan el kell távolítani. Az állatokat ezután óvatosan törölgetve megmossuk úgy, hogy a lenyírt területet antibiotikumot (pl. sztreptomicint, penicillint, kloramfenikolt és amfotericint, baktériumok növekedését gátló koncentrációban) tartalmazó oldatba mártjuk.

Az első mosást követően a harmadik és negyedik napon is lemosás következik, ezután az állatokat 3 napon belül felhasználjuk (az állatok ne legyenek 31 napnál idősebbek).

1.5.2. A bőrkorongok készítése

Az állatokat kéméletes módszerrel extermináljuk. Az egyes állatok hátán a bőrt leválasztjuk, majd a bőrről óvatosan lefejtjük a felesleges zsírt. A bőrt egy politetrafluoretilén (PTFE) cső végéhez illesztjük, biztosítva, hogy az epidermális felület a csővel érintkezzen. A bőrt ezután, egy „O” alakú gumigyűrű segítségével a cső végére erősítjük. A felesleges szövetet levágjuk. A cső és az „O” gumigyűrű méretei az 1. ábrán láthatóak. Az „O” gumigyűrűt ezután petróleum zselével a PTFE cső végéhez ragasztjuk. A csövet egy rugós csipesszel erősítjük be a magnézium szulfát oldatot (154 mM) tartalmazó befogadó kamrába (2. ábra).

1.5.3. Vizsgálati eljárás

1.5.3.1. A vizsgálati anyag elhelyezése

A folyékony vizsgálati anyagokat (150 µl) a csőben az epidermális felszínre helyezjük (2. ábra). Szilárd anyagoknál elegendő mennyiséget kell a korongra helyezni, hogy az a bőr teljes felületét befedje. Ezután ionmentesített vizet (150 µl) adagolunk a szilárd anyagra, és a csövet enyhén mozgatjuk. A vizsgálati anyagnak a lehető legjobban kell érintkeznie a bőrrrel. Ennek elérése érdekében néhány szilárd anyagnál a 30 °C-ra történő felmelegítés révén az olvadás, vagy szemcsés anyagnál a porrá őrlés segíthet.

Minden vizsgálati anyaghoz három bőrkorongot kell használni. A vizsgálati anyagot 24 órán át kell alkalmazni (lásd még: 1.5.3.4.). A vizsgálati anyagot 30 °C hőmérsékletű csapvíz-sugárral addig mossuk, amíg az összes bőrön lévő anyagot el nem távolítottuk. A csőbe bekeményedett anyagot kb. 30 °C hőmérsékletű meleg vízzel távolíthatjuk el.

1.5.3.2. TER mérések

A TER mérése kis feszültségű, váltakozó árammal működő mérőszköz (databridge) használatával történik (pl. AIM 401, vagy 6401, vagy ennek megfelelő). Az elektromos ellenállás mérése előtt a bőr felületi feszültségének csökkentésére az epidermisre a bőrfelületet befedő mennyiségű 70%-os etanolt adagolunk. Néhány perc múlva az etanolt a cső megfordításával eltávolítjuk és a szövetet 3 ml magnézium szulfát oldattal (154 mM) hidratáljuk. A mérőszköz (databridge) elektródjait a bőr két oldalára helyezjük és a bőrkorong ellenállását kOhm/ bőrkorongban megmérjük (2. ábra). Az elektródok méretei és a krokodil csipesz alatti elektród hossza az 1. ábrán látható. Az első (vastag) elektród csipesz a PTFE cső tetején nyugszik az ellenállás mérés alatt, a magnézium szulfát oldatba merülő elektród hossza legyen mindig egyforma. A külső (vékony) elektródot a befogadó kamrába helyezjük, úgy, hogy az a kamra alján fekdjön. A rugós csipesz alja és a PTFE cső alja legyen állandó távolságra egymástól (1. ábra), mivel az a távolság a mért rezisztencia értéket befolyásolja.

Figyelni kell arra, hogyha a mért rezisztencia érték nagyobb, mint 20 kOhm, akkor ez a bőrkorong epidermális felületét borító tesztanyag miatt van. Ilyenkor meg lehet kísérelni a tesztanyag eltávolítását, például úgy, hogy a PTFE csövet egy hüvelykujjal (kesztyűben) elzárva 10 másodpercig rázzuk, a magnézium szulfát oldatot elöntjük, és a rezisztencia mérést friss oldattal megismételjük.

Az átlagos TER eredményeket akkor fogadhatjuk el, ha az egyidejű pozitív és negatív kontroll értékek a módszer elfogadható tartományába esnek. A javasolt kontroll anyagok és ezek megfelelő, elfogadható ellenállás tartományai ennél a módszertannál és készüléknél az alábbiak:

Kontroll	Anyag	Ellenállás tartomány kiloohm
Pozitív	10 M sósav (36%)	0,5–1,0
Negatív	Desztillált víz	10–25

1.5.3.3. Módosított eljárás felületaktív és neutrális szerves vegyületek vizsgálatára

Ha a vizsgálati anyag felületaktív, vagy neutrális szerves vegyület és a TER értékei kisebbek vagy egyenlők 5 kiloohmnál akkor a szöveteken festék penetrációs vizsgálatot lehet végezni. Ezzel az eljárással eldönthető az eredmények hamis pozitivitása (2).

1.5.3.3.1. Szulforodamin B festék használata és eltávolítása

A vizsgálati anyaggal történő kezelést követően a bőrkorongok felületére, két órányi időtartamra, 150 µl desztillált vízzel 10%-osra hígított (w/v) szulforodamin B festéket helyezünk. A bőrkorongokat ezután szobahőmérsékleten csapvíz sugárral 10 másodpercen keresztül mossuk, hogy minden felesleges, nem-kötődött maradék festéket a bőrről eltávolítsunk. Ezután minden bőrkorongot óvatosan leveszünk a PTFE csőről és 8 ml ionmentesített vizet tartalmazó csőbe teszünk (pl. egy 20 ml-es üveg scintillációs cső), a csöveket 5 percig kíméletesen rázzuk, hogy a meg nem kötött/feleslegben lévő festéket eltávolítsuk. Az öblítést megismételjük, majd a bőrkorongokat 5 ml desztillált vízzel hígított 30%-os (w/v) nátrium dodecil szulfátot (SDS) tartalmazó csövekbe helyezük éjszakára, 60 °C hőmérsékleten. Inkubálás után a bőrkorongokat eltávolítjuk. A visszamaradó oldatot 8 percig 21 °C-on centrifugáljuk (a relatív centrifugális erő kb. 175). A felülúszó 1 ml-es mintáját 1:5-höz hígítjuk (v/v) (vagyis: 1 ml + 4 ml) desztillált vízzel készített 30%-os (w/v) SDS-el. Az oldat optikai denzitása (OD) 565 nm-hez közel mérhető.

1.5.3.3.2. A festéktartalom kiszámítása

A korongok szulforodamin B festéktartalma az OD értékekből számítható (a szulforodamin B festék moláris extinkciós koefficiense 565 nm-en = $8,7 \times 10^4$; molekulatömege = 580). Minden bőrkorongra meg kell határozni a szulforodamin B festéktartalmat és a párhuzamosokból átlag festéktartalmat kell számolni. A festékkötés átlagos eredményeit akkor lehet elfogadni, ha az egyidőben mért kontroll értékek a módszer elfogadható tartományába esnek. Az ezzel a módszerrel és berendezéssel vizsgált kontroll anyagoknál a javasolt elfogadható festéktartalom tartományok az alábbiak:

Kontroll	Anyag	Festéktartalom tartománya (µg/korong)
Pozitív	10 M sósav (36%)	40–100
Negatív	Desztillált víz	15–35

1.5.3.4. További információ

Az erősen korrozív anyagok azonosítására a vizsgálati anyagot rövidebb időtartamra is lehet a bőrkorongokra helyezni (pl. két óra hosszan). A hitelesítési vizsgálatok szerint azonban a TER vizsgálatról kiderült, hogy kétórás expozíciónál néhány vegyi anyag korrozív képessége túlbecsülhető (2), ugyanakkor, a 24 órás alkalmazás már lehetővé teszi a korrozív és nem korrozív anyagok pontos elkülönítését.

A vizsgálati berendezés sajátságai és méretei, valamint a kísérleti eljárás befolyásolhatják a kapott TER értékeket. Az 5 kiloohmos korrozív küszöbértéket az itt leírt speciális műszer adatai alapján adtuk meg. Más kontroll és küszöbértékeket kell meghatározni, ha a berendezés jellemzői jelentősen eltérnek az itt megadott adatoktól.

Ezért ajánlott, hogy a módszertant és az ellenállási küszöbértéket egy sor – a hitelesítési vizsgálatban (3) – referencia standard anyag vizsgálatával kalibrálják.

1.6. A vizsgálati módszer alapelve – humán bőrpróba

A vizsgálati anyagot 4 óra időtartamra egy háromdimenziós humán bőrmódelre helyezik, amely funkcionális stratum corneummal rendelkező rekonstruált epidermiszből áll. A korrozív anyagokat a sejtek életképességének csökkenését előidéző tulajdonságuk alapján azonosítják úgy, hogy az anyagokat egy bizonyos küszöbhatár alatt, megadott expozíciós ideig alkalmazzák. A vizsgálat alapelve megegyezik azzal a hipotézissel, hogy azok az anyagok nevezendők korrozívoknak, amelyek (diffúzióval vagy eróziós hatás révén) képesek áthatolni a stratum corneumon és eléggé citotoxikusak ahhoz, hogy a mélyebben fekvő sejtrétegekben sejtpusztulást okozzanak.

1.7. A vizsgálati módszer leírása – humán bőrpróba

1.7.1. Humán bőrmodellek

A humán bőrmodellek különböző forrásból származhatnak, de bizonyos követelményeknek meg kell, hogy feleljenek. A modellnek rendelkeznie kell működő stratum corneummal és az alatta lévő élő sejtréteggel. A stratum corneum barrier funkciója megfelelő kell, hogy legyen. Ez kimutatható úgy, hogy a modell citotoxikus anyagokkal szembeni ellenállását ismert, olyan citotoxikus anyagokkal vizsgálják, amelyek normális esetben nem hatolnak át a stratum corneumon. Fontos, hogy a modell segítségével meghatározott kísérleti feltételek között reprodukálható eredményeket lehessen kapni.

A sejteknek elég életképesnek kell lenniük ahhoz, hogy a pozitív és negatív kontroll anyagokat jól meg lehessen egymástól különböztetni. A sejtek életképességét mérő értékeknek (amit pl. az MTT redukcióval vagyis egy OD értékkel mérnek) negatív kontroll anyaggal történő expozíció után az adott modellre érvényes elfogadható határok közé kell esnie. Hasonlóan, a sejtek életképességét mérő értékeknek pozitív kontroll anyaggal történő expozíció után is (a negatív kontroll anyagokkal kapott értékekhez viszonyítva) megadott határok közé kell esni. Igen fontos, hogy az alkalmazott modell a nemzetközileg hitelesített szabványnak megfelelően (2).

1.7.2. A vizsgálati eljárás

1.7.2.1. A tesztanyag alkalmazása

Folyékony anyagoknál elegendő anyagot kell használni, hogy az beborítsa a bőr felszínét (minimum 25 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ -t). Szilárd anyagoknál a vizsgálati anyagot úgy kell alkalmazni, hogy befedje a bőrt, majd meg kell nedvesíteni, hogy jól érintkezzen a bőrrel; ahol szükséges, a szilárd anyagot felhelyezés előtt porrá kell őrölni. A módszer legyen alkalmas a lehető legtöbb vegyi anyag típus vizsgálatára (2). Az expozíciós időszak végén a tesztanyagot a bőr felületéről fiziológiás sóoldattal gondosan le kell mosni.

1.7.2.2. A sejtek életképességének vizsgálata

A sejtek életképességének vizsgálatára bármely hitelesített módszer használható. Leggyakrabban az MTT redukciót alkalmazzák, amelyről kimutatták, hogy különböző laboratóriumokban pontos és reprodukálható eredményeket ad (2). A bőrkorongot 3 órára 20–28 °C mellett egy 0,3 mg/ml-es MTT oldatba helyezik. A kicsapódott kék formazán terméket kivonják (oldószeres extrakció) és a formazan koncentrációt az 545 és 595 nm-es hullámhosszon meghatározott OD-sal mérik.

1.7.2.3. További információ

A sejt életképesség vizsgálatának eredményeit az alkalmazott bőrmodell típusa és az expozíció, a mosás stb. folyamatai nagymértékben befolyásolják. Ezért ajánlott, hogy a módszert és az ellenállási küszöbértéket egy sor olyan referencia standard anyag vizsgálatával kalibrálják, melyeket az ECVAM hitelesítési eljárásához választottak ki (3). Igen fontos, hogy az alkalmazott módszer a nemzetközi normáknak megfelelően laboratóriumokon belül és különböző laboratóriumok között összehasonlítva is számos vegyületcsoporthoz tartozó anyagon reprodukálható eredményeket adjon (2). Minimális követelmény, hogy a módszer feleljen meg a korábban meghatározott tudományos hitelességnek (2) és egy ilyen hitelességi vizsgálat eredményei szakmai elbírálást követően tudományos folyóiratban jelenjenek meg.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények feldolgozása

2.1.1. TER vizsgálat patkánybőrön

A vizsgálati anyagokról kapott rezisztencia értékeket (kiloohm), a pozitív és negatív kontrollokat, minden standard referencia értéket táblázatos formában kell megadni úgy, hogy abban a paralelek, az ismételt kísérletek, az átlagértékek és az ezekből származó besorolás is szerepeljenek.

2.1.2. Vizsgálat humán bőrmodellel

A vizsgálati anyagokról kapott OD értékeket, a számított százalékos sejt életképességre vonatkozó adatokat és minden standard referencia értéket táblázatos formában kell megadni úgy, hogy abban a paralelek, az ismételt kísérletek, az átlagértékek és az ezekből származó besorolás is szerepeljenek.

2.2. Az eredmények értékelése és értelmezése

2.2.1. TER vizsgálat patkánybőrön

Azokkal a felületaktív anyagokkal és neutrális szerves vegyi anyagokkal, melyek TER értékei kisebbek mint 5 kiloohm, vagy egyenlők 5 kiloohmmal, festék penetrációs vizsgálatot lehet végezni.

Ha a bőrkorong átlagos festéktartalma nagyobb, vagy egyenlő az egyidőben mért 36%-os HCL-val exponált bőrkorongok átlagos festéktartalmánál, akkor a vizsgálati anyag valódi pozitív kontroll, tehát korrozív. Ha az átlagos festéktartalom kisebb, mint az egyidőben mért 36%-os HCL-val pozitív kontroll értéke, akkor a vizsgálati anyag hamis pozitív kontroll, tehát nem korrozív.

2.2.2. Vizsgálat humán bőrmodellen

A negatív kontrollra vonatkozó OD érték a sejtek 100%-os életképességét jelenti, ezért az egyes anyagokra kapott OD értékeket fel lehet használni a negatív kontrollhoz viszonyított százalékos életképesség kiszámításához. Az életképességnek azt a határértékét (cut-off value), amelynek alapján a korrozív és nem-korrozív anyagokat megkülönböztetik egymástól, az előrejelző modellben világosan meg kell adni, mielőtt a módszert hitelesítik, a hitelesítés során ki kell mutatni, hogy a határérték megfelelő (2).

3. JELENTÉS

Vizsgálati jelentés

Vizsgálati anyag:

– azonosítási adatok, fizikai, ahol szükséges, fizikai-kémiai tulajdonságok. Ha referencia anyagokat használnak, azok tulajdonságait is meg kell adni.

Vizsgálati körülmények:

- a vizsgálat eljárás részletezése,
- bármilyen módosítás leírása és indoklása.

Eredmények:

– táblázatosan kell megadni a vizsgálati anyagra, a pozitív és negatív kontrollokra vonatkozó ellenállás értékeket (TER vizsgálat), az életképes sejtek százalékos arányát (vizsgálat emberi bőr modellen), és minden standard referencia anyagot, beleértve a paralelek és ismételt kísérletek adatait, átlagértékeit is,

- minden egyéb megfigyelt hatás leírása.

Az eredmények megvitatása.

Következtetések.

4. IRODALOM

(1) ECVAM (1998), ECVAM News 8 Views, ATLA 26, pp. 275-280

(2) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. & 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.

(3) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals, Toxicology *in Vitro* 12, pp. 471-482.

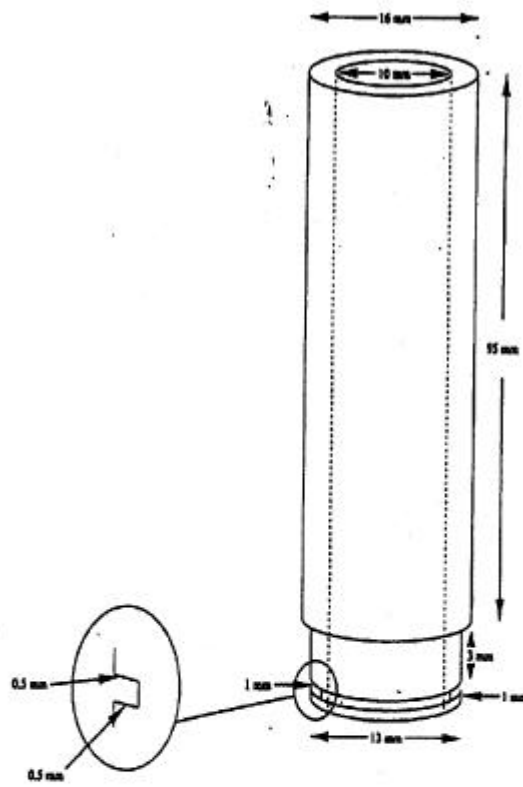
(4) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986), An *in vitro* skin corrosivity test – modifications and validation, Food & Chemical Toxicology 24, pp. 507-512.

(5) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992), The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial, Toxicology *in Vitro* 6, pp. 191-194.

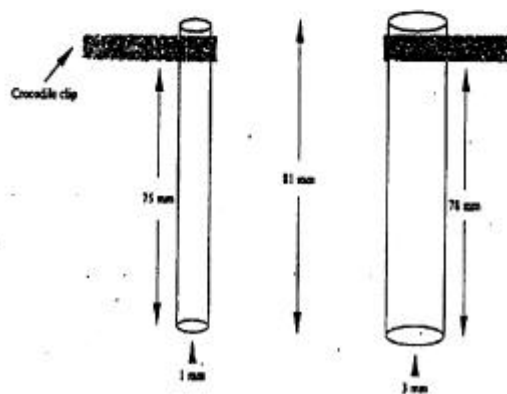
(6) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K. Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998), An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion, ATLA 26, pp. 709-720.

(7) 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. & Balls, M. (1995), A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6, ATLA 23, pp. 219-255.

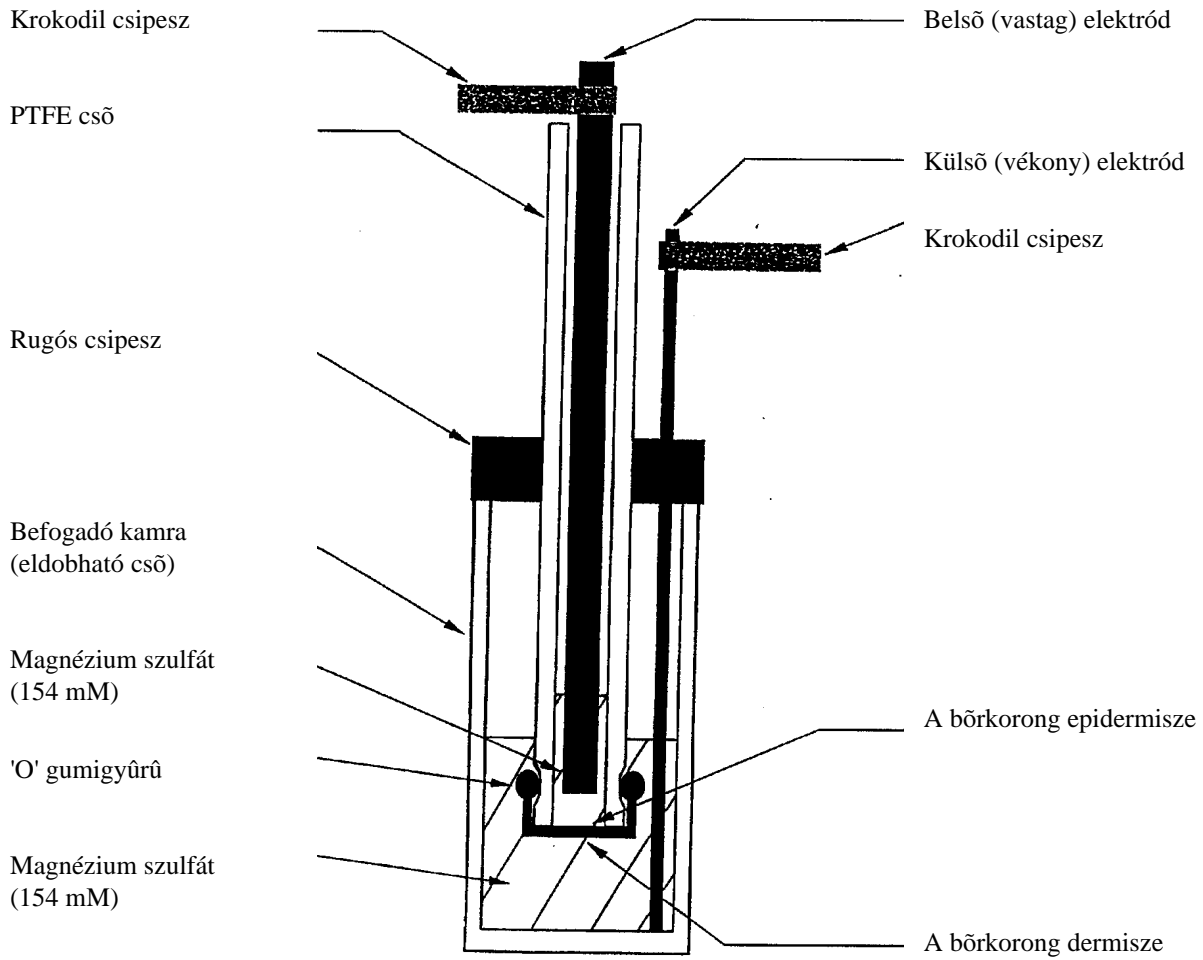
A bőrkorróziós vizsgálatához tartozó két ábra és szöveges értelmezése:



Electrode dimensions



1. ábra
A PTFE cső méretei



2. ábra
A bőr TER vizsgálatára alkalmas berendezés

B.41. FOTOTOXICITÁS – *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOXICITÁS PRÓBA**1. MÓDSZER****1.1. Bevezetés**

A fototoxicitás a bőrnek olyan reakciója, amelyet a bőrnek egyes vegyi anyagokkal először történő expozíciója, majd a bőrnek ezt követően fénnel történő expozíciója válthat ki, vagy amelyet vegyi anyaggal történő szisztémás kezelés és azt követően a bőr besugárzása válthat ki.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálatból származó információ arra szolgál, hogy a vizsgálati anyag fototoxikus képességét megismerjük, vagyis annak a lehetséges veszélynek a fennállását, amit a vizsgálati anyaggal és UV vagy látható fénnel történő együttes expozíció jelenthet.

Mivel az *in vitro* vizsgálat végpontja a kémiai anyag és a fény együttes hatása által kiváltott fototoxicitás meghatározása, azok az anyagok, melyek szisztémás alkalmazás után a bőrbe jutnak ugyanúgy meghatározhatók a módszerrel, mint azok, amelyek helyi alkalmazás után hatnak, mint fotoirritánsok.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás próbát egy 1992–1997-ig (1) (2) (3) tartó EU/COLIPA kutatási együttműködésben fejlesztették ki és hitelesítették, hogy a használatban lévő *in vivo* módszerek alternatívájaként hiteles *in vitro* vizsgálat is rendelkezésre álljon. 1996-ban egy OECD munkabizottság javasolt egy lépcsőzetes (tier) *in vitro* vizsgálatot (4).

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás próba eredményeit összehasonlították az állatokon és embereken kapott *in vivo* végzett fototoxicitási/fotoirritációs vizsgálati eredményekkel és az *in vitro* vizsgálat kiváló előrejelző módszernek bizonyult. A vizsgálatot nem arra tervezték, hogy a vegyi anyag és fény együttes olyan ártalmas hatásait is megjósolja, mint a fotogenotoxicitás, a fotoallergia és a fotokarcinogenitás, annak ellenére, hogy számos ilyen hatással rendelkező anyag az *in vitro* +T+ NRU fototoxicitás próbában pozitívnak bizonyul. A vizsgálat nem használható a fototoxikus hatás erősségének a meghatározására.

A vegyi anyagok fototoxikus hatása vizsgálatának egymást követő lépései a Függelékben találhatóak.

1.2. Fogalommeghatározások

Irradiáció: egy felületre eső ibolyántúli (UV) vagy látható fényintenzitás amit W/m^2 -ben, vagy mW/m^2 -ben mérenek.

Fénydózis: egy felületre eső ibolyántúli (UV) vagy látható fény mennyiség (= intenzitás \times idő), amit Joule (= $W \times s$) per felületegységben pl. J/m^2 , vagy J/cm^2 -ben fejeznek ki.

UV fény hullámsávok: a CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) által ajánlott jelölések következők: UVA (315–400 nm), AVB (280–315 nm) and UVC (100–280 nm). Más jelöléseket is lehet használni: az UVA és UVB elválasztását gyakran 320 nm-re teszik és az UVA-t fel lehet osztani UV-A1-re és UV-A2-re, az elválás 340 nm-re esik.

A sejtek életképessége: a sejtpopuláció összaktivitását mérő paraméter (pl. neutrálvörös vitális festék felvételével), mely az alkalmazott vizsgálati elrendezésben mért végponttól függ és korrelál a sejtek számával és/vagy vitalitásával.

A sejtek relatív életképessége: a sejtek életképessége a negatív kontrollokhoz viszonyítva, e sejteket végigviszik az egész vizsgálaton (vagy +UV vagy –UV), de nem kezelik a vizsgálatban használt vegyi anyaggal.

Az előrejelzés modellje: egy algoritmus, amelynek segítségével a toxicitási próba eredményeiből a toxikus hatás előrejelezhető. A jelen vizsgálat iránymutatói szerint PIF és MPE alkalmazható arra, hogy az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás vizsgálat eredményeit transzformálva a fototoxikus hatás előrejelezhető legyen.

PIF (fotoirritációs tényező): olyan tényező, melyet a vizsgált vegyi anyag két egyformán hatásos koncentrációjának (EC_{50}) összehasonlításával kapunk nem citotoxikus UVA/látható fénnel történő besugárzás nélkül (–UV) és annak jelenlétében (+UV).

MPE (átlagos fényhatás): olyan új mérték, melyet két koncentráció-válasz görbe teljes alakjának matematikai elemzésével nyerünk egy nem citotoxikus UVA/látható fénnel történő besugárzás nélkül (–UV) és annak jelenlétében (+UV).

Fototoxicitás: olyan válasz, amelyet a bőrnek egyes vegyi anyagokkal először történő expozíciója, majd a bőrnek ezt követően fénnel történő expozíciója válthat ki, vagy amelyet vegyi anyaggal történő szisztémás kezelés és azt követően a bőr besugárzása válthat ki.

Fotoirritáció: egy, a „fototoxicitás” alá tartozó kifejezés, mely csak azokra a fototoxikus reakciókra vonatkozik, amelyeket a bőrön vegyi anyagok (helyileg vagy orálisan) váltanak ki. E fototoxikus reakciók minden esetben nem-specifikus sejtkárosodáshoz vezetnek (leégésszerű reakciók).

Fotoallergia: szerzett immunológiai válaszkészség, mely nem a vegyi anyaggal és fénnel történő első találkozásnál jön létre, a bőrreakció csak egy- vagy kéthetes indukciós időszak után mutatható ki.

Fotogenotoxicitás: olyan genetikai végponttal kimutatható genotoxikus válasz, amelyet a sejteknek nem-genotoxikus dózisz UV/látható fényvel történő besugárzása és egy nem-genotoxikus vegyi anyaggal történő expozíció ad.

Fotokarcinogenitás: olyan karcinogén hatás, amelyet fény és vegyi anyag ismételt alkalmazásával idézünk elő. A „foto-ko-karcinogenezis” kifejezést akkor használjuk, ha az UV fény tumorkeltő hatását a vegyi anyag fokozza.

1.3. Referencia anyagok

Amellett, hogy a klórpromazint minden meghatározáshoz pozitív kontrollként kell használni, egy újonnan kialakított vizsgálat esetén, mint amilyen a 3T3 NRU fototoxicitás próba, ajánlott, hogy olyan referencia anyagcsoportot is használjanak, amelyet a jelen vizsgálat laboratóriumok közötti méréseinek összehasonlításakor használnak (1) (3) (13).

1.4. Bevezető gondolatok

A vegyi anyagok több típusáról tudjuk, hogy fototoxikus hatással rendelkeznek (5) (6) (7) (8). Ezek egyetlen közös vonása, hogy a napfény hullámhosszának tartományában képesek fényenergiát abszorbeálni. A fotokémia első törvénye szerint (Grotthaus–Graper törvény) a fotoreakcióhoz elegendő fény mennyiségek abszorpciója szükséges. Ezért a biológiai vizsgálat előtt a jelen vizsgálatra vonatkozó útmutató szerint figyelembe kell venni, hogy a tesztanyag UV/látható fény abszorpció spektrumát meghatározzák (pl. az OECD 101 iránymutató szerint). Ha a moláris extinkció/abszorpció koefficiens kisebb, mint $10 \text{ liter} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, a vegyi anyagnak nincs fotoreaktív hatása és nem kell az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás próbával, vagy bármely más ártalmas fotokémiai hatást elemző biológiai módszerrel vizsgálni (Függelék).

1.5. A vizsgálati módszer elve

Négy olyan mechanizmust ismerünk, amelyek révén egy (kémiai) kromofór fényabszorpciója fototoxikus válaszhoz vezethet (7). Mindegyik esetben sejtkárosodás alakul ki. Ezért az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás próba összehasonlítja, milyen egy vegyi anyag citotoxikus hatása nem-toxikus UVA/látható fény-dózissal történő expozícióval, vagy anélkül. E módszernél a citotoxicitást, mint a vitális neutrálvörös festék (NR) felvételének a koncentrációtól függő csökkenését fejezik ki (9) 24 órával a kémiai anyaggal és besugárzással történő kezelés után.

Balb/c 3T3 sejteket 24 órán át tenyésztene az egysejt-réteg kialakulásáig. Anyagonként két 96-titeres tenyésztőlemez egy órán át a kémiai anyag nyolc különböző koncentrációjával inkubálnak. Ezután az egyik edényt egy nem-toxikus, azaz 5 J/cm^2 UVA (+UV kísérlet) UVA/látható fénydózissal exponálnak, míg a többi lemezt sötétben tartják (–UV kísérlet). Mindkét lemezen a kezelő médiumot tápoldatra cserélik és a következő 24 órás inkubáció után a neutrálvörös (NRU) 3 órás felvételével meghatározzák a sejtek életképességét. A sejtek relatív életképessége, ami a kezeletlen negatív kontrollok százalékában fejezhető ki, mind a nyolc tesztben szereplő koncentrációra kiszámítandó.

A fototoxikus hatást úgy adjuk meg, hogy a koncentrációtól függő válaszokat, melyeket UV jelenlétében (+UV) és UV nélkül (–UV) kaptunk, az EC_{50} szintjén, vagyis annál a koncentrációnál, amely a kezeletlen kontrollok 50%-nál a sejtek életképességét csökkenti, összehasonlítjuk.

1.6. Minőségi kritériumok

A sejtek érzékenysége UVA sugárzásra, történelmi adatok: a sejtek UVA sugarakkal szembeni érzékenységét rendszeresen ellenőrizni kell. A sejteket az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás próbában megadott sejtkoncentrációban a tenyésztőedényekbe kell helyezni, a következő napon a sejteket $1\text{--}9 \text{ J/cm}^2$ dózissal be kell sugározni, majd egy nappal később az NRU vizsgálattal meg kell határozni a sejtek életképességét. A sejtek akkor felelnek meg a minőségi előírásoknak, ha 5 J/cm^2 -el történő besugárzás után a sejtek életképessége nem alacsonyabb, mint a sötétben tartott kontroll sejteknél talált életképesség 80%-a. A 9 J/cm^2 -es legnagyobb UVA dózisonál, az életképesség ne legyen kisebb, mint a sötétben tartott kontroll sejtek életképességének 50%-a. Ezt az ellenőrzést minden 10. sejtpasszálsáznál meg kell ismételni.

A negatív kontroll sejtek UVA sugárzással szembeni érzékenysége, a jelen próba: a vizsgálat akkor felel meg a minőségi követelményeknek, ha a negatív kontrollok [a sejtek tápoldata „Earl's balanced salt solution” (EBBS) azaz az Earl-féle kiegyensúlyozott sóoldat 1% dimetilszulfoxiddal (DMSO) vagy 1% etanollal (EtOH) és azok nélkül] életképessége az UVA kísérletben nem bizonyul kisebbnek, mint a be nem sugárzott sejtek életképességének 80%-a, ugyanabban az oldószerben vizsgálva, mint amit az egyidejűleg végzett kísérletben, a sötétben tartott sejtekhez használtak (–UVA).

Negatív kontrollok életképessége: a negatív kontrollok NR extraktumában mért abszolút OD ($OD_{540 \text{ NRU}}$) megmutatja, hogy a tenyésztőlemez egy-egy lyukába kihelyezett 1×10^4 számú sejt normális idő alatt megduplázódott-e a vizsgálat két napja alatt. A próba elfogadásának kritériuma, hogy a kezeletlen kontroll sejtek átlagos $OD_{540 \text{ NRU}}$ értéke nagyobb, vagy egyenlő legyen (\geq) mint 0.2.

Pozitív kontroll: minden *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitási próbával egyidőben egy ismert fototoxikus vegyi anyagot is vizsgálni kell. Az EU/COLIPA hitelesítés során klórpromazint (CPZ) használtak, ezért ennek használata javasolt. A következő kritériumokat határozták meg az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitási próba standard vizsgálati

előírásai szerint a CPZ-vel végzett vizsgálatra: CPZ besugárzott (+UVA): $EC_{50} = 0,1$ -től $2,0 \mu\text{g/ml}$, CPZ nem besugárzott (-UVA): $EC_{50} = 7$ -től $90 \mu\text{g/ml}$. A fotoirradiációs faktor, vagyis az EC_{50} eltolódása legalább 6 legyen.

CPZ helyett egyidejű pozitív kontrollként az éppen vizsgált anyaggal azonos kémiai osztályban lévő és hasonló oldékonyságot mutató anyagok is szolgálhatnak. Ezek elfogadásához azonban, történelmi adatokra támaszkodva az EC_{50} -értékek tartományát és a PIF vagy MPE (átlagos fény hatás) értékeket is megfelelően meg kell határozni.

1.7. A vizsgálati módszer leírása

1.7.1. Előkészületek

1.7.1.1. Sejt k

A hitelesítés során egy permanens egér fibroblaszt sejtvonalat – az ATCC-ből vagy az ECACC-ből a Balb/c 3T3, 31-es klónt – használtak, ezért ezt ajánljuk. Ha a tenyésztési feltételeket a sejtek speciális igényéhez adaptálják, ugyanaz a vizsgálati eljárás más sejtvonalaknál is sikerrel használható, azonban ezt le kell írni.

Rendszeresen ellenőrizni kell, hogy a sejtek mikoplazmával nem fertőzöttek-e, és csak kielégítő eredmény után szabad őket felhasználni.

Mínthogy a passzázsok számának emelkedésével a sejtek UV érzékenysége nő, olyan Balb/c 3T3 sejteket kell használni, amelyeknél a lehető legkisebb volt a passzázsok száma, lehetőleg kevesebb, mint 100. Igen fontos, hogy a Balb/c 3T3 sejtek UVA-érzékenységét rendszeresen, az itt leírt minőségellenőrzési folyamat előírásai szerint ellenőrizzék.

1.7.1.2. Tenyésztő oldatok és tenyésztési feltételek

A rutin sejtpasszázs és a vizsgálat ideje alatt megfelelő tenyésztő oldatot és inkubációs feltételeket kell biztosítani. Balb/c 3T3 sejteknél ez 10% újszülött borjú szérummal, 4 mM glutaminnal, penicillinnel és streptomiccinnel kiegészített DMEM, valamint megfelelő páratartalom melletti inkubáció ($37 \text{ }^\circ\text{C}/7,5\% \text{ CO}_2$). Különösen fontos, hogy a sejtenyésztés feltételei biztosítsák az alkalmazott sejtvonal sejtciklusára történelmileg jellemző időtartamot.

1.7.1.3. A tenyészetek készítése

Fagyasztott sejtkultúra állományból kell a sejteket a kultúrához megfelelő sejtsűrűséggel telepíteni, majd, egy szubkultúrával próbatenyésztést kell végezni, mielőtt a sejteket az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás próbához felhasználnánk.

A fototoxicitási próbához a sejteket olyan koncentrációban telepítjük a tenyésztőfolyadékba, hogy a kialakuló sejtréteg ne legyen teljesen összefüggő a vizsgálat végére, vagyis, amikor 48 órával a telepítés után a sejt-életképességet meghatározzuk. A Balb/c 3T3 sejteknél, ha 96-titeres lemezzel dolgozunk, az ajánlott sejtsűrűség 1×10^4 sejt/titer.

A sejteket minden tesztanyagnál egyformán telepítjük két 96-titeres lemezre külön, melyeket együtt viszünk végig a teljes vizsgálati folyamaton, azonos tenyésztési körülményeket biztosítva, kivéve azt az időszakot, amikor az egyik lemezt besugározzuk (+UVA) és a másikat sötétben tartjuk (-UVA/látható fény).

1.7.1.4. Metabolikus aktiválás

Míg a metabolizáló rendszer alkalmazása minden genotoxikus és karcinogén hatást vizsgáló *in vitro* módszernél általános követelmény, nem ismerünk olyan vegyi anyagot, amelynél akár *in vivo* vagy *in vitro*, a fototoxin jelleg kimutatásához metabolikus transzformációra szükség lett volna. Így a jelen vizsgálat elvégzéséhez a metabolikus rendszer alkalmazását nem tekintjük sem szükségesnek, sem tudományosan igazolhatónak.

1.7.1.5. A vizsgálati anyag/előkészítés

A vizsgálati anyagokat frissen, a vizsgálat előtt kell elkészíteni, hacsak a stabilitási adatok szerint a tárolás megengedhető. Ha feltételezhető az anyag gyors fotodegradációja, az előkészítés alatt vörös fényt kell biztosítani.

A vegyi anyagokat pufferolt sóoldatban, pl. EBBS-ben (Earl's balanced salt solution), vagy foszfát pufferes fiziológiás sóoldatban (PBS) kell oldani, amelyek, azért, hogy a besugárzás alatt ne alakulhasson ki interferencia, nem szabad, hogy fehérje komponenst és fényelnyelő színes pH-indikátorokat tartalmazzanak.

Ha a vizsgálati anyagok rosszul oldódnak vízben, 100-szoros töménységű megfelelő oldószeres oldatot készítünk, amelyből a pufferes sóoldattal hígítunk 1:100-ra a kívánt végkoncentráció eléréséhez. Ha oldószert használunk, annak egy 1%-os (v/v) állandó térfogatban jelen kell lennie az összes kultúrában, vagyis a negatív kontrolloknál ugyanúgy, mint a tesztanyag összes koncentrációjánál.

Az ajánlott oldószer a dimetilszulfoxid (DMSO) és az etanol (EtOH). Más, kevésbé toxikus oldószerek, mint pl. az acetone is használhatók, de ezeket meg kell vizsgálni bizonyos specifikus sajátságokra, mint pl. reakciókészség a tesztanyaggal, a fototoxikus hatás kioltásának képessége, vagy a gyökfogó képesség.

Az oldódás elősegítésére vortex keverőt és/vagy szonikálást, és/vagy $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra való melegítést lehet alkalmazni.

1.7.1.6. UV besugárzás/előkészítés

Fényforrás: a fototoxicitás mérésének legfontosabb tényezője a megfelelő fényforrás, és a megfelelő szűrés. Az UVA és a látható fény leginkább fotoszenzibilizációt vált ki (7) (10), míg az UVB kevésbé, viszont közvetlenül igen erősen citotoxikus, amely hatás 313 nm -től 280 nm -ig 1000-szeresre nő (11). A megfelelő fényforrás-választás

kritériumának azt az alapvető követelményt is magába kell foglalnia, hogy a fényforrás a tesztanyag által abszorbeált hullámhosszakat is kibocsásson, és hogy a fény dózis (elfogadható idő alatt elérhetően) elégséges legyen ismert fotoszenzibilizáló anyagok kimutatására, továbbá, az alkalmazott hullámhosszok és dózisok ne legyenek indokolatlanul károsak a tesztrendszerre, beleértve a hőszugárzást is (infravörös tartomány).

A napfény szimulálása szoláris szimulátorokkal optimális fényforrásnak tekinthető. A szoláris szimulátorokban xenon ívfényeket és higany-fém halogén („doped”) ívfényeket egyaránt használnak. Az utóbbiak előnye, hogy kevesebb hőt bocsátanak ki és olcsóbbak, azonban nem felelnek meg tökéletesen a napfénynek. Mínt hogy minden szoláris szimulátor jelentős mennyiségű UVB sugarat is kibocsát, megfelelő szűrővel gyengíteni kell az erősen citotoxikus UVB hullámok kibocsátását.

Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitást vizsgáló próbában gyakorlatilag UVB-mentes sugárzási spektrumot kell használni (UVA:UVB kb. 1:20). Az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitást próba hitelesítésénél alkalmazott szűrő szoláris szimulátor spektrális sugárzási eloszlásának példáját már publikálták (3).

Dozimétria: a sugárzás intenzitását minden fototoxicitást vizsgálat előtt megfelelő szélessávú UV-mérővel ellenőrizni kell. Az UV-mérőt a fényforráshoz kell kalibrálni. Az UV-mérő teljesítményét ellenőrizni kell, e célból egy másik ugyanolyan típusú UV-mérő használata és azonos kalibrálás ajánlott. Ideális esetben, nagyobb időközönként a szűrő fényt kibocsátó fényforrás spektrális sugárzásának mérésére és a szélessávú UV-mérő kalibrációjának ellenőrzésére spektrométert kell használni, azonban az ilyen műszer működtetésére csak megfelelő szakértelemmel rendelkező gyakorlott személy alkalmas.

A hitelesítési vizsgálat során úgy találták, hogy az 5 J/cm^2 (UVA) dózis az, amely nem-toxikus a Balb/c 3T3 sejtekre és elég hatásos ahhoz, hogy még gyenge fototoxikus vegyi anyagot is gerjesszen. Az 5 J/cm^2 eléréséhez 50 perc alatt, a sugárzást $1,666 \text{ mW/cm}^2$ -re kell beállítani. Ha más sejtvonalat vagy más fényforrást használunk, az UVA dózist kissé adaptálni kell úgy, hogy érvényes legyen az a kritérium, hogy ne ártson a sejteknek, de legyen képes standard fototoxinok kimutatására. A fényexpozíció idejét az alábbi módon számítjuk:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{besugárzási dózis}(\text{J} / \text{cm}^2) \times 1000}{\text{besugárzott teljesítmény}(\text{mW} / \text{cm}^2 \times 60)} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2. Vizsgálati körülmények

A vizsgálati anyag maximális koncentrációja ne haladja meg a $100 \mu\text{g/ml}$ értéket, mivel kisebb koncentrációnál minden fototoxikus anyagot kimutattak, nagyobb koncentrációnál azonban, a hamis pozitívok (overprediction) előfordulásának a valószínűsége megnő (13). A tesztanyag legnagyobb koncentrációjánál a pH-érték legyen megfelelő (pH-érték tartománya: 6,5–7,8).

A fényben (+UVA), és a fény nélkül (–UVA) vizsgált tesztanyagok koncentráció tartományának kiválasztásához a kísérleteket megelőzően tájékozódó előkísérletre van szükség. A koncentrációsor tartományát és tengelymetszetét úgy kell kialakítani hogy a koncentráció-válasz görbék kísérleti adatokkal legyenek alátámasztva. Geometrikus koncentráció sorozatok (állandó hígítási faktoral) használata javasolt.

1.7.3. Vizsgálati eljárás (további részleteket lásd a 12. hivatkozásnál)

1.7.3.1. E l s ő n a p

Készítsünk egy 1×10^5 sejt/ml-es sejtszuszpenziót tápoldatban és mérjünk $100 \mu\text{l}$ -nyi tápoldatot-mennyiségeket a 96-titeres mikrotiter tenyésztőlemez perifériás helyeire (=blankok). A többi titerbe mérjünk $100 \mu\text{l}$ 1×10^5 sejt/ml-es (= 1×10^4 sejt/l) sejtszuszpenziót. Minden tesztanyaghoz két lemezt készítsünk: egyet a citotoxicitás (–UVA), egyet pedig a fototoxicitás (+UVA) meghatározásához.

Inkubáljuk a sejteket 24 órán át ($37 \text{ }^\circ\text{C}/7,5\% \text{ CO}_2$), amíg egy sejtréteg a tenyészedény alját félig összefolyó rétegben (szemikonfluens) be nem növi. Ez alatt az inkubációs idő alatt a sejtek magukhoz térnek, letapadnak és exponenciálisan növekedni kezdenek.

1.7.3.2. M á s o d i k n a p

Az inkubáció után leszívjuk a tápoldatot a sejtekről, majd azokat kétszer mossuk, titerenként $150 \mu\text{l}$ EBBS/PBS-sel. Ezután adjunk a sejtekhez tesztanyagot vagy oldószert (negatív kontroll) tartalmazó EBBS/PBS-ből $100 \mu\text{l}$ -t.

Alkalmazzunk 8 különböző tesztanyag koncentrációt. Inkubáljuk a sejteket a tesztanyaggal sötétben 60 percig ($37 \text{ }^\circ\text{C}/7,5\% \text{ CO}_2$).

A vizsgálat (+UVA) részének kivitelezéséhez sugározzuk be a sejteket szobahőmérsékleten 50 percig a 96-titeres tenyésztőlemez tetején keresztül $1,7 \text{ mW/cm}^2$ UVA (= 5 J/cm^2) fényvel. Ventilátort kell biztosítani, hogy elkerüljük a víz lecsapódását a tető alatt. Tartsunk két (–UVA) lemezt sötétben, szobahőmérsékleten 50 percig (+UVA expozíciós idő).

Shívjuk le a tesztoldatot és mossuk a sejteket kétszer $150 \mu\text{l}$ EBBS/PBS-sel. Cseréljük le az EBBS/PBS-t tápoldatra és inkubáljuk ($37 \text{ }^\circ\text{C}/7,5\% \text{ CO}_2$) egy éjszakán át (18–22 h).

1.7.3.3. Harmadik nap

Mikroszkópos értékelés

Vizsgáljuk meg a sejteket fázis-kontraszt mikroszkóp alatt. Jegyezzünk le minden olyan sejt-morfológiai változást, amely a tesztanyag citotoxikus hatásának tulajdonítható. Ez az ellenőrzés ajánlott ugyan a kísérleti hibák kizárásához, de nem használjuk fel a citotoxicitás, vagy a fototoxicitás értékeléséhez.

Neutrálvörös felvétel

Mossuk a sejteket 150 µl előmelegített EBBS/PBS-sel. Távolítsuk el óvatosan a mosóoldatot, majd adjunk a sejtekhez 100 µl NR médiumot és inkubáljuk 37 °C -on, párás, 7,5% CO₂-atmoszférában 3 órán át.

Inkubálás után távolítsuk el az NR médiumot és mossuk a sejteket 150 µl EBBS/PBS-sel. Szívjuk és itassuk le az EBBS/PBS-t teljesen. (Vagy: centrifugáljuk a lefelé fordított lemezt)

Adagoljunk pontosan 150 µl NR deszorpciós oldatot (frissen készített etanol/ecetsav használatával).

Rázzuk a mikrotiter lemezt egy mikrotiter lemezrázaton 10 percig, amíg a NR homogén oldatot képezve teljesen ki nem oldódott a sejtekből.

Mérjük meg az NR extraktum optikai denzitását 540 nm-nél a spektrofotométerrel, referenciának blankokat használunk. Tároljuk az adatokat megfelelő formában pl. (ASCII) a későbbi analízis számára.

2. ADATOK

2.1. Az adatok minősége és mennyisége

Az adatok alapján az UVA/látható fény jelenlétében és hiányában felvett koncentráció-válasz elemzésének lehetővé kell válni. Ha citotoxikus hatás is észlelhető, mind a koncentráció tartományt, mind az individuális koncentrációk tengelymetszetét úgy kell meghatározni, hogy a görbe a kísérleti adatokhoz illeszthető legyen. Tekintettel arra, hogy a vizsgálandó anyag a sötét (-UVA) kísérletben esetleg nem lesz citotoxikus még a megadott 100 µg/ml-es határ koncentrációban sem, erősen citotoxikussá válik azonban a besugárzás hatására (+UVA), ezért, hogy megfelelően értékelhető adatokat kapjunk, a kísérlet két részében a koncentráció tartományoknak esetleg nagyságrendekkel kell különbözniük egymástól. Ha a kísérlet egyik részében sincs citotoxicitás, (-UVA) és (+UVA), elegendő egyes dózisok között nagy tengelymetszettel vizsgálni a legnagyobb koncentrációig.

Nincs szükség arra, hogy az egyértelműen pozitív eredmény igazolására a kísérletet megismételjük. Továbbá, az egyértelműen negatív kísérlet igazolására sincs szükség, ha a tesztanyagot elég nagy koncentrációknál vizsgáltuk. Ilyen esetekben, egy-két, a dózistartományt kereső, tájékozódó elővizsgálat után a fővizsgálat elvégzése elegendő.

Ha az eredmények a predikciós modell határértékéhez közel esnek, igazolás céljából a kísérletet meg kell ismételni.

Ha szükségessé válik a vizsgálat megisméltése ahhoz, hogy egyértelmű eredményeket kapjunk, ajánlatos a kísérleti feltételek megváltoztatása. Kulcskérdés pl. a tesztanyag oldatainak készítése. Ezért e feltételek (segédoldószer, őrlés, szonikálás) változtatása igen fontos az ismétlésnél. Alternatíva lehet a sugárzás előtti inkubációs idő változtatása. Vízben instabil vegyi anyagoknál egy rövidebb idő megfelelőbb lehet.

2.2. Az eredmények feldolgozása

Ahol ez lehetséges, meg kell határozni a tesztanyagot, a sejtek NRU-felvételét 50%-ban gátló, koncentrációját (EC₅₀). Ez kivitelezhető úgy, hogy a koncentráció-válasz adatokra bármely alkalmas nem-lineáris regressziós eljárást használunk (ajánlott a Hill függvény, vagy logisztikus regresszió), vagy más illesztési eljárást is használhatunk (14).

Mielőtt az EC₅₀-értéket további számolásra felhasználjuk, az illesztés minőségét megfelelő módon ellenőriznünk kell. Az egyik lehetőség lehet az is, ha az EC₅₀ értéket grafikus illesztési módszerrel számoljuk. Ebben az esetben a kiértékeléshez valószínűségi papír kell: (x-skála: log, y-skála: probit), e módszerrel a koncentráció-válasz összefüggést leíró függvény sok esetben csaknem lineáris transzformálódik.

2.3. Az eredmények értékelése (Predikciós modell)

2.3.1. Predikciós modell változat 1: fotoirritációs faktor (PIF)

Fény jelenlétében (+UVA) és hiányában (-UVA) kapott teljes koncentráció-válasz görbék ismeretében az alábbi képlet segítségével kiszámítható a fotoirritációs faktor (PIF):

$$a) \quad \text{PIF} = \frac{\text{EC}_{50}(-\text{UV})}{\text{EC}_{50}(+\text{UV})}$$

Ha a PIF értéke kisebb mint 5 (<5) az anyagnak előreláthatóan nincs fototoxikus hatása, míg, olyan PIF-ből, amely nagyobb, mint 5, vagy 5-tel egyenlő (≥ 5), fototoxikus hatás várható.

Ha az anyag csak +UVA mellett citotoxikus és nem citotoxikus –UVA-nál, a PIF nem számolható, pedig ez az eredmény azt mutatja, hogy az anyag fototoxikus. Ilyen esetekben, ha a (–UV) citotoxicitás vizsgálatot a legnagyobb koncentrációnál (C_{\max}) is elvégezték, a „>PIF” számítható.

$$b) \quad \text{PIF} = \frac{C_{\max} (-\text{UV})}{\text{EC}_{50} (+\text{UV})}$$

Ha csak egy >PIF nyerhető, bármely 1-nél nagyobb érték fototoxikus hatást jelez .

Ha sem a +UV sem a -UV melletti EC_{50} nem számítható, mert a vegyi anyag a legnagyobb koncentrációban sem citotoxikus, akkor ez azt jelenti, hogy az anyagnak nincs fototoxikus hatása. Ilyen esetekben egy formális „PIF= *1” -t kell az eredmények jellemzésére használni:

$$c) \quad \text{PIF} = *1 = \frac{C_{\max} (-\text{UV})}{C_{\max} (+\text{UV})}$$

Ha csak egy „PIF= *1” számolható, az anyagnak nincs előrejelezhetően fototoxikus hatása.

A b) és c) esetben az *in vitro* 3T3 NRU fototoxicitás próbában elért koncentrációkat a fototoxikus hatás előrejelzésénél alaposan fontolóra kell venni.

2.3.2. Predikciós modell, 2. változat: átlagos fényhatás (MPE)

Más módon, a fototoxikus hatás előrejelzéséhez egy újabb változatot is alkalmazhatunk, amelyet az EU/COLIPA hitelesítési vizsgálatának (15) adatait használva fejlesztettek ki, és amit „vakon” vizsgáltak, amikor egy későbbi vizsgálatban az UV szűrők vegyi anyagainak az *in vitro* fototoxicitását tanulmányozták (13). Ez a modell abban az esetben tudja átlépni a PIF modell korlátait, ha EC_{50} nem nyerhető. A modell az „átlagos fényhatást” (MPE) használja, egy olyan mértéket, amely a teljes koncentráció-válasz görbék összehasonlításán alapszik. Az MPE modell alkalmazásához a Humboldt Egyetemen (Berlin) egy speciális számítógépes szoftvert fejlesztettek ki, amely ingyen beszerezhető.

2.4. Az eredmények értelmezése

A 3T3 NRU fototoxicitás próbával kapott pozitív eredmény ($\text{PIF} \geq 5$, vagy $\text{MPE} \geq 0,1$) azt mutatja, hogy a vizsgálati anyagnak fototoxikus hatása van. Ha ezt az eredményt $10 \mu\text{g/ml}$ koncentráció alatt kapjuk, valószínű, hogy az anyag különböző *in vivo* expozíciós körülmények között is fototoxinként hat. Ha pozitív eredményt csak a legnagyobb koncentráció, azaz $100 \mu\text{g/ml}$ mellett kapunk, a fototoxikus hatásnak, mint veszélynek a megítélése további mérlegelés tárgyát kell, hogy képezze. Ez alapulhat penetrációs, abszorpciós adatokon, azon, hogy az anyag akkumulálódik-e a bőrben, vagy a meggyőző eredmény érdekében meg kell az anyagot egy másik módszerrel, pl. az *in vitro* emberi bőrmodellen vizsgálni.

A 3T3 NRU fototoxicitás próbával kapott negatív eredmény ($\text{PIF} < 5$, vagy $\text{MPE} < 0,1$) azt mutatja, hogy emlős sejtkultúrában, az adott vizsgálati feltételek mellett a vizsgálati anyag nem volt fototoxikus. Azokban az esetekben, amikor az anyag a legnagyobb koncentrációig, azaz $100 \mu\text{g/ml}$ -ig vizsgálható volt, a negatív eredmény azt mutatja, hogy a vegyi anyagnak nincs fototoxikus hatása és nem valószínű, hogy *in vivo* fototoxikus. Ugyanígy kell értelmeznünk az eredményt, ha kisebb koncentrációnál egyforma koncentráció-válasz eredményeket kapunk ($\text{EC}_{50} + \text{UV}$ és $\text{EC}_{50} - \text{UV}$). Ezzel szemben, ha (+UV és –UV) nem lehetett toxicitást kimutatni és, ha a kismértékű vízdoldékonyság miatt $100 \mu\text{g/ml}$ -nél kisebb koncentrációkat lehetett csak használni, a tesztanyag és a módszer összeférhetősége megkérdőjelezhető és további – meggyőző eredményt hozó – vizsgálat elvégzését mérlegelni kell (pl. egy *in vitro* bőrmodellt, vagy egy *ex vivo* bőrmodellt, vagy egy *in vivo* vizsgálatot).

3. JELENTÉS

Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek az alábbi információt kell tartalmazni:

Vizsgálati anyag:

- jellemző adatok, CAS szám, ha ismert,
- fizikai tulajdonságok, szennyező anyagok,
- fizikai-kémiai sajátságok, amelyek a vizsgálat kivitelezéséhez szükségesek lehetnek,
- stabilitás és fotostabilitás, ha ismert.

Oldószer:

- az oldószer választásának indoklása,
- a tesztanyag oldékonysága ebben az oldószerben,
- a kezeléshez használt médium százalékos oldószertartalma (EBBS vagy PBS),

Sejtek:

- a sejtek típusa és származása,
- mycoplasma-mentesség,

- a sejtpasszázatok száma, ha ismert,
- a sejtek UVA-érzékenysége az in vitro 3T3 NRU fototoxicitás próbában használt készülékkel mérve.

Vizsgálati körülmények (a) – inkubálás a kezelés előtt és után:

- a tenyésztőoldat típusa és összetétele,
- inkubációs körülmények (CO₂-koncentráció, hőmérséklet, páratartalom),
- az inkubáció időtartama (elő- és utókezelés).

Vizsgálati körülmények (b) – a vegyi anyaggal történő kezelés:

– a besugárzás (UV/látható fény jelenlétében és anélkül) alatt alkalmazott koncentrációk kiválasztásának indoklása,

– a vegyi anyag korlátozott oldékonysága és citotoxicitás hiánya esetén a legnagyobb vizsgált koncentráció megindoklása,

- a kezelő oldat (pufferolt só oldat) típusa és összetétele,
- a kémiai kezelés időtartama.

Vizsgálati körülmények (c) – besugárzás:

- a használt fényforrás kiválasztásának indoklása,
- a fényforrás spektrális sugárzásának jellemzői,
- a használt szűrő transzmissziós és abszorpciós jellemzői,
- a radiométer jellemzői és a kalibráció részletei,
- a fényforrás vizsgálati rendszertől való távolsága,
- UVA besugárzás értéke ebből a távolságból, mW/cm²-ben kifejezve,
- az UV/látható fény besugárzásának időtartama,
- UVA dózis (besugárzás × idő), J/cm²-ben kifejezve,
- a hőmérséklet, amely mellett a besugárzott és az egyidőben sötétben tartott sejt-kultúrákat inkubálták,

Vizsgálati körülmények (d) – NRU próba

- az NR médium összetétele,
- az NR inkubáció időtartama,
- az inkubáció körülményei (CO₂ koncentráció, hőmérséklet, páratartalom),
- az NR extrakció körülményei (extrahálószer, időtartam),
- az NR optikai denzitásának spektrofotometriás leolvasásához alkalmazott hullámhossz,
- második hullámhossz (referencia), ha volt,
- spektrofotométer blank térfogata, ha használtak ilyeneket.

Eredmények:

– a vizsgálati anyag egyes koncentrációinál kapott sejt-életképesség a kontrollok átlagos életképességének százalékában kifejezve,

– koncentráció-válasz görbék (a vizsgálati anyag koncentrációja a relatív sejt-életképességgel szemben), amelyeket az egyidőben végzett +UVA és –UVA vizsgálatokban kaptunk,

– a koncentráció-válasz görbék adatainak elemzése: ha lehetséges, az EC₅₀ (+UVA) és az EC₅₀ (–UVA) számítógépre vitele, számolása,

– a két koncentráció-válasz görbe – amelyeket UVA/látható fény besugárzás mellett, vagy anélkül kaptunk – összehasonlítása, úgy, hogy, vagy a fotoirritációs faktort (PIF), vagy az átlagos fényhatást (MPE) kiszámoljuk,

– a fototoxikus hatás osztályozása,

– a vizsgálat elfogadhatóságának kritériumai (a) – egyidejű negatív kontroll:

- = a besugárzott és nem-besugárzott sejtek abszolút életképessége (az NR kivonat optikai sűrűsége),
- = negatív kontroll, az átlag és a standard deviáció történelmi adatai,

– a vizsgálat elfogadásának kritériumai (b) – egyidejű pozitív kontroll:

- = a pozitív kontroll anyag EC₅₀ (+UVA) és EC₅₀ (–UVA) és PIF értékei,

- = a pozitív kontroll, történelmi adatai: EC₅₀ (+UVA) és EC₅₀ (–UVA) és PIF, az átlag és a standard deviáció.

Az eredmények megbeszélése.

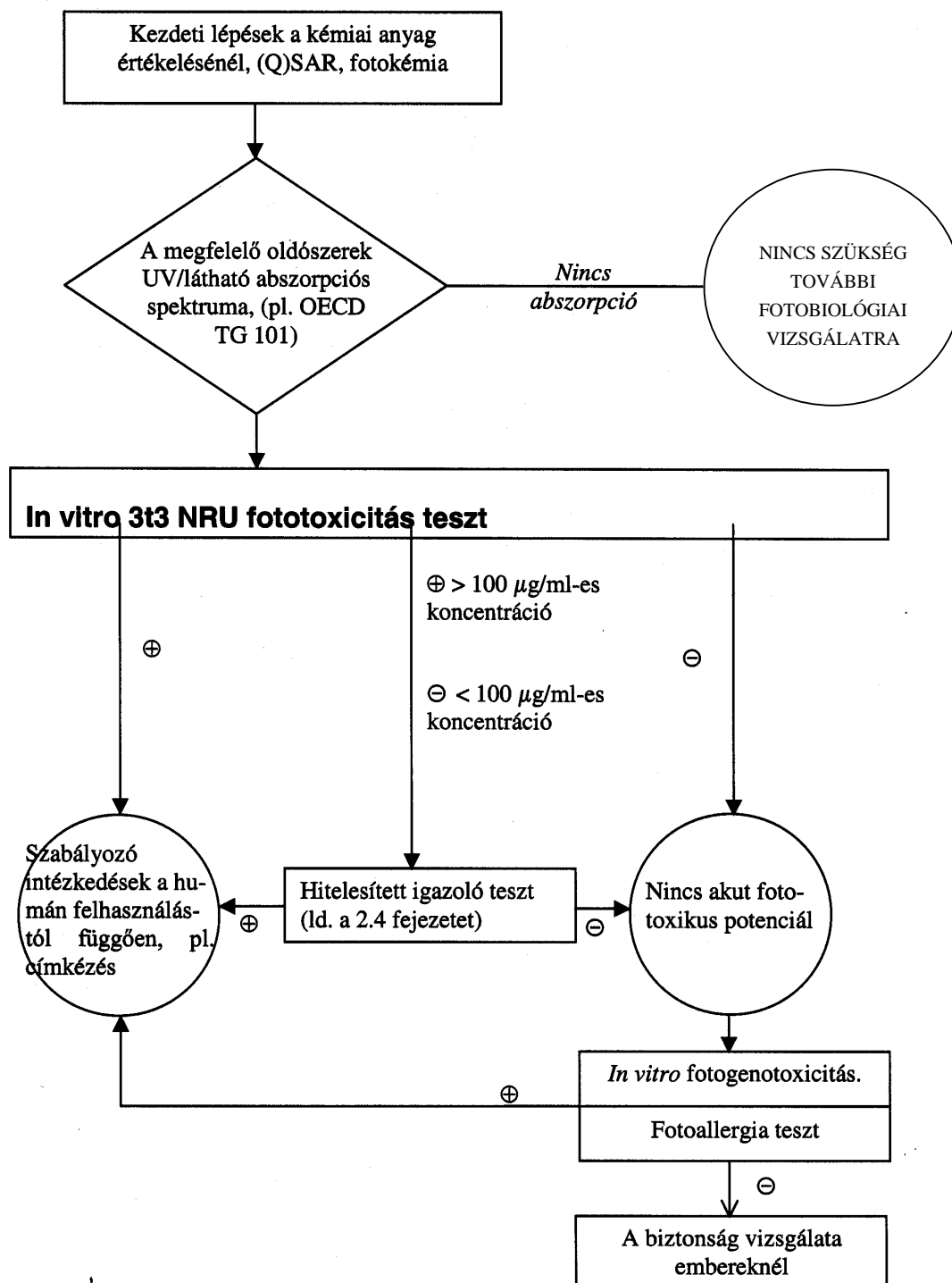
Következtetések.

4. REFERENCES

- (1) 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, *Toxicology in Vitro* 8, pp. 793-796.
- (2) 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, pp. 7-8.
- (3) 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), EU/COLIPA „*In vitro* phototoxicity” validation study, results of phase 11, (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicology in Vitro* 12, pp. 305-327.
- (4) OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods, OECD Publications Office, Paris, 1996.
- (5) Lovell, W.W. (1993), A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicology in Vitro* 7, pp. 95-102.
- (6) Santamaria, L. and Prino, G. (1972), List of the photodynamic substances, Research progress in organic, biological and medicinal chemistry Vol. 3 Part 1, North Holland Publishing Co, Amsterdam, pp. XI-XXXV.
- (7) 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, pp. 314-348.
- (8) Spikes, J.D. (1989), Photosensitization, The science of photobiology, edited by KC Smith, Plenum Press, New York, 2nd edition, pp. 79-110.
- (9) Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption, *Toxicology Letters* 24, pp. 119-124.
- (10) Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996), Animal models for phototoxicity testing, Dermatotoxicology, edited by FN Marzulli and HI Maibach, published by Taylor & Francis, Washington DC, 5th Edition, pp. 515-530.
- (11) Tyrrell R.M. and 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 Research* 47, pp. 1825-1829.
- (12) ZEBET/ECVAM/COLIPA, Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test, drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management. Team of the EU/COLIPA project „*In vitro* Photoirritation” .
- (13) 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 (1998), A Study on the Phototoxic Potential of W Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test, ATLA 26, pp. 679-708.
- (14) Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995), Mathematical modelling of cellular responses to external signals, *Journal of Biological Systems* 3, pp. 127-138.
- (15) 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, pp. 445-462.

Függelék

A 3T3 NRU PT szerepe a kémiai anyag fototoxikus hatását vizsgáló folyamat során



„C” RÉSZ**AZ ÖKOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ MÓDSZEREK**

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés

C.1. Akut halteszt

C.2. Akut daphniateszt

C.3. Algaszaporodás-gátlási teszt

C.4. A könnyű biológiai lebonthatóság vizsgálata

I. rész: Általános megállapítások

II. rész: DOC (oldott szerves szén) csökkenés vizsgálata (C.4-A módszer)

III. rész: Módosított OECD-TEST (DOC-csökkenés) (C.4-B módszer)

IV. rész: CO₂-fejlődés vizsgálata (C.4-C módszer)

V. rész: Manometriás respirometria vizsgálata (C.4-D módszer)

VI. rész: Zárt palack módszer (C.4-E módszer)

VII. rész: MITI-vizsgálata (C.4-F módszer)

C.5. Lebomlás – biokémiai oxigénigény

C.6. Lebomlás – kémiai oxigénigény

C.7. Lebomlás – abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében

C.8. Földigilisztateszt

C.9. Biológiai lebomlás (ZAHN-WELLENS-vizsgálata)

C.10. Biológiai lebomlás (Eleveniszap-szimulációs vizsgálata)

C.11. Biológiai lebomlás (Eleveniszap légzésgátlási teszt)

C.12. Biológiai lebomlás (Módosított SCAS-teszt)

C.13. A bioakkumuláció vizsgálata: átfolyásos halteszt

C.14. Halivadék-növekedési teszt

C.15. Akut toxicitási teszt halembriókkal és hallárvákkal

C.16. Háziméh akut orális toxicitási teszt

C.17. Háziméh akut kontakt toxicitási teszt

C.18. Kémiai anyagok talajon történő adszorpciójának/deszorpciójának vizsgálata egyensúlyi rendszerben

C.19. Adszorpciós együttható becslése talajon és szennyvíziszapon nagyhatékonyságú folyadék kromatográfiával/HPLC

C.20. Daphnia Magna reprodukciós teszt

BEVEZETÉS

Az alábbiakban ismertetett módszerek a veszélyes anyagokkal és a veszélyes készítményekkel kapcsolatos egyes eljárások, illetve tevékenységek részletes szabályairól szóló 44/2000. (XII. 27.) EüM rendelet 6. számú mellékletében felsorolt ökototoxicitási tulajdonságok meghatározására szolgálnak. Az alábbi tulajdonságok meghatározására szolgáló módszereket a szöveg nem tartalmazza:

- a) *Daphnia magna*val végzett krónikus toxicitási vizsgálat;
- b) magasabbrendű növényvel végzett vizsgálat;
- c) hallal végzett krónikus toxicitási vizsgálat.

A felsorolt tulajdonságok meghatározására szolgáló új vizsgálati módszerek kidolgozásáig a megfelelő, nemzetközileg elfogadott módszereket kell alkalmazni. Az alkalmazható módszerek tekintetében az országos tisztifőorvos állásfoglalása az irányadó.

C.1. AKUT HALTESZT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

E vizsgálat célja a vizsgálati anyag édesvízi halakra kifejtett akut letális toxicitásának meghatározása. Amennyiben lehetséges, információt kell szerezni a vizsgálati anyag vízzoldékonyságáról, gőznyomásáról, kémiai stabilitásáról, disszociációs állandóiról és biológiai lebonthatóságáról. Ezen adatok segíthetnek kiválasztani azt a vizsgálati módszert (statikus, félstatikus, átfolyásos), amely leginkább alkalmas az adott anyag megfelelően állandó koncentrációjának fenntartására a teljes vizsgálat során.

Az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló további adatokat (pl. szerkezeti képlet, tisztasági fok, szennyeződések jellege és százalékos aránya, esetleges adalékanyagok mennyisége és az n-oktanol/víz megoszlási koefficiens) is figyelembe kell venni a vizsgálat tervezése és az eredmények értelmezése során egyaránt.

1.2. Definíciók és mértékegységek

Akut toxicitásnak nevezünk az élőlényben megfigyelhető káros hatásokat, melyeket egy adott anyag okoz, meghatározott expozíciót követően, rövid időn (napokon) belül. Jelen vizsgálat keretei között az akut toxicitást a közepes halálos koncentrációval (LC_{50}) fejezzük ki, azaz azzal a vízben mért koncentrációval, amely meghatározott időtartamú folyamatos expozíció során a vizsgálatához használt halak 50%-át elpusztítja.

A vizsgálati anyagok koncentrációit tömeg/térfogat formában fejezzük ki (milligramm/liter), de használjuk a tömeg/tömeg (mg/kg) formát is.

1.3. Referenciaanyagok

Referenciaanyag alkalmazásával érzékenységi tesztet is végezhetünk, mellyel azt igazoljuk, hogy a laboratóriumi vizsgálati körülmények között a vizsgált fajnál megfigyelhető válaszok jelentős mértékben nem módosultak.

E vizsgálat vonatkozásában referenciaanyagot még nem határoztak meg.

1.4. A módszer elve

100 mg/liter koncentráció alkalmazásával tûrlesztetet állíthatunk be, mellyel azt demonstráljuk, hogy az LC_{50} nagyobb ennél a koncentrációnál.

A vizsgálati anyagból vízzel különböző töménységû oldatokat készítünk, majd 96 órára halakat teszünk bele. A halálozásokat minimum 24 óránként feljegyezzük, és – amennyiben lehetséges – minden megfigyelési időpontban kiszámoljuk a vizsgált halak 50%-át elpusztító koncentrációt (LC_{50}).

1.5. Minőségi kritériumok

A lefektetett minőségi kritériumok a tûrlesztetre és a teljes vizsgálati módszerre egyaránt vonatkoznak.

A kontrollokban a halálozási arány nem lépheti túl a 10%-ot (vagy nem lehet több egy halnál, amennyiben tíznél kevesebb halat használunk) a vizsgálat végére.

Az oldott oxigén koncentrációjának a vizsgálat teljes időtartama alatt a levegőteltettségi érték 60%-ánál nagyobbknak kell lennie.

A vizsgálati anyag koncentrációi a vizsgálat teljes időtartama alatt nem csökkenhetnek a kiindulási koncentrációk 80%-a alá.

A vizsgálati közegben könnyen oldódó, és stabil oldatokat képző anyagok – tehát olyan anyagok, amelyek jelentős mértékben nem párolognak, bomlanak, hidrolizálnak vagy adszorbeálódnak – esetében az induló koncentrációt azonosnak tekinthetjük a névleges (nominális) koncentrációval.

Megfelelően bizonyítani kell, hogy a koncentrációk megfelelőek voltak a vizsgálat teljes időtartama alatt, illetve, hogy a minőségi kritériumok teljesültek.

Azon anyagok esetében, amelyek

(i) a vizsgálati közegben rosszul oldódnak, vagy

(ii) stabil emulziót vagy diszperziót képeznek, vagy

(iii) vizes oldatokban nem stabilak,

kezdeti koncentrációnak azt a koncentrációt tekintjük, amelyet a vizsgálat kezdetekor oldatban (vagy, amennyiben ez technikailag nem kivitelezhető, a vízoszlopban) mérünk. A koncentrációt az egyensúlyi állapot kialakulása után, de a halak behelyezését megelőzően kell megállapítani.

Mindhárom esetben további méréseket kell végezni a tényleges expozíciós koncentráció, illetve a minőségi kritériumok teljesülésének ellenőrzésére.

A pH-érték nem változhat 1 egységet meghaladó mértékben.

1.6. A módszer leírása

A vizsgálat során háromféle eljárás alkalmazható:

Statikus vizsgálat:

Olyan toxicitási vizsgálat, amelynek során a halak a vizsgálat teljes időtartama alatt ugyanabban a tesztoldatban vannak, tehát a tesztoldat nem cserélődik.

Félstatikus vizsgálat:

Olyan toxicitási vizsgálat, melynek során a vizsgálati oldatokat nagyobb időközönként (pl. 24 óra) rendszeresen cseréljük.

Átfolyásos vizsgálat:

Olyan toxicitási vizsgálat, melynek során a víz a tesztedényekben folyamatosan cserélődik, a vizsgálati anyagot pedig a friss beáramoltatott víz szállítja.

1.6.1. Reagensek

1.6.1.1. A vizsgálati anyagokból készített oldatok

A vizsgálati anyagból ioncserélt vízzel vagy az 1.6.1.2. pontban leírtak szerinti vízzel megfelelő töménységű törzsoldatokat készítünk.

A tesztoldatokat a törzsoldatból hígítjuk. Amennyiben magas koncentrációkat vizsgálunk, az anyagot feloldhatjuk közvetlenül a hígítóvízben is.

Az anyagokat általában csak az oldhatósági határig kell vizsgálni. Egyes anyagok esetében (pl. olyan anyagok, amelyek vízben való oldhatósága alacsony, n-oktanol/víz megoszlási hányados értéke magas, illetve amelyek vízben valódi oldat helyett stabil diszperziókat képeznek) elfogadható egyetlen, az oldhatósági határt meghaladó koncentráció alkalmazása a vizsgálat során, hogy biztosak lehessünk abban, hogy vizsgáltuk a maximális oldhatósági/stabilitási koncentrációt. Vigyázni kell azonban arra, hogy ez a koncentráció semmilyen egyéb tekintetben ne zavarja meg a vizsgálati rendszert (pl. az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén stb.).

Alacsony vízdékonyságú anyagok esetében a törzsoldatok készítésekor, illetve a vizsgálati közegben való diszpergálás megkönnyítésére alkalmazhatunk ultrahangos diszpergálást, szerves oldószereket, emulgeálószeret, illetve diszpergálószeret. Amennyiben segédanyagokat használunk, úgy valamennyi koncentrációnak azonos mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia. Be kell állítani egy segédanyag-kontrollt is, mely a segédanyagot azonos koncentrációban tartalmazza. Törekedjünk az alkalmazott segédanyagok koncentrációjának minimalizálására, de a segédanyag koncentrációja a vizsgálati közegben semmilyen körülmények között nem haladhatja meg a 100 mg/liter értéket.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell elvégezni. Ha a vizsgálat során a pH-érték jelentősen megváltozott, a vizsgálatot beállított pH-érték mellett megismételjük, és az eredmények megadásánál ezt is közöljük. Ebben az esetben a törzsoldat pH-értékét a hígításhoz használt víz pH-értékéhez igazítjuk, kivéve, ha specifikus indokok szólnak ez ellen. Erre a célra HCl-ot, illetve NaOH-ot használunk. A pH-korrekciót úgy kell végrehajtani, hogy a vizsgálati anyag koncentrációja a törzsoldatban lényegében ne változzon. Amennyiben a pH beállítása bármilyen kémiai reakciót vagy a vizsgált vegyület fizikai kicsapódását idézi elő, az eredménylapon ezt is közölni kell.

1.6.1.2. A tenyész- és hígítóvíz

Erre a célra vezetékes ivóvíz (amely nem tartalmaz potenciálisan káros koncentrációban klórt, nehézfémeket vagy egyéb anyagokat), jó minőségű természetes víz, vagy művíz (lásd az 1. Függelék) használható. 10–250 mg/liter (CaCO₃-ra számítva) keménységű és 6,0–8,5 pH értékkel rendelkező vizek használata ajánlott.

1.6.2. Eszközök

Valamennyi alkalmazott berendezésnek kémiai ellenálló anyagból kell készülnie:

- automatikus hígító rendszer (az átfolyósos vizsgálathoz),
- oxigénmérő,
- víz keménységének meghatározására szolgáló berendezés,
- megfelelő berendezés a hőmérséklet szabályozására,
- pH-mérő.

1.6.3. Teszthalak

A felhasznált halak minden szempontból egészségesek legyenek.

Az alkalmazott fajt olyan gyakorlati kritériumok alapján választjuk ki, mint a beszerezhetőség, a könnyű fenntarthatóság, a tesztelésre való alkalmasság, érzékenység a vegyi anyagokkal szemben, továbbá szem előtt kell, hogy tartsuk az egyéb jelentős gazdasági, biológiai és ökológiai tényezőket is. Figyelembe kell vennünk továbbá a vizsgálatok során nyert adatok összehasonlíthatóságának követelményét, illetve a nemzetközi harmonizációs folyamatot is (lásd az Irodalom 1. pontját).

A jelen vizsgálat céljára javasolt halfajok felsorolását a 2. Függelék tartalmazza; a leginkább megfelelőek a zebradánió és a szivárványos pisztráng.

1.6.3.1. Tartási körülmények

A teszthalak lehetőség szerint egyetlen állományból származó, hasonló méretű és életkorú állatok legyenek. A halakat legalább 12 napon keresztül az alábbi körülmények között tartjuk:

- egyedsűrűség: a rendszernek (visszaforgatás vagy átáramoltatás) és az adott halfajnak megfelelő,
- víz: lásd az 1.6.1.2. pontot,
- fényviszonyok: naponta 12–16 óra megvilágítás,
- oldott oxigén koncentrációja: a levegőteltettségi érték legalább 80%-a,
- etetés: hetente háromszor vagy naponta, az etetést a vizsgálat kezdete előtt 24 órával felfüggesztjük.

1.6.3.2. A tesztelésre szánt halak pusztulási aránya

Egy 48 órás szoktatási időszak után az elpusztult állatok számát rögzítjük, és az alábbi kritériumokat alkalmazzuk:

- ha 7 napon belül a populáció 10%-a elpusztul:
az állomány nem használható tesztelésre;
- 5–10%-os halálozás esetén:

a halakat további hét napig tartjuk; amennyiben további halálozások nem történnek, a állomány elfogadható, ellenkező esetben tesztelésre nem használható;

- 5%-ot el nem érő halálozási arány esetén:

az állomány elfogadható.

1.6.4. Szoktatási idő

A felhasználást megelőzően legalább hét napon át valamennyi halat a vizsgálat során használandó vízzel azonos minőségű és hőmérsékletű vízben tartjuk.

1.6.5. A vizsgálat menete

A minősítő vizsgálatot megelőzheti egy elővizsgálat, melynek segítségével meghatározhatjuk a minősítő vizsgálat során alkalmazandó koncentrációtartományt.

A vizsgálat során a vizsgálati sorozat mellett alkalmazni kell egy negatív kontrollt és – amennyiben szükséges – egy oldószerkontrollt is.

Az alkalmazandó vizsgálati eljárást – statikus, félstatikus vagy átfolyósos – a vizsgált vegyület fizikai és kémiai tulajdonságai alapján válasszuk, úgy, hogy az említett minőségi kritériumok teljesüljenek.

A tesztet az alábbiak szerint állítjuk be:

- időtartam: 96 óra,
- állatok száma: koncentrációnként legalább 7,
- a tesztedények a javasolt egyedsűrűségnek megfelelő térfogatúak legyenek,
- egyedsűrűség: statikus és félstatikus vizsgálatok esetében maximum 1 gramm hal/liter; átfolyósos rendszer
- alkalmazása esetén ennél nagyobb egyedsűrűség is elfogadható,
- vizsgálati koncentrációk: legalább öt, olyan mértani sorozatot alkotó koncentrációértéket kell kiválasztani, melyek a 0–100% mortalitási tartományt átfogják, a hígítási tényező állandó, és nem nagyobb, mint 2,2,

- víz: lásd az 1.6.1.2. pontot,
- fényviszonyok: naponta 12-16 óra megvilágítás,
- hőmérséklet: az adott fajnak megfelelő állandó (± 1 °C) hőmérséklet (lásd a 2. Függelékét),
- oldott oxigén koncentrációja: az adott hőmérsékletnek megfelelő levegőteltettségi érték legalább 60%-a,
- etetés: nincs.

A halakat 2–4 óra elteltével megfigyeljük, utána a megfigyelést minimum 24 óránként elvégezzük. Egy halat akkor tekintünk élettelennek, ha a farokúszó megérintése nem vált ki semmiféle reakciót, és légzőmozgások sem figyelhetők meg. Az elpusztult halakat eltávolítjuk, a halálozások számát pedig feljegyezzük.

A jelentkező egyéb rendellenességeket is jegyezzük fel (pl. egyensúlyvesztés, úszás módjának, illetve az úszás közbeni viselkedés megváltozása, a légzés, illetve a pigmentáció megváltozása stb.).

A pH-t, az oldott oxigén-koncentrációt és a hőmérsékletet naponta mérjük.

Tűrőteszt

Tűrőtesztet végezhetünk 100 mg/liter koncentráció alkalmazásával, annak bizonyítására, hogy az LC₅₀ nagyobb ennél a koncentrációnál.

Ha az anyag természete miatt a vizsgálati közegben nem érhető el a 100 mg/liter koncentráció, akkor a tűrőtesztben az anyagot a vizsgálati közegben való oldékonyságával megegyező koncentrációban (vagy stabil diszperziót képző maximális koncentrációban) alkalmazzuk (lásd még az 1.6.1.1. pontot).

A tűrőtesztben 7–10 halat használunk, és ugyanennyi halat kell alkalmazni kontrollcsoportonként. (A binomiális elmélet szerint, ha 10 hal alkalmazása mellett nem tapasztalunk halálozást, akkor 99,9%-os a valószínűsége annak, hogy az LC₅₀ magasabb a tűrőtesztben alkalmazott koncentrációnál. 7, 8 vagy 9 hal alkalmazása esetén, ha nincs halálozás, legalább 99%-os valószínűséggel állítható, hogy az LC₅₀ magasabb a tűrőtesztben alkalmazott koncentrációnál.)

Amennyiben halálozás tapasztalható, úgy a teljes vizsgálatot el kell végezni. A megfigyelt szubletális (nem halálos) hatásokat jegyezzük fel.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

Valamennyi megfigyelési időponthoz tartozó (24, 48, 72 és 96 óra) százalékos pusztulási arányt a koncentráció függvényében, féllogaritmikus papíron ábrázoljuk. Amennyiben lehetséges, valamennyi megfigyelési időpont esetében – standard eljárások segítségével – elvégezzük az LC₅₀ és a konfidenciatartomány ($p = 0,05$) becslését. Az eredményeket két szignifikáns számjegyre kerekítjük (néhány példa a két számjegyre való kerekítésre: 173,5 kerekítve 170; 0,127 kerekítve 0,13; 1,21 kerekítve 1,2).

Azokban az esetekben, amikor a hatásgörbe túl meredek ahhoz, hogy az LC₅₀-érték számítható legyen, elegendő az LC₅₀ grafikus becslését megadni.

Amennyiben két egymást követő koncentráció, amelyek hányadosa 2,2, 0 és 100%-os halálozást ad, úgy ez a két koncentrációérték elegendő az LC₅₀ értékét magában foglaló tartomány meghatározásához.

Amennyiben a megfigyelések arra utalnak, hogy a vizsgálati anyag stabilitása vagy homogenitása nem tartható fenn, úgy ezt a tényt foglaljuk be a jelentésbe, és az eredmények értékelésénél is figyelembe kell venni.

3. AZ EREDMÉNYLAP

Amennyiben lehetséges, az eredménylap az alábbi adatokat tartalmazza:

- a vizsgálat során alkalmazott halak adatai (tudományos név, törzs, szállító, esetleges előkezelés, az egyes koncentrációk esetében alkalmazott halak száma és mérete);
- a hígítóvíz eredete és főbb kémiai tulajdonságai (pH, keménység, hőmérséklet);
- alacsony vízdékonyságú anyag esetében a törzs- és tesztoldatok készítésének módja;
- az esetlegesen alkalmazott segédanyagok koncentrációja;
- az alkalmazott koncentrációk listája, és (amennyiben rendelkezésre állnak) az egyes koncentrációnál a vizsgálati anyagnak a tesztoldatban való stabilitására vonatkozó adatok;
- amennyiben kémiai elemzésekre is sor került, az alkalmazott módszerek és a kapott eredmények;
- az esetlegesen végrehajtott tűrőteszt eredményei;
- az alkalmazott vizsgálati eljárás részletes ismertetése, és kiválasztásának indokai (pl. statikus, félstatikus, adagolási sebesség, átfolyási sebesség, levegőztetésre került-e sor, egyedsűrűség stb.);
- a vizsgálati berendezések ismertetése;
- megvilágítás (naponta mennyi ideig);
- a vizsgálati oldatokban mért oldott oxigén koncentrációk, pH-értékek, és hőmérsékletek 24 óránként;

- annak igazolása, hogy a vizsgálatot a minőségi kritériumoknak megfelelően végezték;
- a kumulatív halálozást valamennyi javasolt megfigyelési időpontban, valamennyi koncentráció, illetve kontroll (valamint az esetlegesen alkalmazott segédanyagkontroll) tekintetében feltüntető táblázat;
- a hatásgörbe (koncentráció/százalékos pusztulás) grafikus ábrázolása;
- amennyiben lehetséges, valamennyi javasolt megfigyelési időpontra vonatkozó LC₅₀ értékek (95%-os konfidencia határok mellett);
- az LC₅₀ értékek meghatározásához használt statisztikai eljárások;
- referenciaanyag alkalmazása esetén a kapott eredmények;
- a vizsgálat során a halálozást nem okozó legmagasabb vizsgálati koncentráció;
- a vizsgálat során a 100%-os halálozást előidéző legalacsonyabb vizsgálati koncentráció.

4. IRODALOM

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final 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 és /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 (L1) 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-660/4-78-012, 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-AWWA-WPCF, 1975
13. Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979
14. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische 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. Methods for calculating an LC₅₀. In *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation* (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.
20. Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

*1. Függelék**Művíz**Példa megfelelő hígítóvízre*

Valamennyi vegyi anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

Jó minőségű desztillált vizet, vagy $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ értéknél kisebb vezetőképességgel rendelkező ioncserélt vizet alkalmazunk.

A víz desztillálásához használt berendezés nem tartalmazhat rézből készült alkatrészt.

Törzsoldatok

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (kalcium-klorid-dihidrát): 11,76 g

Vízben oldjuk, és vízzel egy liter térfogatra kiegészítjük.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magnézium-szulfát-heptahidrát): 4,93 g

Vízben oldjuk, és vízzel egy liter térfogatra kiegészítjük.

NaHCO_3 (nátrium-hidrogén-karbonát): 2,59 g

Vízben oldjuk, és vízzel egy liter térfogatra kiegészítjük.

KCl (kálium-klorid): 0,23 g

Vízben oldjuk, és vízzel egy liter térfogatra kiegészítjük.

Hígításhoz használható művíz

A fenti négy törzsoldat mindegyikéből 25 ml-nyi mennyiséget összekeverünk, majd ezt 1 literre vízzel kiegészítjük.

A kapott oldatot levegőztetjük, amíg az oldott oxigén koncentrációja el nem éri a telítettségi értéket.

A pH-érték a $7,8 \pm 0,2$ tartományba essen.

Amennyiben szükséges, a pH-értéket NaOH-dal (nátrium-hidroxid) vagy HCl-dal (sósav) állítjuk be.

Az így elkészített hígítóvizet 12 óráig állni hagyjuk, és a továbbiakban nem levegőztetjük.

Ebben az oldatban a Ca- és Mg-ionok összege 2,5 mmol literenként. A Ca:Mg arány 4:1, a Na:K arány pedig 10:1. Az oldat teljes lúgossága 0,8 mmol literenként.

A hígítóvíz elkészítése során a fent leírt elkészítési módtól való esetleges eltérés nem befolyásolhatja a víz összetételét vagy tulajdonságait.

2. Függelék

Tesztelésre ajánlott halfajok

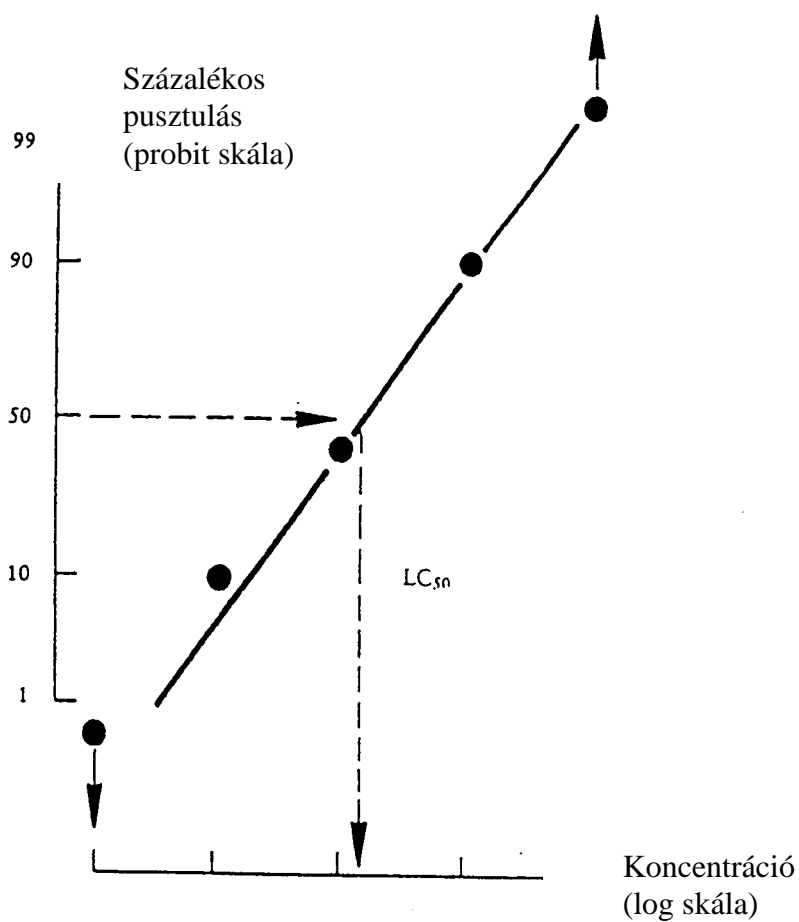
Javasolt faj	Vizsgálati hőmérséklet javasolt tartománya (°C)	Vizsgálati egyedek javasolt teljes hossza (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton–Buchanan) – zebraadánió	20–24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) – amerikai cselle	20–24	5,0 ± 2,0
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) – ponty	20–24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck és Schlegel 1850) – japán fogasponty	20–24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859) – guppi	20–24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758) – kékkopoltyús naphal	20–24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988) – szivárványos pisztráng	12–17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758) – háromtűskés pikó	20–24	6,0 ± 2,0

A halak beszerzése

A fent felsorolt halfajok könnyen tenyésztethetők és/vagy könnyen beszerezhetők az év bármely szakában. Haltenyésztésben és laboratóriumban – betegségek és paraziták szempontjából ellenőrzött körülmények között – egyaránt fenntarthatók. A vizsgálatokhoz használt egyedek egészségesek és ismert eredetűek legyenek. Ilyen halak a világ számos részén beszerezhetők.

*3. Függelék**Példa a hatásgörbére*

Példa az LC_{50} -érték meghatározására féllogaritmikus papíron



C.2. AKUT DAPHNIATESZT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

E vizsgálat célja a vizsgálati anyag EC_{50} -értékének meghatározása *Daphnián*, édesvízben. A vizsgálatot megelőzően szerezzünk információt a vizsgálati anyag vízdékonyságára, göznyomására, kémiai stabilitására, disszociációs állandóra és biológiai lebonthatóságára vonatkozóan.

Az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló további adatok (pl. szerkezeti képlet, tisztasági fok, lényeges szennyeződések jellege és százalékos aránya, esetleges adalékanyagok mennyisége, és n-oktanol/víz megoszlási koefficiens) is figyelembe veendő a vizsgálat tervezése és az eredmények értelmezése során egyaránt.

1.2. Definíciók és mértékegységek

Az Irányelv által megfogalmazott követelmény szerinti, *Daphniára* megállapított LC_{50} egyenértékűnek tekinthető a jelen módszerrel meghatározott EC_{50} -nel.

Jelen vizsgálat keretei között az akut toxicitást a közepesen hatékony immobilizáló koncentrációval (EC_{50}) fejezzük ki. Ez az a – kiindulási értékével kifejezett – koncentráció, amely meghatározott időtartamú, folyamatos expozíció során a vizsgálatához használt *Daphnia* tesztszervezetek 50%-át mozgásképtelenné teszi.

Mozgásképtelenség:

Azok az állatok, amelyek a vizsgálati edény finom rázására 15 másodpercen belül nem kezdenek úszni, mozgásképtelenné tekintendők. A vizsgálati anyagok koncentrációit tömeg/térfogat formában fejezzük ki (milligramm/liter), de használjuk a tömeg/tömeg (mg/kg) formát is.

1.3. Referenciaanyagok

A vizsgálat végrehajtható referenciaanyag alkalmazásával, annak igazolására, hogy laboratóriumi vizsgálati körülmények között a vizsgált faj érzékenysége lényegesen nem változott.

A 2. függelék tartalmazza egy négy különböző anyag alkalmazásával végrehajtott EGK-körvizsgálat eredményeinek összefoglalását.

1.4. A módszer elve

Végrehajthatunk egy tûrtesztet 100 mg/liter koncentráció alkalmazásával, annak bizonyítása céljából, hogy az EC_{50} nagyobb ennél a koncentrációnál.

A vizsgálati anyagból vízzel különböző töménységű oldatokat készítünk, majd 48 órára ezekbe helyezük a *Daphniákat*. Amennyiben ennél rövidebb expozíciós időt alkalmazunk, úgy azt indokolni kell a vizsgálati jelentésben.

Minden más szempontból azonos vizsgálati körülmények között, a vizsgálati anyag – megfelelően széles koncentrációtartományban alkalmazva – eltérő mértékű hatást gyakorol a *Daphniák* úszási képességére. A különböző koncentrációk a vizsgálat végére a *Daphniák* különböző százalékát teszik úszásképtelenné. A nulla vagy 100%-os immobilizációt előidéző koncentrációkat közvetlenül a vizsgálati megfigyelésekből állapítjuk meg, míg a 48 órás EC_{50} értéket lehetőség szerint számítás útján.

E vizsgálatához statikus rendszert használunk, tehát a vizsgálati oldatok nem cserélődnek az expozíciós periódus során.

1.5. Minőségi kritériumok

A előírt minőségi kritériumok a tûrtesztre és a teljes vizsgálati módszerre egyaránt vonatkoznak.

A kontrollokban az immobilizációs arány a vizsgálat végére nem haladhatja meg a 10%-ot.

Ügyelni kell arra, hogy a kontrollcsoportokban levő *Daphniák* ne „ragadjanak fenn” a felületi feszültség miatt a víz felszínén.

A vizsgálati edényekben az oldott oxigén koncentrációja lehetőleg 3 mg/liter felett legyen a teljes vizsgálat során. Az oldott oxigén koncentrációja semmilyen körülmények között nem eshet 2 mg/liter alá.

A vizsgálati anyag koncentrációjának a vizsgálat teljes időtartama során el kell érnie a kezdeti koncentráció legalább 80%-át.

A vizsgálati közegben könnyen oldódó, és stabil oldatokat képző anyagok – tehát olyan anyagok, amelyek jelentős mértékben nem párolognak, bomlanak, hidrolizálnak vagy adszorbeálódnak – esetében az kezdeti koncentrációt azonosnak tekinthetjük a névleges (nominális) koncentrációval.

Alkalmos módon bizonyítani kell, hogy a koncentrációk megfelelőek voltak a vizsgálat teljes időtartama alatt, illetve, hogy a minőségi kritériumok teljesültek.

Azon anyagok esetében, amelyek

- (i) rosszul oldódnak a vizsgálati közegben, vagy
- (ii) stabil emulziót vagy diszperziót képeznek, vagy
- (iii) vizes oldatokban nem stabilak,

kezdeti koncentrációnak azt a koncentrációt tekintjük, amelyet a vizsgálat kezdetekor oldatban (vagy, amennyiben ez technikailag nem kivitelezhető, a vízoszlopban) mérünk. A koncentrációt a kiegyenlítődési periódust követően, de a tesztszervezetek behelyezését megelőzően kell megállapítani.

A vizsgálat során minden esetben további méréseket kell végezni a tényleges expozíciós koncentráció, illetve a minőségi kritériumok teljesülésének ellenőrzése céljából.

A pH-érték nem változhat 1 egységet meghaladó mértékben.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Reagensek

1.6.1.1. A vizsgálati anyagokból készített oldatok

Megfelelő töménységű törzsoldatokat készítünk, oly módon, hogy a vizsgálati anyagot feloldjuk ioncserélt vízben, vagy az 1.6.1.2. pontban leírtaknak megfelelő vízben.

A vizsgálat során használandó koncentrációkat a törzsoldat megfelelő hígításával érjük el. Amennyiben magas koncentrációkat vizsgálunk, úgy az anyagot feloldhatjuk közvetlenül a hígítóvízben is.

Az anyagokat normális esetben csak az oldhatósági határig kell vizsgálni. Egyes anyagok esetében (pl. olyan anyagok, amelyek vízben rosszul oldódnak, n-oktanol/víz megoszlási hányados értéke magas, illetve amelyek vízben valódi oldat helyett stabil diszperziókat képeznek) elfogadható egy, az oldhatósági határt meghaladó koncentráció alkalmazása a vizsgálat során, hogy biztosak lehessünk abban, hogy elértük a maximális oldható/stabil koncentrációt. Vigyázni kell azonban arra, hogy ez a koncentráció semmilyen egyéb tekintetben ne zavarja meg a vizsgálati rendszert (pl. az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén stb.).

Alacsony vízdoldékonyságú anyagok esetében a törzsoldatok készítésekor, illetve a vizsgálati közegben való diszpergálás megkönnyítése érdekében alkalmazhatunk ultrahangos diszpergálást, szerves oldószereket, emulgeálószerkeket, illetve diszpergálószerkeket. Amennyiben ilyen segédanyagokat alkalmazunk, úgy valamennyi koncentrációnak azonos mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia. Továbbá be kell állítani egy olyan kontrollt is, amely a segédanyagot ugyanolyan koncentrációban tartalmazza. Törekedni kell az alkalmazott segédanyagok koncentrációjának minimalizálására, de a segédanyag-koncentráció a vizsgálati közegben semmilyen körülmények között nem lépheti túl a 100 mg/liter értéket.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül kell végrehajtani. Amennyiben a pH-érték határozott megváltozására utaló jelek vannak, úgy javasolt a vizsgálat pH-érték beállítása után a vizsgálatot megismételni. Ezeket az eredményeket is jegyezzük fel. Ebben az esetben a törzsoldat pH-értékét a hígítóvíz pH-értékéhez kell igazítani, kivéve, ha specifikus indokok szólnak ez ellen. Erre a célra elsősorban HCl-ot és NaOH-t használunk. Ezt a pH-kiigazítást úgy kell végrehajtani, hogy a vizsgálati anyag koncentrációja a törzsoldatban lényegében ne változzon. Amennyiben a pH-beállítás következtében bármilyen kémiai reakció, vagy a vizsgált vegyület fizikai kicsapódása tapasztalható, úgy azt bele kell foglalni a jelentésbe.

1.6.1.2. Hígítóvíz

Ehhez a vizsgálatához művizet használunk [lásd az 1. Függelék, illetve az Irodalom (2) pontját: ISO 6341]. Tenyészvízként is a hígítóvízhez hasonló minőségű (pH, keménység) vizet használunk, mivel így a vizsgálat előtt nincs szükség alkalmazkodási periódus beiktatására.

1.6.2. Eszközök

Normál laboratóriumi berendezéseket és felszereléseket használunk. Azok az eszközök, amelyek a vizsgálati anyaggal érintkezésbe kerülnek lehetőleg teljes egészükben üvegből legyenek:

- oxigénmérő (mikroelektrodás, vagy olyan, amely az oldott oxigén kis térfogatú mintákban történő mérésére alkalmas),
- megfelelő berendezés a hőmérséklet szabályozására,
- pH-mérő,
- víz keménységének meghatározására szolgáló berendezés.

1.6.3. Tesztszervezetek

A leggyakrabban használt faj a *Daphnia magna*, bár a *Daphnia pulex* is elfogadható. A vizsgálatához használt, laboratóriumi tenyésztésből származó állatok a vizsgálat kezdetekor 24 óránál fiatalabbak, és megfigyelhető körtünetektől mentesek legyenek, és előéletük – pl. tenyésztés, esetleges előkezelések stb. – ismert kell, hogy legyen.

1.6.4. A vizsgálat menete

A minősítő vizsgálatot megelőzheti egy elővizsgálat, melynek célja adatokat szerezni a fő vizsgálat során alkalmazandó koncentrációtartományról.

A vizsgálat során a tesztsorozat mellett alkalmazni kell egy negatív kontrollt, és – amennyiben szükséges – egy oldószerkontrollt is.

A tesztet az alábbiak figyelembevételével állítjuk be:

- expozíciós idő: 48 óra,
- állatok száma: legalább 20 állat vizsgálati koncentrációnként, lehetőség szerint négy darab öt-öt állatot tartalmazó, vagy két darab tíz-tíz állatot tartalmazó csoportra osztva,
- egyedsűrűség: minden állatra legalább 2 ml vizsgálati folyadék jusson,
- vizsgálati koncentrációk: a vizsgálati oldatokat közvetlenül a Daphniák behelyezését megelőzően kell elkészíteni, oldószerként lehetőleg csak vizet alkalmazunk. Az alkalmazott koncentrációknak egy mértani sorozatot kell alkotniuk, ahol a szorzótényező nem nagyobb 2,2-nél. A kontrollok mellett megvizsgálandó egy 48 óra után 0 immobilizációt és egy 100% immobilizációt okozó koncentráció, továbbá a kettő között a köztes fokú immobilizációt előidéző koncentrációk sorozata, amelyek alapján kiszámítható a 48 órás EC_{50} értéke,
- hígítóvíz: lásd az 1.6.1.2. pontot,
- fényviszonyok: a világos és sötét időszakok váltakozása nem kötelező,
- hőmérséklet: a vizsgálati hőmérséklet $18-22 \pm 1$ °C egy adott vizsgálat során,
- levegőztetés: a vizsgálati oldatot nem levegőztetjük,
- etetés: nincs.

A pH-értéket és az oxigénkoncentrációt a vizsgálat végén mérjük meg a kontrollok és az összes vizsgálati koncentráció esetében egyaránt. A vizsgálati oldatok pH-értékét nem szabad módosítani.

Illékony vegyületeket színtültig telt, zárt tartályokban vizsgáljuk, amelyek elég nagyok ahhoz, hogy ne léphessen fel oxigénhiány.

A Daphniákat 24 és 48 óra után figyeljük meg.

Tűréseszteszt

Végrehajthatunk egy tűrésesztesztet ugyanezzel a módszerrel, 100 mg/liter koncentráció alkalmazásával, annak bizonyítására, hogy az EC_{50} nagyobb ennél a koncentrációnál.

Amennyiben az anyag természete miatt a vizsgálati közegben nem érhető el a 100 mg/liter koncentráció, úgy a tűrésesztesztet az anyagnak a vizsgálati közegben való oldékonyságával megegyező koncentráció (vagy a stabil diszperziót képező maximális koncentráció) alkalmazásával kell végrehajtani (lásd még az 1.6.1.1. pontot).

A tűrésesztesztet 20, kettő vagy négy csoportra osztott Daphnia alkalmazásával hajtjuk végre, és ugyanannyi állatot alkalmazunk a kontroll(ok)ban. Ha mozgásképtelenséget tapasztalunk, szükséges a teljes vizsgálat lefolytatása.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

Valamennyi megfigyelési periódus (24 és 48 óra) vonatkozásában ábrázoljuk az immobilizáció százalékos arányát a koncentráció függvényében, féllogaritmikus papíron. Amennyiben lehetséges, valamennyi megfigyelési időpont esetében becsüljük az EC_{50} értékét és a konfidenciahatárokat ($p = 0,05$) standard eljárások segítségével. Ezek az értékek egy, vagy legfeljebb két szignifikáns számjegyre kerekítendők (néhány példa két számjegyre való kerekítésre: 173,5 kerekítve 170; 0,127 kerekítve 0,13; 1,21 kerekítve 1,2).

Azokban az esetekben, amikor a hatásgörbe túl meredek ahhoz, hogy az EC_{50} érték számítható legyen, elegendő az érték grafikus becslését megadni.

Amennyiben két egymást követő koncentráció, amelyek hányadosa 2,2, 0 és 100%-os immobilizációt produkál, úgy ez a két koncentráció érték elegendő az EC_{50} értékét magában foglaló tartomány meghatározásához.

Amennyiben a megfigyelések arra utalnak, hogy a vizsgálati anyag stabilitása vagy homogenitása nem tartható fenn, úgy ezt a tényt is foglaljuk bele a jelentésbe, és az eredmények értelmezése során ennek figyelembevételével járunk el.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

Amennyiben lehetséges, az eredménylap az alábbiakat tartalmazza:

- a tesztszervezetre vonatkozó adatok (tudományos név, törzs, szállító vagy származás, esetleges előkezelés, tenyésztési eljárás – beleértve a származást, a táplálék típusát és mennyiségét, az etetés gyakoriságát);
- a hígítóvíz eredete és főbb kémiai tulajdonságai (pH, keménység, hőmérséklet);
- alacsony vízdoldékonyságú anyag esetében a törzs- és a tesztoldatok készítésének módja;
- az esetlegesen alkalmazott segédanyagok koncentrációja;
- az alkalmazott koncentrációk listája, és az egyes koncentrációknál a vizsgálati anyag tesztoldatban való stabilitásával kapcsolatos, rendelkezésre álló adatok;

- amennyiben sor került kémiai elemzésekre, az alkalmazott módszerek és a kapott eredmények;
- az esetlegesen végrehajtott tűrésteszt eredményei;
- a vizsgálati berendezések ismertetése;
- megvilágítás (naponta mennyi ideig);
- a vizsgálati oldatokban mért oldotoxigén-koncentrációk, pH-értékek és hőmérsékletek;
- a minőségi kritériumok teljesítésének igazolása;
- a kumulatív immobilizáció valamennyi javasolt megfigyelési időpontban (24 és 48 óra), valamennyi koncentráció, illetve kontroll (valamint az esetlegesen alkalmazott segédanyagkontroll) tekintetében feltüntető táblázat;
- a vizsgálat végén szerkesztett hatásgörbe ábrázolása;
- amennyiben lehetséges, valamennyi javasolt megfigyelési időpontra vonatkozó EC₅₀-értékek (95%-os konfidenciahatárok mellett);
- az EC₅₀-értékek meghatározásához használt statisztikai eljárások;
- referenciaanyag alkalmazása esetén a kapott eredmények;
- a vizsgálat során az immobilizációt nem okozó legmagasabb vizsgált koncentráció;
- a vizsgálat során a 100%-os immobilizációt előidéző legalacsonyabb vizsgált koncentráció.

4. IRODALOMJEGYZÉK

1. OECD, Paris, 1981, Test Guidelines 202, Decision of the Council C (81) 30 final and updates
2. International Standard ISO, Water Quality – Determination of inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus, ISO 6341-1989.
3. AFNOR Inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – crustacea) NFT 90 301 (January 1983).
4. Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Daphnien-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
5. DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38412 (L1) und L (11).
6. Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.
7. Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluating dose-effect experiments, J. Pharmacol. and Exper. Ther., 1949, vol. 96, 99-113.
8. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793-821.
9. Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res. 1970, vol. 4, 3-32.
10. Stephan, C.E. Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM, 1977, STP 634, 65-84.
11. Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R.W. A computer program for calculating an LC50. US EPA.

1. Függelék

Művíz

Példa megfelelő hígítóvízre (az ISO 6341 szerint)

Valamennyi vegyi anyagnak analitikai tisztaságúnak kell lennie.

Jó minőségű desztillált vizet, vagy $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ értéknél kisebb vezetőképességgel rendelkező ioncserélt vizet alkalmazunk.

A víz desztillálásához használt berendezés nem tartalmazhat rézből készült alkatrészt.

Törzsoldatok

CaCl ₂ ·2H ₂ O (kalciumklorid-dihidrát):	11,76 g
Vízben oldjuk, majd kiegészítjük 1 literre	
MgSO ₄ ·7H ₂ O (magnéziumsulfát-heptahidrát):	4,93 g
Vízben oldjuk, majd kiegészítjük 1 literre	
NaHCO ₃ (nátrium-hidrogénkarbonát):	2,59 g
Vízben oldjuk, majd kiegészítjük 1 literre	
KCl (káliumklorid):	0,23 g
Vízben oldjuk, majd kiegészítjük 1 literre	

Hígításhoz használható művíz

A fenti négy törzsoldat mindegyikéből 25 ml-t összekeverünk, majd ezt 1 literre kiegészítjük.

Az így kapott folyadékot levegőztetjük, amíg az oldott oxigén koncentrációja el nem éri a levegőtelítettségi értéket.

A pH-értéknek a $7,8 \pm 0,2$ tartományba kell esnie.

Amennyiben szükséges, a pH-t NaOH (nátrium-hidroxid) vagy HCl (sósav) adagolásával beállítjuk.

Az így elkészített hígítóvizet 12 óráig állni hagyjuk, és a továbbiakban nem szükséges levegőztetni.

Ebben az oldatban a Ca- és Mg-ionok összege 2,5 mmol literenként. A Ca:Mg arány 4:1, a Na:K arány pedig 10:1. Az oldat teljes lúgossága 0,8 mmol literenként.

A hígítóvíz elkészítése során a fent leírt elkészítési módtól való esetleges eltérés nem befolyásolhatja a víz összetételét vagy tulajdonságait.

2. Függelék

Egy 1978-ban elvégzett EGK-körvizsgálat eredményeinek összefoglalása (lásd az Irodalom 2. pontját)

Figyelem: e körvizsgálat célja a 24 órás EC₅₀ érték meghatározása volt.

Alkalmazott anyagok:

1. Káliumdikromát
2. Tetrapropil-benzol-szulfonsav
3. Tetrapropil-benzol-szulfonsav nátriumsója
4. Triklór-2,4,5-fenoxiecetsav káliumsója

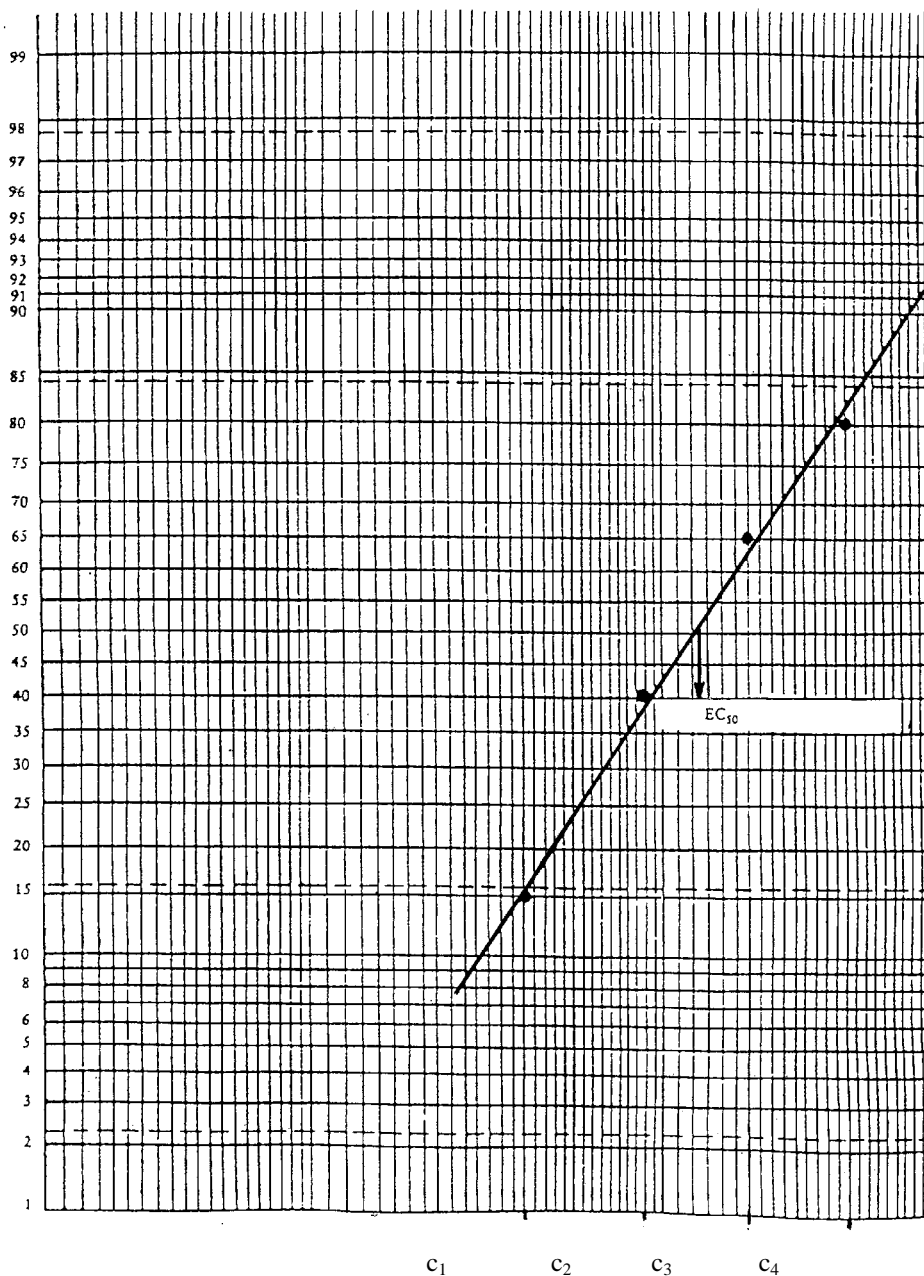
Anyag	Résztevő laboratóriumok száma	Eredmények száma	EC ₅₀ 24 h mg/l átlagérték
1	46	129	1,5
2	36	108	27
3	31	84	27
4	32	72	770

3. Függelék

Példa a koncentráció függvényében vizsgált százalékos immobilizációs görbe szerkesztésére

Példa az EC_{50} -érték meghatározására log-probit papíron

Százalékos immobilizáció



C.3. ALGASZAPORODÁS-GÁTLÁSI TESZT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálat célja meghatározni a vizsgálati anyag egy egysejtű zöldalgafaj növekedésére gyakorolt hatásait. Ezzel a viszonylag rövid időtartamú (72 óra) vizsgálatlalt több generáció vonatkozásában felmérhetjük az anyagok hatásait. A módszer több egysejtű algafajra adaptálható, ilyenkor az eredménylapnak tartalmaznia kell az alkalmazott módszer ismertetését.

Ez a módszer legkönnyebben olyan vízben oldódó anyagok esetében alkalmazható, amelyek a vizsgálat körülményei között várhatóan oldatban maradnak.

A módszer csak olyan anyagok esetében alkalmazható, amelyek közvetlenül nem zavarják az algaszaporodás mérését.

Amennyiben lehetséges, a vizsgálat megkezdését megelőzően lehetőleg szerezzünk adatokat a vizsgálati anyag vízzoldékonyságáról, gőznyomásáról, kémiai stabilitásáról, disszociációs állandóiról és biológiai lebonthatóságáról.

Az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló további adatokat (pl. szerkezeti képlet, tisztasági fok, lényeges szennyeződések jellege és százalékos aránya, esetleges adalékanyagok mennyisége, és n-oktanol/víz megoszlási koefficiens) is vegyük figyelembe a vizsgálat tervezése és az eredmények értelmezése során egyaránt.

1.2. Definíciók és mértékegységek

Sejtsűrűség: sejtek száma milliliterenként;

Növekedés: a vizsgálat időtartama során a sejtsűrűségben bekövetkezett változás;

Növekedési ráta : sejtsűrűség növekedése egységnyi idő alatt;

EC₅₀: jelen esetben a tesztanyag azon koncentrációja, amely 50%-os csökkenést idéz elő vagy a növekedésben (EbC₅₀), vagy a növekedési rátában (ErC₅₀) a kontrollhoz képest;

NOEC (megfigyelhető hatást nem okozó koncentráció): jelen esetben, az a legmagasabb vizsgált koncentráció, amelynél nem figyelhető meg szignifikáns növekedésgátlás a kontrollhoz képest.

A vizsgálati anyagok koncentrációit tömeg/térfogat formában fejezzük ki (milligramm/liter), de használjuk a tömeg/tömeg (mg/kg) formát is.

1.3. Referenciaanyagok

A vizsgálat végrehajtható referenciaanyag alkalmazásával, annak igazolására, hogy laboratóriumi vizsgálati körülmények között a vizsgált faj érzékenysége lényeges mértékben nem változott.

Ha alkalmazunk referenciaanyagot, akkor a vizsgálati jegyzőkönyben az eredményeket közölni kell. Kálium-dikromát használható referenciaanyagként, de a színe befolyásolhatja a sejtek számára rendelkezésre álló fény minőségét és intenzitását, illetve az esetlegesen alkalmazott spektrofotometriás méréseket. A kálium-dikromátot egy nemzetközi körvizsgálat során tesztelték [lásd az Irodalom (3) pontját és a 2. Függelékét].

1.4. A módszer elve

Végrehajthatunk egy tûrtesttet 100 mg/liter koncentráció alkalmazásával, annak bizonyítására, hogy az EC₅₀ nagyobb ennél a koncentrációnál.

Bizonyos zöldalgák exponenciálisan növekedő tenyészeit meghatározott körülmények között, a vizsgálati anyag különböző koncentrációjú oldataiban tenyésztjük több generáción keresztül.

A tesztoldatokat 72 órán át inkubáljuk, és a sejtsűrűséget valamennyi oldatban legalább 24 óránként megállapítjuk, majd meghatározzuk a növekedésgátlás mértékét a kontrolltenyészethez képest.

1.5. Minőségi kritériumok

Az előírt minőségi kritériumok egyaránt vonatkoznak a tûrtestre és a teljes vizsgálati módszerre.

A kontroll tenyészetekben a sejtsűrűségnek legalább 16-szorosára kell nőnie három napon belül.

A vizsgálati anyag koncentrációja a vizsgálat teljes időtartama alatt nem csökkenhet a kiindulási koncentráció 80%-a alá.

A vizsgálati közegben könnyen oldódó, stabil oldatokat képző anyagok – tehát olyan anyagok, amelyek jelentős mértékben nem párolognak, bomlanak, hidrolizálnak vagy adszorbeálódnak – esetében az induló koncentrációt azonosnak tekinthetjük a névleges (nominális) koncentrációval.

Alkalmasságon bizonyítani kell, hogy a koncentrációk a vizsgálat teljes időtartama alatt megfelelőek voltak, illetve, hogy a minőségi kritériumok teljesültek.

Azon anyagok esetében, amelyek

(i) rosszul oldódnak a vizsgálati közegben, vagy

(ii) stabil emulziót vagy diszperziót képeznek, vagy

(iii) vizes oldatokban nem stabilak,

kezdeti koncentrációnak azt a koncentrációt tekintjük, amelyet a vizsgálat kezdetekor mérünk. A koncentrációt a kiegyenlítődési periódust követően kell megállapítani.

A vizsgálat során minden esetben további méréseket végzünk a tényleges expozíciós koncentráció, illetve a minőségi kritériumok teljesülésének ellenőrzésére.

Ismert jelenség, hogy a vizsgálati anyagból a vizsgálat időtartama alatt jelentős mennyiség beépülhet az algabiomasszába. Ezért a fent említett minőségi kritériumok teljesülésének ellenőrzése során a vizsgálati anyag algabiomasszába beépült és az oldatban lévő (amennyiben ennek közvetlen mérése technikailag nem kivitelezhető, úgy a vízoszlopban mért) mennyiségeit egyaránt figyelembe kell venni. Mivel az algabiomasszában lévő tesztanyag koncentrációjának mérése komoly technikai problémákba ütközhet, ezért a minőségi kritériumok teljesülése igazolható oly módon is, hogy a vizsgálatba beiktatunk egy olyan edényt is, amely az alkalmazott legmagasabb koncentrációjú oldatot tartalmazza, de algát nem, és ebben az oldatban (vagy, amennyiben ez technikailag nem kivitelezhető, a vízoszlopban) mérjük meg a tesztanyag koncentrációját a vizsgálat kezdetekor és végén.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Reagensek

1.6.1.1. A vizsgálati anyagokból készített oldatok

Megfelelő töménységű törzsoldatokat készítünk, oly módon, hogy a vizsgálati anyagot feloldjuk ioncserélt vízben, vagy az 1.6.1.2. pontban leírtaknak megfelelő vízben.

A vizsgálat során használni kívánt koncentrációkat úgy állítjuk be, hogy a törzsoldatból adott mennyiségeket adunk alga tenyészetéhez (lásd az 1. Függelék). Az anyagokat normális esetben csak az oldhatósági határig kell vizsgálni. Egyes anyagok esetében (pl. olyan anyagok, amelyek vízben való oldhatósága alacsony, n-oktanol/víz megoszlási hányados értéke magas, illetve amelyek vízben valódi oldat helyett stabil diszperziókat képeznek) elfogadható egyetlen, az oldhatósági határt meghaladó koncentráció alkalmazása a vizsgálat során, hogy biztosak lehessünk abban, hogy vizsgáltuk a maximális oldhatósági/stabilitási koncentrációt. Vigyázni kell azonban arra, hogy ez a koncentráció semmilyen egyéb tekintetben ne zavarja meg a vizsgálati rendszert (pl. az anyagból a víz felszínén képződött, és a víz oxigénellátását akadályozó film révén stb.).

Alacsony vízdoldékonyságú anyagok esetében a törzsoldatok készítéséhez, illetve a vizsgálati közegben való diszpergálás megkönnyítésére alkalmazhatunk ultrahangos diszpergálást, szerves oldószereket, emulgeálószeret, illetve diszpergálószeret. Amennyiben segédanyagokat alkalmazunk, úgy valamennyi koncentrációnak azonos mennyiségű segédanyagot kell tartalmaznia. Be kell állítani segédanyagkontrollt is, mely a segédanyagot azonos koncentrációban tartalmazza. Törekedjünk az alkalmazott segédanyagok koncentrációjának minimalizálására, de a segédanyag-koncentráció a vizsgálati közegben semmilyen körülmények között nem lépheti túl a 100 mg/liter értéket.

A vizsgálatot a pH-érték beállítása nélkül végezzük. Amennyiben a pH-érték határozott megváltozására utaló jelek vannak, úgy a vizsgálatot a pH beállítása után meg kell ismételni, és az eredményeket ismertetni kell. Ebben az esetben a törzsoldat pH-értékét a hígítóvíz pH-értékéhez igazítjuk, kivéve, ha specifikus indokok szólnak ez ellen. Erre a célra lehetőleg HCl-ot és NaOH-ot használjunk. Ezt a pH-beállítást úgy kell végrehajtani, hogy a vizsgálati anyag koncentrációja a törzsoldatban lényegében ne változzon. Amennyiben a pH-beállítás következtében bármilyen kémiai reakció, vagy a vizsgált vegyület fizikai kicsapódása tapasztalható, úgy azt bele kell foglalni a jelentésbe.

1.6.1.2. Vizsgálati közeg

Jó minőségű desztillált vizet, vagy $5 \mu\text{Scm}^{-1}$ értéknél kisebb vezetőképességgel rendelkező ioncserélt vizet alkalmazunk. A víz desztillálásához használt berendezés nem tartalmazhat rézből készült alkatrészt.

Az alábbi közeg alkalmazása ajánlott:

Az alábbi táblázat alapján négy törzsoldatot készítünk. A törzsoldatokat membránszűrővel vagy autoklávban sterilizáljuk, és 4 °C-on, sötétben tároljuk. A 4. számú törzsoldatot csak membránszűrés útján szabad sterilizálni. A végső tápanyag-koncentrációkat a törzsoldatok megfelelő hígításával érjük el.

Tápanyag	Koncentráció a törzsoldatban	Végső koncentráció a tesztoldatban
<i>1. törzsoldat: makrotápanyagok</i>		
NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l
KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l
<i>2. törzsoldat: Fe-EDTA</i>		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	80 mg/l	0,08 mg/l
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/l	0,1 mg/l
<i>3. törzsoldat: nyomelemek</i>		
H ₃ BO ₃	185 mg/l	0,185 mg/l
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l	0,415 mg/l
ZnCl ₂	3 mg/l	3 × 10 ⁻³ mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 × 10 ⁻³ mg/l
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l	10 ⁻⁵ mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l	7 × 10 ⁻³ mg/l
<i>4. törzsoldat: NaHCO₃</i>		
NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l

A közeg pH-értéke levegőztetés után körülbelül 8.

1.6.2. Eszközök.

- Általános laboreszközök,
- Megfelelő űrtartalmú tesztedények (pl. 250 ml-es Erlenmeyer-lombikok megfelelőek, ha a tesztoldat térfogata 100 ml). A vizsgálathoz azonos méretű és anyagú lombikokat kell használni.
- Olyan szekrény vagy kamra, amelyben fenntartható az egyenletes, $21-25 \pm 2$ °C-os hőmérséklet, és a 400–700 nm-es spektrális tartományban folyamatos és egyenletes megvilágítás biztosítható. Ha a kontrolltenyészetekben lévő algák elérték a javasolt növekedési rátákat, kimondható, hogy a növekedés feltételei, beleértve a fény intenzitását, megfelelőek voltak.

A javasolt átlagos fényintenzitás a 400–700 nm-es tartományban, megfelelő műszerrel mérve, a tesztoldatok szintjén $60-120 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($35-70 \times 10^{18}$ foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Luxban kalibrált fénymérő műszerek esetében az ezzel egyenértékű 6000–10 000 luxos tartomány tekinthető elfogadhatónak.

Megfelelő fényintenzitás érhető el például az algatenyésztőtől 0,35 m-re elhelyezett 4–7 darab 30 W-os fehér (megközelítőleg 4300 K színhőmérsékletű) fénycső segítségével.

- A sejtsűrűségméréseket lehetőleg az élő sejtek közvetlen számlálásán alapuló módszerrel kell elvégezni, pl. mikroszkópos számlálókamra alkalmazásával. Egyéb eljárások (pl. fotometria, turbidimetria stb.) is alkalmazhatóak, amennyiben megfelelően érzékenyek, és bizonyítottan megfelelően korrelálnak a sejtsűrűséggel.

1.6.3. Tesztszervezetek

Olyan zöldalgafaj alkalmazása javasolt, amely gyorsan szaporodik, könnyen tenyészthető, illetve vizsgálható. Tesztelésre leggyakrabban a következő fajokat használják:

- *Selenastrum capricornutum*, pl. ATCC 22662 vagy CCAP 278/4,
- *Scenedesmus subspicatus*, pl. 86.81 SAG.

Megjegyzés:

ATCC = American Type Culture Collection (USA)

CCAP = Culture Centre of Algae and Protozoa (Egyesült Királyság)

SAG = Collection of algal culture (Göttingen, Németország)

Egyéb faj alkalmazása esetén a törzs megnevezését is fel kell tüntetni.

1.6.4. A vizsgálat menete

Az elővizsgálat eredményei alapján választjuk ki a minősítő teszt koncentrációtartományát.

A növekedés mértékének tekintett két tényező (biomassza és növekedési ráta) mérése során egymástól lényegesen eltérő eredményeket kaphatunk, éppen ezért az elővizsgálat esetében mindkettőt mérjük annak érdekében, hogy a minősítő tesztben alkalmazandó koncentrációk mértani sorozata lehetővé tegye mind az EbC_{50} , mind az ErC_{50} érték becslését.

Kezdeti sejtsűrűség

Selenastrum capricornutum és *Scenedesmus subspicatus* esetén a vizsgálati tenyészetek javasolt induló sejtsűrűsége kb. 104 sejt/ml; egyéb faj alkalmazása esetén a biomassza ehhez hasonló legyen.

A vizsgálati anyag koncentrációi

A vizsgálat során legalább öt különböző koncentrációt kell alkalmazunk; a koncentrációkat úgy állapítsuk meg, hogy azok egy mértani sorozatot alkossanak, melynek szorzótényezője nem nagyobb mint 2,2. A legalacsonyabb koncentrációt úgy válasszuk ki, hogy az ne gyakoroljon megfigyelhető hatást az algák növekedésére. A legmagasabb vizsgált koncentráció legalább 50%-kal gátolja az algák növekedését a kontrollhoz képest; lehetőleg olyan koncentrációt válasszunk, amely teljes gátlást okoz.

A párhuzamos vizsgálatok száma és a kontrollok

Valamennyi koncentrációt három párhuzamosban vizsgáljunk. Valamint állítsunk be három vizsgálati anyagot nem tartalmazó kontrollt, és – amennyiben szükséges – három segédanyagkontrollt. Indokolt esetben növelhető a koncentrációk száma, és ezzel egyidejűleg csökkenthető a koncentrációnkénti párhuzamos vizsgálatok száma.

A teszt kivitelezése

A megfelelő mennyiségű vizsgálati anyagot és algaoltóanyagot tartalmazó vizsgálati tenyészetek elkészítése úgy történik, hogy a tesztanyagból készített törzsoldatból alga előtenyészetekhez meghatározott mennyiségeket adunk (lásd az 1. Függelék).

A tenyészeteket tartalmazó lombikokat felrázzuk, és a tenyésztő berendezésbe helyezzük. Az algasejteket rázással, keveréssel vagy levegőztetéssel tartjuk szuszpenzióban, azért, hogy a vizsgálati oldatokban javítsuk a gázcserét és csökkentjük a pH-eltéréseket. A tenyészeteket $21-25 \pm 2$ °C-os hőmérsékleten tartjuk.

A sejtsűrűséget valamennyi lombikban mérjük meg, a vizsgálat megkezdésétől számított legalább 24, 48 és 72 óra elteltével. Ha a sejtsűrűség meghatározására nem közvetlen számlálásos módszert alkalmazunk, a szűrővel algamentesített tesztoldatot használjuk a turbidimetriás és a fotometriás meghatározásoknál a „vak” mérésekhez.

A pH-értéket a vizsgálat megkezdésekor, és 72 óra elteltével állapítjuk meg.

A kontrollok pH-értéke a vizsgálat során normális esetben nem változhat 1,5 egységet meghaladó mértékben.

Illékony anyagok vizsgálata

Jelenleg nincs általánosan elfogadott módszer az illékony anyagok vizsgálatára. Amennyiben egy anyagról ismert, hogy erősen párolog, úgy a vizsgálathoz használhatunk zárt lombikokat megnövelt folyadék feletti légtérrel. A folyadék feletti légtér térfogatának meghatározásakor vegyük figyelembe a CO₂-hiány kialakulásának lehetőségét. A módszer több változatának elfogadását is indítványozták [lásd az Irodalom (4) pontját].

Kísérreljük meg az anyag oldatban maradt mennyiségének meghatározását, és zárt rendszer segítségével vizsgált illékony anyagokra vonatkozó vizsgálati eredmények értékelése során nagy körültekintéssel járjunk el.

Tűrőteszt

Végrehajtható egy tűrőteszt a fent ismertetett módszerrel, 100 mg/liter koncentráció alkalmazásával, annak bizonyítására, hogy az EC₅₀ nagyobb ennél a koncentrációnál.

Amennyiben az anyag természete miatt a vizsgálati közegben nem érhető el a 100 mg/liter koncentráció, úgy a tűrőtesztet az anyag vizsgálati közegben való oldékonyságával megegyező koncentráció (vagy a stabil diszperziót képző maximális koncentráció) alkalmazásával hajtjuk végre (lásd még az 1.6.1.1. pontot).

A tűrőtesztet legalább három párhuzamosban végezzük, három kontroll alkalmazásával. A tűrőteszt során mind a biomasszát, mind a növekedési rátát meg kell határozni.

Amennyiben a tűrőteszt során a biomasszában vagy a növekedési rátában a kontrollhoz viszonyított átlagos csökkenés eléri a 25%-ot, úgy szükséges egy teljes vizsgálat elvégzése.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A vizsgálati tenyészetekben és a kontrollokban mért sejtsűrűségeket, a megfelelő koncentrációs értékekkel és megfigyelési időpontokkal együtt táblázatos formában tüntetjük fel. Az egyes vizsgálati koncentrációk és a kontrollok esetében mért sejtsűrűségek átlagértékeit az idő függvényében (0–72 h) ábrázoljuk, és megszerkesztjük a növekedési görbéket.

A koncentráció/hatás összefüggés meghatározása során a következő két megközelítést alkalmazzuk. Egyes anyagok alacsony koncentrációban stimulálhatják a növekedést. Csak azon adatpontokat vesszük figyelembe, amelyek 0 és 100% közé eső növekedésgátlásra utalnak.

2.1. A növekedési görbék alatti területek összehasonlítása

A növekedési görbék és az $N = N_0$ vízszintes vonal közé eső terület az alábbi képlet segítségével számolható ki:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1}),$$

ahol:

A = terület

N_0 = mért sejtszám/milliliter a t_0 időpontban (a vizsgálat kezdetekor),

N_1 = mért sejtszám/milliliter a t_1 időpontban,

N_n = mért sejtszám/milliliter a t_n időpontban,

t_1 = a vizsgálat megkezdését követő első mérés időpontja,

t_n = a vizsgálat megkezdését követő n-edik mérés időpontja,

n = a vizsgálat megkezdését követően végzett mérések száma.

A növekedésgátlás százalékos aránya (I_A) az egyes anyagkoncentrációk vonatkozásában az alábbi képlet segítségével számolható ki:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100,$$

ahol:

A_c = a kontroll növekedési görbe és az $N = N_0$ vízszintes vonal közötti terület,

A_t = a t koncentrációra vonatkozó növekedési görbe és az $N = N_0$ vízszintes vonal közötti terület.

Az I_A értékeket féllogaritmikus vagy féllogaritmikus probit papíron ábrázoljuk a koncentráció függvényében. Probit papír alkalmazása esetén a pontokra egyenest illesztünk, vagy szemre, vagy számított regresszió alapján.

Az EC_{50} értékét az illesztett görbe, illetve egyenes segítségével becsüljük, oly módon, hogy leolvassuk az 50%-os növekedésgátláshoz tartozó koncentrációt ($I_A = 50\%$). Az érték és a megállapításához alkalmazott módszer egyértelmű jelzése céljából az EbC_{50} jelölés használata javasolt. Az EbC_{50} érték feltüntetésekor alapvető fontosságú a megfelelő expozíciós idő jelzése is, pl. $EbC_{50}(0-72\text{ h})$.

2.2. Növekedési ráták összehasonlítása

Exponenciálisan növekvő tenyészetek esetében az átlagos specifikus növekedési ráta (μ) az alábbi képlet segítségével számítható ki:

$$m = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n - t_0},$$

ahol t_0 a vizsgálat kezdetének időpontja.

Az átlagos specifikus növekedési rátát megkaphatjuk az $\ln N/\text{idő}$ függvény regressziós egyenesének meredekségéből is.

A specifikus növekedési ráta egyes anyagkoncentrációkra vonatkozó százalékos gátlása (I_m) az alábbi képlet segítségével számítható ki:

$$I_m = \frac{m_c - m_t}{m_c} \times 100,$$

ahol:

μ_c = átlagos specifikus növekedési ráta a kontroll esetében,

μ_t = átlagos specifikus növekedési ráta a t vizsgálati koncentráció esetében.

Az átlagos specifikus növekedési ráta kontrollhoz viszonyított százalékos csökkenését valamennyi vizsgálati koncentráció esetében a koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoljuk. Az így kapott függvényből leolvasható az EC_{50} értéke. Ezen érték, és a megállapításához alkalmazott módszer egyértelmű jelzése céljából az ErC_{50} jelölés használata javasolt. Az ErC_{50} érték feltüntetésekor jelezni kell a mérési időt is, pl. 0 és 72 óra esetén az alkalmazandó jelölés: $ErC_{50}(0-72\text{h})$.

Megjegyzés: a specifikus növekedési ráta logaritmikus mennyiség, és a növekedési ráta kis mértékű eltérése jelentős változásokat okozhat a biomasszában. Éppen ezért az EbC és ErC értékek számszerűen nem összevethetők.

2.3. A NOEC kiszámítása

A megfigyelhető hatást nem okozó koncentrációt (NOEC) megfelelő többminta összehasonlítás céljára használt statisztikai eljárás (pl. varianciaanalízis és Dunnett-próba) segítségével határozzuk meg, a párhuzamos vizsgálatok átlagolatlan A- (növekedési görbe alatti területek; lásd a 2.1. pontot) vagy μ -értékeinek (specifikus növekedési ráták; lásd a 2.2. pontot) felhasználásával.

3. AZ EREDMÉNYLAP

Amennyiben lehetséges, az eredménylap az alábbi információkat tartalmazza:

- a vizsgálati anyag kémiai azonosító adatai;
- a tesztszervezetek: eredete, laboratóriumi tenyészet, törzsszáma, a tenyésztés módja;
- vizsgálati körülmények:
 - = a vizsgálat kezdetének és végének dátuma, valamint a vizsgálat időtartama,
 - = hőmérséklet,
 - = a tápoldat összetétele,
 - = a tenyésztéshez használt berendezések,
- az oldatokban a vizsgálat kezdetekor és végén mért pH-értékek (amennyiben a pH-értékek közötti eltérés meghaladja az 1,5 egységet, úgy az eredménylapon a változás magyarázatát is fel kell tüntetni),

- a tesztanyag oldásához használt segédanyag és az oldási eljárás ismertetése, valamint a segédanyag koncentrációja a tesztoldatokban,
- a fény intenzitása és minősége,
- a vizsgált – mért vagy névleges – koncentrációk;
- eredmények:
 - = sejtsűrűség az összes lombikban valamennyi mérési időpontban, valamint a sejtsűrűség mérésére használt módszer,
 - = átlagos sejtsűrűségek,
 - = növekedési görbék,
 - = a koncentráció/hatás összefüggés grafikus ábrázolása,
 - = EC-értékek és kiszámításuk módja,
 - = NOEC
 - = egyéb megfigyelt hatások.

4. IRODALOM

1. OECD, Párizs, 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.

1. Függelék

Példa algatenyésztési eljárásra

Általános megjegyzések

Az alábbi módszer szerinti tenyésztés célja a toxicitási vizsgálatokhoz használható algatenyészetek előállítása.

Az algatenyészetek baktériumokkal való fertőződését alkalmas módszerek segítségével meg kell akadályozni (ISO 4833). Nem feltétlenül szükséges, hogy a tenyészet axenikus legyen. Viszont elengedhetetlen követelmény, hogy a tenyészet csak egyféle algát tartalmazzon.

Valamennyi műveletet steril körülmények között végzünk, hogy elkerüljük a baktériumokkal és egyéb algákkal való szennyeződést. A szennyezett tenyészetek tesztelésre nem használhatók.

Algatenyészetek előállítására szolgáló eljárások

A tápoldatok készítése

A tápoldatot koncentrált törzsoldatok hígításával készítjük. Ha szilárd táptalajt készítünk, 0,8% agart adunk hozzá. A tápoldatokat sterilizálni kell. Az autoklávban történő sterilizálás során az NH₃ elveszhet.

Törzstenyészet

A törzstenyészetek olyan kis méretű algatenyészetek, melyeket rendszeresen friss tápoldatba oltunk, és a tesztben oltóanyagként használunk. Ha a tenyészeteket nem használjuk rendszeresen, akkor ferde agarra szélesztjük őket. Ezeket legalább kéthavonta friss médiumba oltjuk.

A törzstenyészeteket kb. 100 ml megfelelő tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer-lombikokban tenyésztjük. Ha az algákat 20 °C-on, folyamatos megvilágítás mellett tartjuk, hetente át kell oltani őket.

Az átoltás során bizonyos mennyiséget a „régiből” tenyészetből steril pipetta segítségével egy friss tápfolyadékot tartalmazó lombikba tesszük, úgy, hogy gyorsan növekvő faj esetén az induló koncentráció kb. a régi tenyészetének a századrésze legyen.

Egy faj növekedési rátája (sebessége) a növekedési görbe alapján határozható meg. Ha ez ismert, becsülhető az a sejtsűrűség, amely elérésekor a tenyészetet át kell oltani. Ezt még az előtt kell megtenni, hogy a tenyészet elérné az elhalás fázisát.

Előtenyésztés

Az előtenyésztés célja a vizsgálati tenyészetek beoltásához megfelelő mennyiségű alga biztosítása. Az előtenyészetet a vizsgálat során alkalmazott körülmények között tartjuk, és még az exponenciális növekedés fázisában felhasználjuk.

Általában kb. háromnapos tenyészeteket alkalmazunk. A deformált vagy abnormális sejteket tartalmazó algatenyészeteket eldobjuk.

2. Függelék

Az ISO 8692 szabvány – Vízminőség – az alábbi, a *Scenedesmus subspicatus* és *Selenastrum capricornutum* édesvízi zöldalgákkal végzett, kálium-dikromát vizsgálatára irányuló (16 laboratórium részvételével végzett) toxikológiai körvizsgálat eredményeit közli:

	Átlagértékek (mg/l)	Tartomány (mg/l)
ErC ₅₀ (0–72 h)	0,84	0,60–1,03
EbC ₅₀ (0–72 h)	0,53	0,20–0,75

C.4. A GYORS BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG VIZSGÁLATA

I. RÉSZ: ÁLTALÁNOS MEGÁLLAPÍTÁSOK

I.1. Bevezetés

Ebben a szakaszban hat vizsgálati módszert ismertetünk, amelyek lehetővé teszik vegyi anyagok tesztelését könnyű biológiai lebonthatóság szempontjából aerob vizes közegben:

- Oldott szerves szén (Dissolved Organic Carbon, DOC) csökkenés (C.4-A Módszer)
- Módosított OECD teszt – DOC-csökkenés (C.4-B Módszer)
- Szén-dioxid (CO₂) fejlődés (Módosított Sturm Teszt) (C.4-C Módszer)
- Manometriás Respirometria (C.4-D Módszer)
- Zárt palack módszer (C.4-E Módszer)

f) MITI-teszt (Ministry of International Trade and Industry: Nemzetközi Kereskedelmi és Ipari Minisztérium, Japán) (C.4-F Módszer)

A módszer leírásának I. részében a mind a hat vizsgálatra érvényes általános és közös megállapítások kerülnek ismertetésre. Az egyes módszerekre vonatkozó tudnivalókat a II–VII. részek tartalmazzák. A mellékletekben definíciók, képletek és útmutatások találhatók.

Egy 1988-ban lebonyolított OECD-laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálat megmutatta, hogy a módszerek egymással egyező eredményeket adnak, azonban konkrét esetben a vizsgálandó anyag fizikai tulajdonságait figyelembe véve, egyik vagy másik módszer megfelelőbb lehet.

I.2. A megfelelő módszer kiválasztása

A leginkább megfelelő módszer kiválasztásához elengedhetetlen az adott vegyi anyag oldhatóságára, gőznyomására és adszorpciós tulajdonságaira vonatkozó adatok ismerete. Az anyag paramétereit – pl. ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, KOI (lásd az I. és II. Mellékletet) – elméleti értékeinek kiszámításához, illetve mért értékeinek ellenőrzéséhez szükséges a kémiai szerkezet vagy képlet ismerete is.

Azok az anyagok, amelyek vízben legalább a 100 mg/l-es értékig oldódnak, nem illékonyak és nem adszorbeálóak bármelyik módszer segítségével vizsgálhatók. Azon anyagok esetében, amelyek vízben rosszul oldódnak, illékonyak vagy adszorbeálóak, az 1. táblázat tartalmazza a megfelelő módszereket. A vízben rosszul oldódó vegyi anyagok és illékony vegyi anyagok kezelésének módját a III. Melléklet ismerteti. Közepesen illékony vegyi anyagok vizsgálhatóak a DOC-csökkenést mérő módszerrel, amennyiben elegendő gáztér áll rendelkezésre a vizsgálati edényekben (amelyeket megfelelő módon le kell zárni). Ebben az esetben egy abiotikus kontrollt alkalmazunk a vizsgálati anyag mennyiségének fizikai okokra visszavezethető csökkenésének figyelemmel kísérésére.

1. táblázat: A vizsgálati módszerek alkalmazhatósága

Vizsgálat	Analitikai módszer	Alkalmasság olyan anyagok esetében, amelyek		
		rosszul oldódnak	illékonyak	adszorbeálódnak
DOC-csökkenés	Oldott szerves szén	–	–	+ / –
Mód. OECD DOC-csökkenés	Oldott szerves szén	–	–	+ / –
CO ₂ -fejlődés	Respirometria: CO ₂ - fejlődés	+	–	+
Manometriás respirometria	Manometriás respirometria: oxigén fogyasztás	+	+ / –	+
Zárt palack	Respirometria: oldott oxigén	+ / –	+	+
MITI	Respirometria: oxigénfogyasztás	+	+ / –	+

A kapott eredmények értelmezéséhez szükség van a vizsgálati anyag tisztaságára, illetve főbb összetevőinek relatív arányaira vonatkozó adatokra, különösen kismértékű lebonthatóság vagy szélsőséges eredmények esetén. A vizsgálati anyag baktériumokkal szembeni toxicitására vonatkozó adatok (IV. Melléklet) hasznosak lehetnek a megfelelő vizsgálati koncentrációk meghatározása során, és nélkülözhetetlenek az alacsony biológiai lebomlási értékek helyes értelmezése szempontjából.

1.3. Referenciaanyagok

A fő vizsgálatnál párhuzamosan olyan referenciaanyagokat is tesztelünk, melyek megfelelnek a könnyű biológiai lebonthatóság kritériumainak.

E célra megfelelő vegyi anyagok a frissen desztillált anilin, a nátrium-acetát, valamint a nátrium-benzoát. Ezen referenciaanyagok közül valamennyi lebomlik az itt ismertetett eljárások során, akkor is, ha oltóanyagot nem alkalmazunk.

Javaslatként felmerült, hogy olyan referenciaanyagot is kellene keresni, amely biológiailag könnyen lebontható, de oltóanyag alkalmazását igényli. Egy ilyen javasolt anyag a kálium-hidrogén-ftalát, de további vizsgálatokra van szükség, mielőtt ez az anyag elfogadható lesz referenciaanyagként.

A respirometriás vizsgálatok során a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció következtében befolyásolhatják az oxigénfelvételt (lásd a II. és V. Mellékleteket).

1.4. A vizsgálati módszerek elve

A vizsgálandó anyagot sóoldatban (ásványianyag-táppaladban) feloldjuk vagy szuszpendáljuk, majd beoltjuk, és aerob körülmények között sötétben vagy diffúz fényben inkubáljuk. A vizsgálati oldatban az oltóanyagban jelen lévő DOC (oldott szerves szén) mennyiségének lehetőleg jóval kisebbnek kell lennie a vizsgálati anyagban jelen lévő DOC mennyiségéhez képest. Az oltóanyag endogén aktivitásának vizsgálatára vakpróbát is beállítunk oly módon, hogy oltóanyagot igen, de vizsgálandó anyagot ne tartalmazzon. Megjegyzendő, hogy a sejtek endogén aktivitása a vizsgálandó anyag jelenlétében nem fog pontosan megegyezni a vizsgálandó anyagot nem tartalmazó kontroll esetében tapasztalt endogén aktivitással. A vizsgálatot párhuzamosan egy referenciaanyaggal is elvégezzük, az eljárás ellenőrzése céljából.

A lebomlási folyamatot általában a megfelelő paraméterek – pl. DOC, CO₂ fejlődés, és oxigénfelvétel – meghatározása révén követjük figyelemmel. A méréseket megfelelő gyakorisággal kell végezni ahhoz, hogy a biológiai lebomlási folyamat kezdete és vége meghatározható legyen. Automata respirométer alkalmazása esetén a mérés folyamatos. A DOC mennyiségét néha más paraméterekkel együtt határozzuk meg, de erre általában csak a vizsgálat kezdetekor és

végén kerül sor. Specifikus kémiai analízis is alkalmazható a vizsgálati anyag elsődleges lebomlásának felmérésére, illetve az esetlegesen keletkezett köztes anyagok koncentrációjának meghatározására (MITI vizsgálat során kötelező).

A vizsgálat általában 28 napig tart. A vizsgálatot azonban a 28 napos időszak vége előtt is be lehet fejezni, ha a biodegradációs görbe vízszintes szakaszához ért, és e szakaszban maradt legalább három egymást követő meghatározás során. A vizsgálatot meg is lehet hosszabbítani a 28 napos perióduson túl, amennyiben a biodegradációs görbe a biológiai lebomlás megindulását jelzi, de a 28. napra még nem érte el vízszintes szakaszát.

I.5. Minőségi kritériumok

I.5.1. Reprodukálhatóság

A biológiai lebomlás természete, valamint az oltóanyagokban lévő baktériumpopulációk sokfélesége miatt a meghatározásokat legalább két párhuzamosban végezzük.

A tapasztalatok azt mutatják, hogy minél nagyobb az induláskor a vizsgálati közegbe juttatott mikroorganizmusok koncentrációja, annál kisebb mértékű lesz a szórás a párhuzamosan végrehajtott vizsgálatok eredményei között. A körvizsgálatok során az is kiderült, hogy esetenként nagymértékű szórás tapasztalható a különböző laboratóriumok vizsgálati eredményei között, de a biológiailag könnyen lebontható anyagok esetében az eredmények általában hasonlóak.

I.5.2. A vizsgálat érvényessége

Egy vizsgálat akkor tekinthető érvényesnek, ha a biodegradációs görbe vízszintes szakaszának elérésekor, a vizsgálat végén, vagy a „10 napos ablak” végén (ha adott esetben ez is megfelelő) a párhuzamos mérések szélső értékeinek különbsége nem éri el a 20%-ot (tehát az eltérés bármely két érték között kisebb, mint 20%), továbbá a referenciaanyag alkalmazásával végrehajtott párhuzamos vizsgálatban a referenciaanyag százalékos lebomlása 14 napon belül elérte a könnyű biológiai lebonthatóság kritériumainak megfelelő szintet. Ha e két feltétel közül valamelyik nem teljesül, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni. Az eljárások szigorúsága miatt az alacsony értékek nem feltétlenül jelentik azt, hogy az anyag biológiailag nem bontható le környezeti körülmények között, pusztán azt jelzik, hogy további vizsgálatokra van szükség a biológiai lebonthatóság megállapítása érdekében.

Amennyiben egy, a vizsgálati anyagot és egy referenciaanyagot egyaránt alkalmazó toxicitási vizsgálat során 14 nap alatt 35%-ot (DOC alapján) vagy 25%-ot (ThOD vagy ThCO₂ alapján) el nem érő mértékű lebomlás következik be, úgy a vizsgálati anyagok gátló hatásúnak tekinthetők (lásd még a IV. Mellékletet). Ilyenkor a vizsgálatot meg kell ismételni, lehetőség szerint a vizsgálati anyag alacsonyabb koncentrációja és/vagy az oltóanyag magasabb koncentrációja, de 30 mg szilárd anyag/litert meg nem haladó mennyiség alkalmazása mellett.

I.6. Általános eljárások és előkészületek

A vizsgálatok végrehajtásának általános körülményeit a 2. táblázat tartalmazza. Az egyes vizsgálati módszerekhez kapcsolódó berendezések és egyéb kísérleti körülmények a különböző módszereket részletező szakaszokban kerülnek ismertetésre.

2. táblázat: Vizsgálati körülmények

Vizsgálat	DOC csökkenés	CO ₂ fejlődés	Manometriás respiromet-ria	Módosított OECD tesztvizsgálat	Zárt palack	MITI (I)
Vizsgálati anyag koncentrációja						
mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20		10–40		
mg ThOD/l			50–100		5–10	
Oltóanyag koncentrációja (sejt/l, megközelítőleg)	<= 30 mg/l SS vagy <= 100 ml kifolyó szennyvíz/l (10 ⁷ –10 ⁸)			0,5 ml másodlagos szennyvíz/l (10 ⁵)	<= 5 ml kifolyó szennyvíz/l (10 ⁴ –10 ⁶)	30 mg/l SS (10 ⁷ –10 ⁸)
Elemek koncentrációja vizsgálati közegben (mg/l)						
	P	116			11,6	29
	N	1,3			0,13	1,3
	Na	86			8,6	17,2
	K	122			12,2	36,5
	Mg	2,2			2,2	6,6
	Ca	9,9			9,9	29,7
	Fe	0,05–0,1			0,05–0,1	0,15
pH		7,4 ± 0,2				lehetőleg 7,0
Hőmérséklet		22 ± 2 °C				25 ± 1 °C
DOC = Oldott szerves szén		ThOD = Elméleti oxigén igény			SS = Szuszpendált szilárd anyagok	

I.6.1. Hígítóvíz

Erre a célra toxikus anyagokat (pl. Cu^{++} -ionok) gátló koncentrációban nem tartalmazó ioncserélt vagy desztillált vizet alkalmazunk. A víz nem tartalmazhat több szerves szenet, mint a vizsgálati anyag szervesszén-tartalmának 10%-a. A vizsgálatához nagy tisztaságú vizet használunk, hogy elkerüljük a magas vakpróba-értékeket.

Szennyezés okozói lehetnek a víz saját szennyeződései, valamint az ioncserélő gyanták, illetve baktériumok és algák lizált anyaga. Egy vizsgálati sorozathoz egyetlen adag, előzetesen DOC-analízis segítségével ellenőrzött vizet kell alkalmazni. A zárt palack módszer esetében ez az ellenőrzés nem szükséges, de a víz oxigénfogyasztása alacsony kell hogy legyen.

I.6.2. Az ásványianyag-tápanyag-törzsoldatai

Az ásványianyag-tápanyag-törzsoldatot törzsoldatokból állítjuk elő, melyek a kémiai összetevőket megfelelő koncentrációban tartalmazzák. Az alábbi törzsoldatok – különböző hígítási arányok alkalmazásával – a DOC-csökkenés, a módosított OECD-teszt, a CO_2 fejlődés, a manometriás respirometria és a zárt palack módszerekhez is használhatók.

A hígítási arányok, valamint a MITI-vizsgálat során alkalmazandó ásványianyag-tápanyag-törzsoldat elkészítésének ismertetése az egyes módszereket részletező szakaszokban található.

Törzsoldatok

Az alábbi törzsoldatokat analitikai tisztaságú reagensek felhasználásával készítjük el:

(a) Kálium-dihidrogén-foszfát, KH_2PO_4	8,50 g
Dikálium-hidrogén-foszfát, K_2HPO_4	21,75 g
Dinátrium-hidrogén-foszfát-dihidrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,40 g
Ammónium-klorid, NH_4Cl	0,50 g
Vízben oldjuk, majd egy literre kiegészítjük. Az oldat pH-értéke 7,4 legyen.	
(b) Kalcium-klorid, vízmentes, CaCl_2	27,50 g
vagy kalcium-klorid-dihidrát, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,40 g
Vízben oldjuk, majd egy literre kiegészítjük.	
(c) Magnézium-szulfát-heptahidrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,50 g
Vízben oldjuk és vízzel egy literre kiegészítjük.	
(d) Vas (III)-klorid-hexahidrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
Vízben oldjuk, majd 1 literre kiegészítjük.	

Megjegyzés: Annak érdekében, hogy az oldatot ne közvetlenül a felhasználás előtt kelljen elkészíteni, literenként egy csepp cc. HCl-ot vagy 0,4 g EDTA-t adunk hozzá.

I.6.3. A tesztanyag törzsoldatai

Például oldjunk fel 1–10 g vizsgálati vagy referenciaanyagot ioncserélt vízben, és ha az oldhatóság túllépi az 1 g/l értéket, és egészítsük ki 1 literre. Másik lehetőség, hogy a törzsoldatokat az ásványianyag-tápanyag-törzsoldatban készítjük el, vagy a vegyi anyagokat közvetlenül a ásványianyag-tápanyag-törzsoldathoz adjuk. A kevésbé oldékony vegyi anyagok kezelését a III. Melléklet ismerteti, de a MITI vizsgálat (C.4-F Módszer) során sem oldószer, sem emulgeálószer nem alkalmazható.

I.6.4. Oltóanyagok

Oltóanyag több forrásból is beszerezhető: eleveniszap, kifolyó (kezelt) szennyvíz (nem klórozott), felszíni vizek, illetve talajok, vagy ezek keveréke. A DOC-csökkenés, CO_2 -fejlődés, és a manometriás respirometria módszerek esetében, ha eleveniszapot használunk, akkor azt olyan szennyvíztisztító telepről vagy egységből kell nyerni, amely elsősorban kommunális (háztartási) szennyvizet fogad. Az egyéb forrásokból származó oltóanyagok a tapasztalatok szerint nagyobb mértékű szórást okoznak a vizsgálati eredményekben. A Módosított OECD-teszt és a zárt palack módszerek esetében hígabb állagú, iszaprézecskeket vagy csapadékot nem tartalmazó oltóanyagra van szükség. Megfelelő lehet egy kommunális szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telepről vagy egységből kifolyó másodlagos (kezelt) szennyvíz is. A MITI-vizsgálat esetében az oltóanyag több forrásból származik, és ismertetésére a módszerrel foglalkozó szakaszban kerül sor.

I.6.4.1. Eleveniszapból származó oltóanyag

Az eleveniszap-mintát frissen gyűjtjük be, egy elsősorban kommunális szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telep vagy egység levegőztető tartályából. Szükség esetén a durva szemcséket finom szűrőn át történő szűréssel távolítjuk el, majd ezt követően a szennyvíziszapot aerob körülmények között tartjuk.

Másik lehetőség, hogy a durva szemcsék eltávolítását követően az iszapot üleptítjük vagy centrifugáljuk (pl. 1100 g 10 percen keresztül). A felülúszót elöntjük. Az iszap a ásványianyag-tápanyag-törzsoldatban mosható. A koncentrált iszapot az ásványianyag-tápanyag-törzsoldatban szuszpendáljuk, úgy, hogy 3–5 gramm szuszpendált szilárd anyag/liter koncentrációt kapjunk, majd a szuszpenziót – ameddig szükséges – levegőztetjük.

A szennyvíziszapot megfelelően működő hagyományos szennyvíztisztító telepről kell gyűjteni. Amennyiben az iszapot nagysebességű szennyvíztisztító telepről kell begyűjteni, vagy gyanítható, hogy az iszap gátlószert (inhibitort) tartalmaz, úgy azt át kell mosni. Az újraszuspendált iszapot alapos keverést követően üleptjük vagy centrifugáljuk, a felülúszót elöntjük, majd a mosott iszapot ismét újraszuspendáljuk további megfelelő mennyiségű vizsgálati sóoldatban. Ezt a műveletsort addig ismétljük, amíg az iszap túlzott mennyiségű szubsztráttól illetve gátlószertől mentesnek nem tekinthető.

Szuszpendálás után, illetve kezeletlen szennyvíz-iszap esetében az iszaptól használat előtt mintát kell venni a szuszpendált szilárd anyagok száraz tömegének megállapítására.

További lehetőség az eleveniszap (3–5 g szuszpendált szilárd anyag/liter) homogenizálása. Az iszapot mechanikus keverőgéppben kezeljük közepes sebességen 2 percig, majd az összekevert iszapot 30 percig – szükség esetén ennél hosszabb ideig – ülepedni hagyjuk. Az oltóanyagként használni kívánt folyadékot lefejtjük. Ebből a típusú oltóanyagból az ásványianyag-táppoldat 1 literéhez 10 ml-t használunk.

I.6.4.2. Egyéb oltóanyagforrások

Oltóanyag nyerhető még elsősorban kommunális szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telepről vagy egységből kifolyó másodlagos (kezelt) szennyvízből is. A mintát frissen gyűjtjük be, és szállítás közben aerob körülmények között tartjuk. 1 órán át üleptjük, vagy durva szűrőpapíron átszűrjük és a lefejtett folyadékot vagy filtrátumot felhasználásig aerob körülmények között tartjuk. Ebből a típusú oltóanyagból az ásványianyag-táppoldat egy literéhez akár 100 ml is használható.

Oltóanyag nyerhető továbbá felszíni élővizekből is. Ebben az esetben a kívánt mintát a megfelelő helyről (pl. folyó, tó) begyűjtjük, és a felhasználásig aerob körülmények között tartjuk. Az oltóanyag szükség esetén szűrés vagy centrifugálás után koncentrálnak.

I.6.5. Az oltóanyagok előkondicionálása

Az oltóanyagok előkondicionálhatók a kísérleti körülményekhez (pl. hőmérséklet), de nem adaptálhatók előre a vizsgálati anyaghoz. Az előkondicionálás során az eleveniszapot a ásványianyag-táppoldatban levegőztetjük, vagy a másodlagos szennyvizet 5–7 napig a vizsgálati hőmérsékleten levegőztetjük. Az előkondicionálás a vakértékek csökkenése révén esetenként javítja a vizsgálati eljárások pontosságát. A MITI oltóanyag esetében nincs szükség előkondicionálásra.

I.6.6. Abiotikus kontrollok

Amennyiben szükséges, a vizsgálati anyag abiotikus lebomlásának (degradációjának) mértéke oltóanyagot nem tartalmazó steril kontrollok segítségével meghatározott DOC-csökkenés, oxigénfelvétel vagy szén-dioxid fejlődés meghatározásával állapítható meg. A sterilizálás végrehajtható membránszűrés útján (0,2–0,45 mikrométer), vagy egy toxikus anyag megfelelő koncentrációban történő adagolásával. Membránszűrés alkalmazása esetén a mintákat aszeptikusan kell kezelni, hogy a sterilitás fennmaradjon. A biológiai lebomlást a DOC csökkenését mérő vizsgálatok esetében – különösen eleveniszap oltóanyag alkalmazása esetén – olyan abiotikus kontrollt alkalmazunk, amelyet beoltottunk de utána megfelelő toxikus anyaggal a mikrobákat elpusztítottuk, azokat az eseteket kivéve, ha a vizsgált vegyi anyag adszorpciója eleve kizárható.

I.6.7. A lombikok száma

Az egyes vizsgálatok során alkalmazandó lombikok számát a vizsgálatokat részletező szakaszok ismertetik.

A különböző lombikok, tartalmuk szerint felsorolva, az alábbiak:

- Vizsgálati szuszpenzió: vizsgálati anyag és oltóanyag
- Oltóanyag-vakpróba: csak oltóanyag
- Eljáráskezelés: referenciaanyag és oltóanyag
- Abiotikus steril kontroll: steril, vizsgálati anyagot tartalmaz (lásd az I.6.6. pontot)
- Adszorpciók kontroll: vizsgálati anyag, oltóanyag és sterilizáló anyag
- Toxicitáskontroll: vizsgálati anyag, referenciaanyag és oltóanyag

A vizsgálati oldatban és az oltóanyag-vakpróbában a meghatározásokat párhuzamosan kell végezni. A többi lombik esetében is javasolt a meghatározások párhuzamos végzése.

Előfordulhat azonban, hogy ez nem megvalósítható. Biztosítani kell, hogy elegendő számú mintavétel vagy leolvasás történjen ahhoz, hogy a százalékos csökkenés mértéke a „10 napos ablak” során felmérhető legyen.

I.7. Adatok és értékelés

A százalékos lebomlás (D_t) kiszámításához az egyes paraméterek párhuzamos mérésekből származó értékeinek átlagát használjuk, a vizsgálati oldat és az oltóanyag-vakpróba esetében is. A számításához a képleteket az egyes vizsgálatokkal foglalkozó szakaszok tartalmazzák. A lebomlás időbeli lefolyását grafikusán ábrázoljuk, jelezve a „10 napos ablakot”. Meghatározzuk és jegyzőkönyvezzük az anyagcsökkenés százalékos mértékét a tíznapos időintervallum végén, valamint a biodegradációs görbe lapos szakaszának elérésekor vagy a vizsgálat végén (amelyik az adott esetben megfelelő).

A respirometriás vizsgálatok során a nitrogéntartalmú vegyületek a nitrifikáció következtében befolyásolhatják az oxigénfelvételt (lásd a II. és V. Mellékleteket).

I.7.1. Bomlás mérése DOC-meghatározás útján

A lebomlás (degradáció) százalékos mértékét a vizsgálati anyagot tartalmazó lombikok esetében külön-külön valamennyi mintavételi időpontban meghatározzuk. A párhuzamos DOC-mérésekből megállapítjuk a vizsgálat érvényességét (lásd a I.5.2. pontot), majd az átlagolt értékekkel kiszámítjuk a lebomlás százalékos értékét t időpontban az alábbi képlet alapján:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_0 - C_{b0}} \right) \times 100 ,$$

ahol:

D_t = lebomlás százalékos mértéke t időpontban,

C_0 = induló DOC-koncentrációk átlagértéke a vizsgálati anyagot tartalmazó beoltott ásványianyag-táplódatban (mg DOC/l),

C_t = DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban a vizsgálati anyagot tartalmazó beoltott ásványianyag-táplódatban (mg DOC/l),

C_{b0} = induló DOC-koncentrációk átlagértéke a vizsgálati anyagot nem tartalmazó („vak”) beoltott ásványianyag-táplódatban (mg DOC/l),

C_{bt} = DOC-koncentrációk átlagértéke t időpontban a vizsgálati anyagot nem tartalmazó („vak”) beoltott ásványianyag-táplódatban (mg DOC/l).

Valamennyi koncentráció mérése kísérleti úton történik.

I.7.2. A lebomlás mérése specifikus analízis útján

Specifikus analitikai adatok megléte esetén az elsődleges biológiai lebomlás (biodegradáció) az alábbi képlet segítségével számítható ki:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 ,$$

ahol:

D_t = lebomlás százalékos mértéke t időpontban, általában 28 nap elteltével,

S_a = vizsgálati anyag maradék mennyisége a beoltott közegben a vizsgálat végén (mg),

S_b = vizsgálati anyag maradék mennyisége a csak vizet/közegzet és vizsgálati anyagot tartalmazó vakpróbában (mg).

I.7.3. Abiotikus lebomlás

Abiotikus steril kontroll alkalmazása esetén az abiotikus bomlás (degradáció) százalékos mértéke az alábbi képlet segítségével számítható ki:

$$\text{Abiotikus bomlási\%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100 ,$$

ahol:

$C_{s(0)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a 0. napon,

$C_{s(t)}$ = DOC-koncentráció a steril kontrollban a t -edik napon.

I.8. Az eredmények megadása

Amennyiben lehetséges, a vizsgálati jegyzőkönyvnek az alábbi adatokat kell tartalmaznia:

- vizsgálati és referenciaanyagok, tisztaságuk feltüntetésével;
- vizsgálati körülmények;

- oltóanyag: jelleg és mintavételi hely(ek), koncentráció és az esetlegesen alkalmazott előkondicionálás;
- a szennyvízben jelen lévő ipari eredetű anyagok aránya és jellege, amennyiben ismert;
- vizsgálat időtartama és a vizsgálati hőmérséklet;
- rosszul oldódó vizsgálati anyagok esetében az alkalmazott kezelés;
- alkalmazott vizsgálati módszer; az ismertetett eljárástól való esetleges eltéréseket tudományosan indokolni kell;
- adatlap;
- esetlegesen megfigyelt gátlási jelenségek;
- esetlegesen megfigyelt abiotikus lebomlás;
- specifikus kémiai analitikai adatok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- köztes anyagokra vonatkozó analitikai adatok, amennyiben rendelkezésre állnak;
- a lebomlás százalékos mértékét az idő függvényében ábrázoló görbe a vizsgálati anyag és a referenciaanyag vonatkozásában; a 10%-os bomlás elérését megelőző fáziskésést, a bomlási (degradációs) fázist, a „10 napos ablakot” és a görbe meredekségét világosan jelezni kell (I. Melléklet). Amennyiben a vizsgálat megfelelt az érvényességi kritériumoknak, úgy a görbe megszerkeszthető a vizsgálati anyagot tartalmazó lombikokban mért bomlási értékek átlagai alapján;
- anyagcsökkenés százalékos mértéke a tíznapos időintervallum végén, valamint a biodegradációs görbe lapos szakaszának elérésekor vagy a vizsgálat végén.

II. RÉSZ: A DOC (OLDOTT SZERVES SZÉN) CSÖKKENÉSÉNEK VIZSGÁLATA (C.4-A MÓDSZER)

II.1. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyag ismert koncentrációját – mint a szerves szén egyedüli névleges forrását (10–40 mg DOC/l) – tartalmazó, meghatározott mennyiségű beoltott ásványianyag-tápanyagot sötétben vagy diffúz fényben levegőztetünk 22 ± 2 °C hőmérsékleten.

A lebomlási folyamatot rövid időközönként végrehajtott DOC-analízis révén követjük figyelemmel egy 28 napos perióduson keresztül. A biológiai lebomlás (biodegradáció) mértékét az induláskor jelenlévő DOC-koncentráció százalékos arányában kifejezett DOC-koncentráció-csökkenés (az oltóanyag-vakpróbában mért értékekkel korrigált) értékével fejezzük ki. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke kiszámítható továbbá az inkubációs periódus kezdetén és végén végzett kiegészítő kémiai analízisekből nyert adatok alapján is.

II.2. A vizsgálati módszer leírása

II.2.1. Eszközök

- a) Erlenmeyer-lombikok, pl. 250 ml–2 l űrtartalommal, a DOC-analízishez szükséges anyag térfogatától függően;
- b) Erlenmeyer-lombikok fogadására alkalmas rázógép, automatikus hőmérséklet-szabályozással vagy állandó hőmérsékletű szobában működtetve. A rázógépnek megfelelő teljesítményűnek kell lennie ahhoz, hogy képes legyen aerob körülményeket fenntartani valamennyi lombikban;
- c) Szűrőberendezés, megfelelő membránfilterekkel;
- d) DOC-analizátor;
- e) Oldott oxigén meghatározására alkalmas berendezés;
- f) Centrifuga.

II.2.2. A ásványianyag-tápanyag elkészítése

A törzsoldatok elkészítését az I.6.2. pont ismerteti.

Az (a) jelű oldatból 10 ml-t összekeverünk 800 ml hígítóvízzel, majd hozzáadunk 1-1 ml-t a (b), (c), (d) oldatokból, végül a hígítóvízzel az 1 literre kiegészítjük.

II.2.3. Az oltóanyag előkészítése és előkondicionálása

Az oltóanyag több forrásból is származhat: eleveniszap, kifolyó (kezelt) szennyvíz, felszíni vizek, talaj, vagy ezek keveréke.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontokat.

II.2.4. A lombikok előkészítése

Például, 800-800 ml ásványianyag-tápanyagot öntünk 2 db 2 l űrtartalmú Erlenmeyer-lombikba, majd az egyik lombikba a vizsgálati anyagból készült törzsoldatból, a másikba a referenciaanyagból készült törzsoldatból olyan mennyiséget mérünk, hogy 10–40 mg DOC/l értéknek megfelelő végkoncentrációt kapjunk mind a referenciaanyagra, mind a vizsgált kémiai anyagra nézve. A pH-értékeket ellenőrizzük, és ha szükséges, 7,4-re beállítjuk. A lombikokat beoltjuk eleveniszappal, vagy egyéb forrásból származó oltóanyaggal (lásd az I.6.4. pontot), úgy, hogy a végső koncentráció ne haladja meg a 30 mg szuszpendált szilárd anyag/liter értéket. Szintén elkészítjük az oltóanyagkontrollokat a ásványianyag-tápanyagban, vizsgálati vagy referenciaanyag nélkül.

Ha szükséges, egy lombikban ellenőrizzük a vizsgálati anyag esetleges gátló hatásait, oly módon, hogy egy ásványianyag-tápanyagban vizsgálati és referenciaanyagot hasonló koncentrációban egyaránt tartalmazó oldatot beoltunk.

Továbbá, amennyiben szükséges, egy további steril lombikban, a vizsgálati anyagból készített nem beoltott oldat segítségével ellenőrizzük, hogy az adott anyag abiotikus módon lebomlik-e (lásd az I.6.6. pontot).

Amennyiben gyanítható, hogy a vizsgálati anyag üvegre, iszapra, stb. jelentős mértékben adszorbeálódik, úgy előzetes becslés útján fel kell mérni a várható adszorpció mértékét, és ezáltal a vizsgálati módszer alkalmasságát az adott anyag vizsgálatára (lásd az 1. Táblázatot). Egy lombikban vizsgálati anyagot, oltóanyagot és sterilizáló anyagot tartalmazó oldatot készítünk.

A folyadék mennyiségét valamennyi lombikban ásványianyag-tápanyag hozzáadásával 1 literre kiegészítjük, majd keverés után valamennyi lombikból mintát veszünk a DOC induló koncentrációjának meghatározására (lásd a II.4. Mellékletet). A lombikok száját befedjük oly módon – pl. alufóliával –, hogy a levegő szabadon cserélődhessen a lombik és környezete között. Ezek után a lombikokat a keverőgépbe helyezük, és elindítjuk a vizsgálatot.

II.2.5. A lombikok száma egy általános vizsgálat esetében:

- és 2. lombik: vizsgálati szuszpenzió

- és 4. lombik: oltóanyag-vakpróba
- 5. lombik: eljáráskontroll

Lehetőleg, illetve ha szükséges:

- 6. lombik: abiotikus steril kontroll
- 7. lombik: adszorpciós kontroll
- 8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot.

II.2.6. A vizsgálat lebonyolítása

A vizsgálat során valamennyi lombikban előre meghatározott, rendszeres időközönként meghatározzuk a DOC-koncentrációt a két párhuzamosban olyan gyakorisággal, hogy az lehetővé tegye a „10 napos ablak” kezdetének megállapítását, valamint a „10 napos ablak” végére bekövetkezett anyagcsökkenés százalékos meghatározását. A mintavételek során csak a méréshez minimálisan szükséges szuszpenzió-mennyiséget szabad kivenni.

Ha szükséges, mintavétel előtt a lombikokból elpárolgott vizet megfelelő mennyiségű hígítóvíz (lásd az I.6.1. pontot) hozzáadásával pótolni kell. A minta kivétele előtt a ásványianyag-tápanyagot alaposan fel kell keverni, és biztosítani kell, hogy a lombik falára esetlegesen rátapadt vagy lerakódott anyag ismét feloldódjon vagy szuszpendálódjon. A mintavételt követően a mintát azonnal szűrni vagy centrifugálni kell (lásd a II.4. Mellékletet). A szűrt vagy centrifugált mintákat még aznap analizálni kell, ellenkező esetben 2–4 °C-on kell tárolni őket maximum 48 órán keresztül, vagy ha hosszabb tárolásra van szükség –18 °C alatti hőmérsékleten.

II.3. A vizsgálati eredmények megadása

II.3.1. Az eredmények kezelése

A bomlás százalékos mértékét t időpontban az I.7.1. pontban (DOC-meghatározás) leírtak, illetve, opcionálisan, az I.7.2. pontban (specifikus analízis) leírtak szerint kell meghatározni.

Valamennyi eredményt a megadott vizsgálati jegyzőkönyvben kell rögzíteni.

II.3.2. Az eredmények érvényessége

Lásd az I.5.2. pontot.

II.3.3. Az eredmények megadása

Lásd az I.8. pontot.

II.4. A vizsgálati jegyzőkönyv

Az alábbiakban bemutatunk egy példát a vizsgálati jegyzőkönyvre.

DOC-CSÖKKENÉS VIZSGÁLATA

1. LABORATÓRIUM:

2. VIZSGÁLAT MEGKEZDÉSÉNEK DÁTUMA:

3. VIZSGÁLATI ANYAG:

Neve:

A törzsoldat koncentrációja: mg/l

Kezdeti koncentráció a közegben, t_0 : mg/l

4. OLTÓANYAG

Eredete:

Alkalmazott kezelés:

Esetleges előkondicionálás:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakcióelegyben: mg/l

5. DOC-MEGHATÁROZÁS

	Lombik száma		DOC n nap elteltével (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Vizsgálati anyag + oltóanyag	1	a ₁					
		a ₂					
		a, átlag C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		b, átlag C _{b(t)}					
Oltóanyag vakvizsgálat vizsgálati anyag nélkül	3	c ₁					
		c ₂					
		c, átlag C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, átlag C _{d(t)}					
		$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$					

6. AZ ADATOK ÉRTÉKELÉSE

Lombik száma		% -os lebomlás n nap elteltével				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
Átlag (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) A D₁-et és a D₂-t nem átlagoljuk, ha nagymértékű az eltérés közöttük (nagyobb, mint 20%).

Megjegyzés: hasonló elrendezésű adatlapok alkalmazhatók a referenciaanyag és a toxicitáskontrollok esetében is.

7. ABIOTIKUS KONTROLL (nem kötelező)

	Idő (napokban)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) a steril kontrollban	$C_{s(0)}$	$C_{s(t)}$

$$\% \text{-os abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. SPECIFIKUS KÉMIAI ANALÍZIS (nem kötelező)

	Vizsgálati anyag maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	Elsődleges lebomlás százalékban
Steril kontroll	S_b	–
Beoltott vizsgálati közeg	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III. RÉSZ: MÓDOSÍTOTT OECD-TESTT (DOC-CSÖKKENÉS) (C.4-B MÓDSZER)

III.1. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyag ismert koncentrációját, – mint a szerves szén egyedüli névleges forrását (10–40 mg DOC/l) – tartalmazó, meghatározott mennyiségű ásványianyag-tápotat beoltunk literenként 0,5 ml elfolyó (kezelt) szennyvízből készített oltóanyaggal. Ezt követően sötétben vagy diffúz fényben levegőztetjük 22 ± 2 °C hőmérsékleten.

A lebomlási folyamatot rövid időközönként végrehajtott DOC-analízissel követjük nyomon 28 napon át. A biológiai lebomlás (biodegradáció) mértékét az induláskor jelen lévő DOC-koncentráció százalékos arányában kifejezett DOC-koncentráció csökkenés (az oltóanyag-vakpróbában mért értékekkel korrigált) mértékével fejezzük ki. Az elsődleges biológiai lebomlás mértéke kiszámítható továbbá az inkubációs periódus kezdetén és végén végzett kiegészítő kémiai analízisekből nyert adatok alapján is.

III.2. A vizsgálati módszer leírása

III.2.1. Eszközök

- Erlenmeyer-lombikok, pl. 250 ml–2 l űrtartalommal, a DOC-analízishez szükséges anyag térfogatától függően;
- Az Erlenmeyer-lombikok fogadására alkalmas rázógép, vagy automatikus hőmérséklet-szabályozással, vagy állandó hőmérsékletű szobában működtetve. A rázógépnek megfelelő teljesítményűnek kell lennie ahhoz, hogy képes legyen aerob körülményeket fenntartani valamennyi lombikban;
- Szűrőberendezés, megfelelő membránokkal;
- DOC-analizátor;
- Oldott oxigén meghatározására alkalmas berendezés;
- Centrifuga.

III.2.2. A ásványianyag-tápotat elkészítése

A törzsoldatok elkészítését az I.6.2. pont ismerteti.

Az (a) jelű oldatból 10 ml-t összekeverünk 800 ml hígítóvízzel, majd hozzáadunk 1-1 ml-t a (b), (c), (d) oldatokból, végül hígítóvízzel 1 literre kiegészítjük.

Ez a módszer literenként csupán 0,5 ml oltóanyagot használ, így előfordulhat, hogy a közeget ki kell egészíteni nyomelemekkel és növekedési faktorokkal. Ez úgy valósítható meg, hogy az alábbi oldatokból literenként egy-egy ml-t adunk a végső közeghez:

Nyomelemoldat:

Mangán-szulfát-tetrahidrát, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Bórsav, H_3BO_3	57,2 mg
Cink-szulfát-heptahidrát, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Ammónium-heptamolibdát, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Fe-kelát (FeCl_3 etiléndiamintetraecetsav)	100,0 mg
Vízben odjuk, és 1 literre kiegészítjük.	

Vitaminoldat:

Élesztőkivonat	15,0 mg
----------------	---------

Az élesztőkivonatot 100 ml vízben oldjuk. 0,2 mikrométer pórusméretű membránszűrő segítségével sterilizáljuk, vagy frissen készítjük.

III.2.3. Az oltóanyag előkészítése és előkondicionálása

Az oltóanyagot elsősorban kommunális szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telepről vagy laboratórium-méretű egységből kifolyó másodlagos (kezelt) szennyvízből nyerjük. Lásd az I.6.4.2. és I.6.5. pontokat.

A ásványianyag-tápotatához literenként 0,5 ml oltóanyagot használunk.

III.2.4. A lombikok előkészítése

Például, 800-800 ml ásványianyag-tápotatot öntünk 2 db 2 l űrtartalmú Erlenmeyer-lombikba, majd az egyik lombikba a vizsgálati anyagból készült törzsoldatból, a másikba a referenciaanyagból készült törzsoldatból olyan mennyiséget mérünk, hogy 10–40 mg DOC/l értéknek megfelelő végkoncentrációt kapjunk mind a referenciaanyagra mind a vizsgált kémiai anyagra nézve. A pH-értékeket ellenőrizzük, és ha szükséges, 7,4-re beállítjuk. Az oldatokat beoltjuk kifolyó (kezelt) szennyvízből nyert 0,5 ml oltóanyaggal literenként (lásd az I.6.4.2. pontot). Szintén elkészítjük az oltóanyagkontrollokat az ásványianyag-tápotatban, vizsgálati vagy referenciaanyag nélkül.

Ha szükséges, egy lombikban ellenőrizzük a vizsgálati anyag esetleges gátló hatásait, oly módon, hogy egy ásványi közegben vizsgálati és referenciaanyagot hasonló koncentrációban egyaránt tartalmazó oldatot beoltunk.

Továbbá, amennyiben szükséges, egy további, steril lombikban a vizsgálati anyagból készített nem beoltott oldat segítségével ellenőrizzük, hogy az adott anyag abiotikus módon lebomlik-e (lásd az I.6.6. pontot).

Amennyiben gyanítható, hogy a vizsgálati anyag üvegre, iszapra, stb. jelentős mértékben adszorbeál, úgy előzetes becslés útján fel kell mérni a várható adszorpció mértékét, és ezáltal a vizsgálati módszer alkalmasságát az adott anyag vizsgálatára (lásd az 1. Táblázatot). Egy lombikban vizsgálati anyagot, oltóanyagot és sterilizáló anyagot tartalmazó oldatot készítünk.

A folyadék mennyiségét valamennyi lombikban kiegészítjük 1 literre ásványianyag-táppoldat hozzáadásával, majd keverés után valamennyi lombikból mintát veszünk a DOC induló koncentrációjának meghatározása céljából (lásd a II.4. Mellékletet). A lombikok nyílását befedjük oly módon – pl. alufóliával –, hogy a levegő szabadon cserélődhessen a lombik és környezete között. Ezek után a lombikokat a keverőgépbe helyezzük, és elindítjuk a vizsgálatot.

III.2.5. A lombikok száma egy tipikus vizsgálat során:

- és 2. lombik: vizsgálati szuszpenzió
- és 4. lombik: oltóanyag-vakpróba
- 5. lombik: eljáráskontroll

Lehetőleg, illetve, ha szükséges:

- 6. lombik: abiotikus steril kontroll
- 7. lombik: adszorpciókontroll
- 8. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot.

III.2.6. A vizsgálat lebonyolítása

A vizsgálat során valamennyi lombikban előre meghatározott, rendszeres időközönként meghatározzuk a DOC-koncentrációt a két párhuzamosban olyan gyakorisággal, hogy az lehetővé tegye a „10 napos ablak” kezdetének megállapítását, valamint a „10 napos ablak” végére bekövetkezett anyagcsökkenés százalékos meghatározását. A mintavételek során csak a méréshez minimálisan szükséges szuszpenziómennyiséget szabad kivenni.

Ha szükséges, mintavétel előtt a lombikokból elpárolgott vizet megfelelő mennyiségű hígítóvíz (lásd az I.6.1. pontot) hozzáadásával pótoljuk. A minta kivétele előtt az ásványianyag-táppoldatot alaposan fel kell keverni, és biztosítani kell, hogy a lombik falára esetlegesen rátapadt vagy lerakódott anyag ismét feloldódjon vagy szuszpendálódjon. A mintavételt követően a mintát azonnal leszűrjük vagy centrifugáljuk (lásd a II.4. Mellékletet). A szűrt vagy centrifugált mintákat még aznap analizálni kell, ellenkező esetben 2-4 °C-on lehet tárolni őket maximum 48 órán keresztül, vagy -18 °C alatti hőmérsékleten, ha hosszabb tárolásra van szükség.

III.3. A vizsgálati eredmények megadása

III.3.1. Az eredmények kezelése

A bomlás százalékos mértékét t időpontban az I.7.1. pontban (DOC-meghatározás) leírtak, illetve, opcionálisan, az I.7.2. pontban (specifikus analízis) leírtak szerint kell meghatározni.

Valamennyi eredményt a megadott adatlapokon kell rögzíteni.

III.3.2. Az eredmények érvényessége

Lásd az I.5.2. pontot.

III.3.3. Az eredmények megadása

Lásd az I.8. pontot.

III.4. A vizsgálati jegyzőkönyv

A továbbiakban bemutatunk egy példát a vizsgálati jegyzőkönyvre.

MÓDOSÍTOTT OECD SZŰRŐVIZSGÁLAT

1. LABORATÓRIUM:

2. VIZSGÁLAT MEGKEZDÉSÉNEK DÁTUMA:

3. A VIZSGÁLATI ANYAG:

Neve:

A törzsoldat koncentrációja: mg/l

Kezdeti koncentráció a közegben, t_0 : mg/l

4. OLTÓANYAG:

Eredete:

Alkalmazott kezelés:

Esetleges előkondicionálás:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakcióelegyben: mg/l

5. DOC-MEGHATÁROZÁS:

	Lombik száma		DOC n nap elteltével (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Vizsgálati anyag + oltóanyag	1	a_1					
		a_2					
		a, átlag $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, átlag $C_{b(t)}$					
Oltóanyag vakvizsgálat vizsgálati anyag nélkül	3	c_1					
		c_2					
		c, átlag $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, átlag $C_{d(t)}$					
		$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$					

6. A NYERS ADATOK ÉRTÉKELÉSE:

Lombik száma		% -os lebomlás n nap elteltével				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0				
	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	20				
(*)Átlag	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) A D₁-et és D₂-t nem átlagoljuk, ha nagymértékű az eltérés közöttük (nagyobb, mint 20%).

Megjegyzés: hasonló elrendezésű adatlapok alkalmazhatók a referenciaanyag és a toxicitáskontrollok esetében is.

7. ABIOTIKUS KONTROLL (nem kötelező):

	Idő (napokban)	
	0	t
DOC-koncentráció (mg/l) a steril kontrollban	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\% \text{-os abiotikus lebomlás} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. SPECIFIKUS KÉMIAI ANALÍZIS (nem kötelező):

	Vizsgálati anyag maradék mennyisége a vizsgálat végén (mg/l)	% elsődleges lebomlás (degradáció)
Steril kontroll	S _b	–
Beoltott vizsgálati közeg	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV. RÉSZ: CO₂-FEJLŐDÉS VIZSGÁLAT (C.4-C MÓDSZER)

IV.1. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált vegyi anyag ismert koncentrációját, – mint a szerves szén egyedüli névleges forrását (10–20 mg DOC vagy TOC/l) – tartalmazó, meghatározott mennyiségű beoltott ásványianyag-táppoldatot szabályozott sebességgel adagolt szén-dioxid-mentes levegővel levegőztetünk sötétben vagy diffúz fényben. A lebomlást 28 napon keresztül követjük a keletkezett szén-dioxid mennyiségének meghatározása révén. A szén-dioxidot bárium- vagy nátrium-hidroxidban fogjuk fel, és a megmaradt hidroxid titrálásával, vagy szervesetlen szénként mérjük. A vizsgálati anyagból keletkezett szén-dioxid (oltóanyag-vakpróba eredményével korrigált) mennyiségét a ThCO₂ százalékos arányában fejezzük ki. A biológiai lebomlás mértéke kiszámítható továbbá az inkubációs periódus kezdetén és végén végzett kiegészítő DOC-analízisekből nyert adatok alapján is.

IV.2. A vizsgálati módszer leírása

IV.2.1. Eszközök

- a), 2–5 literes lombikok, a lombik aljára majdnem leérő levegőztető csővel, és egy kivezető nyílással;
- b) Mágneses keverők, rosszul oldódó vegyi anyagok vizsgálata esetén;
- c) Gázabszorpciós üvegek;
- d) Légáram szabályozására és mérésére alkalmas berendezés;
- e) Szén-dioxid kivonására alkalmas berendezés a szén-dioxid-mentes levegő elkészítéséhez; másik lehetőség, hogy gázpalackból nyert CO₂-mentes oxigén és CO₂-mentes nitrogén megfelelő arányú (20% O₂:80% N₂) keverékét használjuk;
- f) Eszközök szén-dioxid meghatározására, titrimetriás méréshez vagy szervesetlen szén analízishez,
- g) Membránszűrő berendezés (opcionális);
- h) DOC-analízátor (opcionális).

IV.2.2. Az ásványianyag-táppoldat elkészítése

A törzsoldatok elkészítését az I.6.2. pont ismerteti.

Az (a) jelű oldatból 10 ml-t összekeverünk 800 ml hígítóvízzel, majd hozzáadunk 1-1 ml-t a (b), (c), (d) oldatokból, végül hígítóvízzel a 1 literre egészítjük ki.

IV.2.3. Az oltóanyag előkészítése és előkondicionálása

Az oltóanyag több forrásból is származhat: eleveniszap, kifolyó (kezelt) szennyvíz, felszíni vizek, talaj, vagy ezek keveréke.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontokat.

IV.2.4. A lombikok előkészítése

Az itt ismertetésre kerülő példában szereplő térfogatok és tömegek 3 liter szuszpenziót tartalmazó 5 literes lombikokra vonatkoznak. Kisebb mennyiségek alkalmazása esetén ezek az értékek megfelelően csökkenthetők, de biztosítani kell azt, hogy a keletkezett szén-dioxid pontosan mérhető legyen.

Valamennyi ötliteres lombikba 2400 ml ásványianyag-táppoldatot öntünk, majd megfelelő mennyiséget az elkészített eleveniszapból (lásd az I.6.4.1. és I.6.5. pontokat) úgy, hogy a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a végső 3 liter térfogatú beoltott keverékben ne haladja meg a 30 mg/l értéket. Másik lehetőség, hogy először felhígítjuk az elkészített szennyvíziszapot, hogy 500–1000 mg/l koncentrációt kapjunk a ásványianyag-táppoldatban, majd ebből a szuszpenzióból adunk megfelelő mennyiségeket az ötliteres lombikok tartalmához a 30 mg/l koncentráció eléréséhez. Ez az eljárás nagyobb pontosságot tesz lehetővé. Egyéb forrásból származó oltóanyag is alkalmazható (lásd az I.6.4.2. pontot).

Ezeket a beoltott keverékeket egy éjszakán át CO₂-mentes levegővel levegőztetjük a szén-dioxid eltávolítása céljából.

A vizsgálati anyagot és a referenciaanyagot ismert töménységű törzsoldatok formájában külön-külön hozzáadjuk két-két lombik tartalmához, úgy, hogy a lombikokban 10–20 mg DOC vagy TOC/l koncentráció alakuljon ki. Néhány lombik tartalmához nem adunk sem vizsgálati, sem referenciaanyagot, ezek fognak oltóanyagkontrollként szolgálni. A rosszul oldódó vizsgálati anyagokat közvetlenül a lombikokba kell tenni, tömeg vagy térfogat alapján, vagy a III. Mellékletben ismertetett módon kell őket kezelni.

Amennyiben szükséges, a vizsgálati anyag esetleges gátló hatásait úgy ellenőrizzük, hogy egy lombikba vizsgálati és referenciaanyagot egyaránt teszünk, ugyanazokat a koncentrációkat alkalmazva, mint a többi lombik esetében.

Továbbá, amennyiben szükséges, egy további, steril lombikban a vizsgálati anyagból készített nem beoltott oldat segítségével ellenőrizzük, hogy az adott anyag abiotikus módon lebomlik-e (lásd az I.6.6. pontot). A sterilizálást megfelelő koncentrációban hozzáadott toxikus anyag segítségével hajtjuk végre.

A folyadék mennyiségét valamennyi lombikban kiegészítjük 3 literre, előzőleg CO₂-mentes levegővel levegőztetett ásványianyag-tápanyag hozzáadásával. Opcionálisan sor kerülhet mintavételre DOC-analízis (lásd a II.4. Mellékletet) és/vagy specifikus analízis céljából. Az abszorpciós üvegeket csatlakoztatjuk a lombikok levegőkivezető nyílásához.

Bárium-hidroxid alkalmazása esetén valamennyi ötliteres lombikhoz három, 100 ml 0,0125 M bárium-hidroxid oldatot tartalmazó abszorpciós üveget kell csatlakoztatni sorozatban. Az oldatnak mentesnek kell lennie a kicsapódott szulfáttól és karbonáttól, és erősségét közvetlenül a felhasználás előtt kell megállapítani. Nátrium-hidroxid alkalmazása esetén két szén-dioxid csapdát csatlakoztatunk; a második kontrollként szolgál, és azt ellenőrzi, hogy az összes szén-dioxidot felfogta-e az első. Szérumos-üvegekéhez hasonló záróelemmel ellátott abszorpciós üvegek megfelelőek a célra. Mindkét üvegbe 200 ml 0,05 M nátrium-hidroxidot teszünk; ez elegendő a vizsgálati anyag teljes lebomlása során keletkező teljes szén-dioxid mennyiség elnyeléséhez. A nátrium-hidroxid oldat még frissen elkészítve is nyomokban tartalmazni fog karbonátokat; ezt a vakpróbában mért karbonát-mennyiség levonásával korrigáljuk.

IV.2.5. Lombikok száma egy tipikus vizsgálat során

- és 2. lombik: vizsgálati szuszpenzió
- és 4. lombik: oltóanyag-vakpróba
- 5. lombik: eljárás kontroll

Lehetőleg, illetve, ha szükséges:

- 6. lombik: abiotikus steril kontroll
- 7. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot.

IV.2.6. A vizsgálat lebonyolítása

A vizsgálatot úgy kezdjük, hogy CO₂-mentes levegőt buborékoltatunk át a szuszpenziókon, 30–100 ml/perc sebességgel. A szén-dioxid elnyelésére szolgáló anyagból rendszeres időközönként mintát veszünk a CO₂-tartalom analízise céljából. Az első 10 nap során minden második vagy harmadik nap ajánlott analízist végezni, ezt követően pedig a 28. napig minden ötödik napon, hogy a „10 napos ablak” azonosítható legyen.

A 28. napon mintát vehetünk DOC- és/vagy specifikus analízis céljából, majd megmérjük a szuszpenziók pH-értékét, és valamennyi lombik tartalmához adunk 1 ml cc. sósavat; a lombikokat egy éjszakán át levegőztetjük a vizsgálati szuszpenziókban jelen lévő szén-dioxid eltávolítása céljából. A 29. napon elvégezzük a keletkezett szén-dioxid utolsó analízisét.

Azokon a napokon, amikor a keletkezett CO₂ mennyiségét mérjük, a lombikhoz legközelebb lévő bárium-hidroxidos üveget leválasztjuk a lombikról, és a hidroxidoldatot 0,05 M HCl alkalmazásával titráljuk, indikátorként fenolftaleint használunk. A maradék két bárium-hidroxidot tartalmazó abszorpciós üveget eggyel közelebb helyezzük a lombikhoz, és a sor végéhez csatlakoztatunk egy 100 ml friss 0,0125 M bárium-hidroxidot tartalmazó új abszorpciós üveget. A titrálásokat igény szerint végezzük. Például akkor, amikor az első üvegben jelentős mértékű csapadékképződés figyelhető meg, de még azelőtt, hogy a második üvegben megfigyelhető csapadékképződés indulna be, vagy legalább hetente. Ha a szén-dioxidot NaOH segítségével fogjuk fel, fecskendővel felszívunk egy kis térfogatú mintát (az alkalmazott szén analízátor jellemzőitől függően) a lombikhoz közelebb lévő abszorpciós üvegben lévő nátrium-hidroxid oldatból, majd ezt a mintát befecskendezzük a szénanalízátor IC (szervetlen szén) részébe a keletkezett szén-dioxid közvetlen analízise céljából.

A második CO₂-csapda tartalmát csak a vizsgálat végén kell analizálni, hogy a végső eredménybe beleszámíthassuk az esetlegesen itt felfogott szén-dioxid mennyiségét.

IV.3. A vizsgálati eredmények megadása

IV.3.1. Az eredmények kezelése

Titrláskor az abszorber által felfogott CO₂ mennyisége az alábbi képlet alapján számítható ki:

$$\text{CO}_2(\text{mg}) = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44 ,$$

ahol:

V = abszorberben lévő 100 ml titrlásához használt HCl mennyisége (ml),

C_B = a bárium-hidroxid oldat koncentrációja (M),

C_A = a sósavoldat koncentrációja (M),

Ha $C_B = 0,0125$ M és $C_A = 0,05$ M, 100 ml bárium-hidroxid titrálásához 50 ml szükséges, a CO_2 tömegét az alábbi képlet adja:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times ml \text{ titrálásához használt HCl} = 1,1 \times ml \text{ HCl}$$

Ebben az esetben tehát a titráláshoz felhasznált HCl mennyisége és a keletkezett CO_2 mennyisége (mg) közötti szorzótényező 1,1.

A megfelelő titrálási értékek segítségével kiszámoljuk a csak oltóanyagból, illetve az oltóanyag és vizsgálati anyag együtteséből származó CO_2 -mennyiséget, és az előbbi kivonva az utóbbiból kapjuk meg a vizsgálati anyagból származó CO_2 mennyiségét.

Például, ha az oltóanyag esetében 48 ml kell a titráláshoz, míg az oltóanyag plusz vizsgálati anyag esetében 45 ml, akkor:

$$CO_2 \text{ az oltóanyag esetében} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

$$CO_2 \text{ az oltóanyag plusz vizsgálati anyag esetében} = 1,1 \times (50 - 45) = 5,5 \text{ mg}$$

$$\text{Így a vizsgálati anyagból származó } CO_2 \text{ súlya } 5,5 - 2,2 = 3,3 \text{ mg.}$$

A biológiai lebomlás százalékos arányát az alábbi képlet adja meg:

$$\% \text{-os lebomlás} = \frac{mg \text{ képződő } CO_2 \times 100}{ThO_2 \times mg \text{ hozzáadott vizsgálati anyag}}$$

vagy,

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{mg \text{ képződő } CO_2 \times 100}{mg \text{ hozzáadott TOC} \times 3,67},$$

ahol 3,67 az átváltási arány (44/12) a szén és szén-dioxid között.

A lebomlás százalékos arányát bármely mérési időpontban megkaphatjuk, ha a mért értékhez hozzáadjuk a mérés napját megelőző napokra kiszámolt százalékos $ThCO_2$ értékeket.

Nátrium-hidroxid elnyelő anyagként való alkalmazása esetén a keletkezett szén-dioxid mennyiségét – szerveszénként (mg) kifejezve – az elnyelő anyagban lévő szerveszén koncentrációjának és az elnyelő anyag térfogatának szorzása révén kapjuk meg.

A lebomlás százalékos arányát az alábbi képlet adja meg:

$$\% ThCO_2 = \frac{mg \text{ IC a vizsgálatból} - mg \text{ IC a vakpróbából}}{a \text{ hozzáadott vizsgálati anyagból származó TOC}} \times 100,$$

ahol IC = szerveszén.

A DOC-csökkenést (nem kötelezően) az I.7. pontban leírtak szerint kell kiszámolni. Ezeket és valamennyi egyéb eredményt a megadott adatlapokon kell rögzíteni.

IV.3.2. Az eredmények érvényessége

A vizsgálati anyag ásványianyag-táplóanyagban képzett szuszpenziójának IC (szerveszén) tartalma a vizsgálat kezdetekor nem érheti el a TC (összes szén) értékének 5%-át, és a vizsgálat végén az oltóanyag-vakpróbában képződött CO_2 mennyisége normális esetben nem haladhatja meg a 40 mg/l értéket. Ha 70 mg CO_2 /liter meghaladó értékeket kapunk, akkor az adatokat és a kísérleti eljárást felül kell vizsgálni.

Lásd még az I.5.2. pontot.

IV.3.3. Az eredmények megadása

Lásd az I.8. pontot.

IV.4. Vizsgálati jegyzőkönyv

A továbbiakban bemutatunk egy példát a vizsgálati jegyzőkönyvre.

SZÉN-DIOXID FEJLŐDÉS VIZSGÁLAT

1. LABORATÓRIUM:

2. VIZSGÁLAT MEGKEZDÉSÉNEK DÁTUMA:

3. VIZSGÁLATI ANYAG:

Neve:

A törzsoldat koncentrációja: mg/l

Kezdeti koncentráció a közegben: mg/l

Lombik tartalmához hozzáadott szén teljes mennyisége: mg C

ThCO₂: mg CO₂

4. OLTÓANYAG:

Eredete:

Alkalmazott kezelés:

Esetleges előkondicionálás:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakcióelegyben: mg/l

5. SZÉNDIOXID-FEJLŐDÉS ÉS LEBONTHATÓSÁG:

Módszer: Ba(OH)₂ / NaOH / egyéb

Idő (nap)	A vizsgálatban képződött CO ₂ (mg)			A vakpróbában képződött CO ₂ (mg)			Képződött CO ₂ összesen (mg) (a vizsgálat és a vakpróba különbségeinek átlaga)		ThCO ₂ (összes CO ₂ /ThCO ₂)× 100		
	1	2	átlag	3	4	átlag	1	2	1	2	átlag
0											
n ₁											
n ₂											
n ₃											
28											

Megjegyzés: hasonló elrendezésű adatlapok alkalmazhatók a referenciaanyag és a toxicitáskontrollok esetében is.

6. DOC-MEGHATÁROZÁS (nem kötelező):

Idő (nap)	Vakpróba mg/l	Vizsgálati anyag mg/l
0	$C_{b(0)}$	C_0
28 (*)	$C_{b(t)}$	C_t
(*) vagy az inkubációs periódus végén		

$$\% \text{-os DOC-csökkenés} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_0 - C_{b(0)}} \right) \times 100$$

7. ABIOTIKUS LEBOMLÁS (nem kötelező):

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{\text{az abiotikus kontrollban 28 nap alatt képződő } CO_2 \text{ (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

V. RÉSZ: MANOMETRIÁS RESPIROMETRIA VIZSGÁLAT (C.4-D Módszer)

V.1. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált vegyi anyag ismert koncentrációját, – mint a szerves szén egyedüli névleges forrását (100 mg/l vizsgálati anyag, legalább 50–100 mg ThOD/liter) – tartalmazó, meghatározott mennyiségű beoltott ásványianyag-tápanyagot zárt lombikban, állandó hőmérsékleten (maximum ± 1 °C eltérést megengedve) kevertetjük maximum 28 napon keresztül. Az oxigénfogyasztást a respirométerpalackban az állandó gázmennyiség fenntartásához szükséges (elektrolízis útján előállított) oxigén mennyiségének, vagy a berendezésben mért térfogat, vagy nyomásváltozás (vagy a kettő kombinációja) mérése útján határozzuk meg. A fejlődött szén-dioxidot kálium-hidroxid oldatban, vagy egyéb megfelelő elnyelő anyagban nyeljük el. A vizsgálati anyag által felvett oxigén (a párhuzamos oltóanyag-vakpróbában felvett oxigén mennyiségével korrigált) mennyiségét a ThOD vagy KOI százalékában fejezzük ki. Az elsődleges biológiai lebomlás opcionálisan meghatározható továbbá az inkubációs periódus kezdetén és végén végzett kiegészítő specifikus analízisek eredményei alapján, a végső biológiai lebomlás pedig DOC-analízis útján.

V.2. A vizsgálati módszer leírása

V.2.1. Berendezések

- a) megfelelő respirométer;
- b) hőmérséklet szabályozása, ± 1 °C-on belül;
- c) membránszűrő berendezés;
- d) szén analízátor (opcionális).

V.2.2. Az ásványianyag-tápanyag elkészítése

A törzsoldatok elkészítését az I.6.2. pont ismerteti.

Az (a) jelű oldatból 10 ml-t összekeverünk 800 ml hígítóvízzel, majd hozzáadunk 1-1 ml-t a (b), (c), (d) oldatokból, végül hígítóvízzel 1 literes térfogatra egészítjük ki.

V.2.3. Az oltóanyag előkészítése és előkondicionálása

Az oltóanyag több forrásból is származhat: eleveniszap, kifolyó (kezelt) szennyvíz, felszíni vizek, talaj, vagy ezek keveréke.

Lásd az I.6.4., I.6.4.1., I.6.4.2. és I.6.5. pontokat.

V.2.4. A lombikok előkészítése

A vizsgálati és a referenciaanyagból külön lombikokban oldatokat készítünk az ásványianyag-tápanyagban, a törzsoldatok felhasználásával; úgy, hogy az oldatok koncentrációja általában 100 mg anyag/liter legyen, ami legalább 50–100 mg ThOD/liter értéknek felel meg.

A ThOD értékét az ammóniumsók képződése alapján számítjuk ki, kivéve, ha nitrifikáció várható, amikor is a számításnak a nitrátképződésen kell alapulnia (lásd a II.2. Mellékletet).

A pH-értékeket meghatározzuk, és ha szükséges, $7,4 \pm 0,2$ értékre beállítjuk.

A rosszul oldódó anyagok hozzáadására későbbi fázisban kerül sor (lásd később).

Amennyiben a vizsgálati anyag toxicitását meg kell határozni, úgy ásványianyag-tápanyagban készítünk egy további oldatot, amely egyaránt tartalmaz vizsgálati és referenciaanyagot, ugyanolyan koncentrációkban, mint a csak vizsgálati illetve csak a referenciaanyagot tartalmazó oldatok.

Amennyiben a fizikai-kémiai okokra visszavezethető oxigénfelvétel mértékének megállapítása szükséges, úgy a vizsgálati anyagból készítünk egy általában 100 mg ThOD/liter koncentrációjú oldatot, amelyet egy megfelelő toxikus anyag hozzáadásával sterilizálunk (lásd az I.6.6. pontot).

A vizsgálati és referenciaanyagból készült oldatokból külön-külön megfelelő mennyiségeket öntünk legalább két-két lombikba. További lombikokba csak ásványianyag-tápanyagot öntünk (oltóanyag-vakpróba), illetve – amennyiben szükséges – a kevert vizsgálati/referenciaanyag oldatot, illetve a steril oldatot.

Ha a vizsgálati anyag rosszul oldódik, akkor azt közvetlenül kell az ásványianyag-tápanyagba adagolni tömeg vagy térfogat alapján, illetve a III. Mellékletben leírtak szerint kell kezelni. A CO₂-ot elnyelő rekeszbe kálium-hidroxidot, nátronmész pasztillákat vagy egyéb megfelelő anyagot teszünk.

V.2.5. A lombikok száma egy tipikus vizsgálat során

- és 2. lombik: vizsgálati szuszpenzió
- és 4. lombik: oltóanyag-vakpróba
- 5. lombik: eljárás kontroll
- Lehetőleg, illetve, ha szükséges:
- 6. lombik: steril kontroll
- 7. lombik: toxicitáskontroll

Lásd még az I.6.7. pontot.

V.2.6. A vizsgálat lebonyolítása

Miután a lombikok elérték a kívánt hőmérsékletet, a megfelelő lombikokat beoltjuk előkészített eleveniszappal vagy az egyéb forrásból nyert oltóanyaggal úgy, hogy a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja ne haladja meg a 30 mg/liter értéket. A berendezést összerakjuk, elindítjuk a keverőt, ellenőrizzük a légmentes záródást, és elkezdjük az oxigénfelvétel mérését. További teendőnk csak annyi hogy elvégezzük a szükséges leolvasásokat és naponta ellenőrizzük a megfelelő hőmérséklet és a keverés fenntartását.

Az oxigénfelvételt a berendezés gyártója által meghatározott módon, rendszeres és rövid időközönként végzett leolvasások alapján kell kiszámítani. Az inkubációs periódus végén – ez általában 28 nap – meg kell mérni a lombikok tartalmának pH-értékét, különösen, ha az oxigénfelvétel alacsony, vagy meghaladja a $\text{ThOD}_{\text{NH}_4}$ értékét (nitrogéntartalmú vegyületek esetében).

Amennyiben szükséges, a vizsgálat kezdetén és végén mintázhatunk a respirométerpalackokból DOC-analízis vagy specifikus kémiai analízis céljából is (lásd a II.4. Mellékletet). Amennyiben a vizsgálat kezdetekor sor kerül mintavételre, úgy biztosítani kell, hogy a lombikban maradó vizsgálati szuszpenzió térfogata ismert legyen. Ha nitrogéntartalmú vizsgálati anyagnál figyelhető meg oxigénfelvétel, akkor meg kell állapítani, hogy a 28 napos periódus során mennyivel nőtt a nitrit- és nitrátkoncentráció, és ki kell számolni, hogy mennyivel kell korrigálni az oxigénfelvétel értékét a nitrifikáció által felvett oxigén miatt.

V.3. A vizsgálati eredmények megadása

V.3.1. Az eredmények kezelése

Meghatározott időtartam során felvett oxigén (az oltóanyag-vakpróba esetében azonos időtartam során megfigyelt oxigénfelvétel mennyiségével korrigált) mennyiségét (mg) elosztjuk a vizsgálati anyag alkalmazott mennyiségével. Ekkor megkapjuk a BOI (biológiai oxigénigény) értékét mg oxigén/mg vizsgálati anyag formában kifejezve, azaz

$$\text{BOI} = \frac{\text{a vizsgálati anyag oxigénfelvétele} - \text{a vakpróba oxigénfelvétele}}{\text{mg vizsgálati anyag a vizsgálati edényben}} \text{O}_2 \text{ (mg)/vizsgálati anyag (mg)}$$

A biológiai lebomlás százalékos aránya az alábbi képletek segítségével számítható ki:

$$\% \text{-os biológiai lebomlás} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOI (mg O}_2 \text{ / mg vizsgálati anyag)}}{\text{ThOD (mg O}_2 \text{ / mg vizsgálati anyag)}}$$

vagy

$$\% \text{ KOI} = \frac{\text{BOI (mg O}_2 \text{ / mg vizsgálati anyag)}}{\text{KOI (mg O}_2 \text{ / mg vizsgálati anyag)}}$$

Megjegyzendő, hogy ez a két módszer nem ad szükségszerűen azonos eredményt; és az előbbi módszer használata javasolt.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálata esetén a megfelelő ThOD (NH_4 vagy NO_3) értéket kell használni, attól függően, hogy mi tudható, illetve várható a nitrifikáció bekövetkezését illetően (II.2. Melléklet). Ha a nitrifikáció bekövetkezik, de nem teljes, akkor a nitrifikáció oxigénfelvétele miatt szükséges korrekciós tényező mértékét a nitrit- és nitrátkoncentráció változásából számítjuk ki (lásd az V. Mellékletet).

Opcionális szerves szén és/vagy specifikus kémiai analízis alkalmazása esetén a lebomlás százalékos arányát az I.7. pontban leírtak szerint számítjuk ki.

Valamennyi eredményt a megadott adatlapokon kell rögzíteni.

V.3.2. Az eredmények érvényessége

Az oltóanyag-vakpróba esetében mért oxigénfelvétel általában 20–30 mg O₂/liter, és nem szabadna meghaladnia a 60 mg/liter értéket 28 nap alatt. 60 mg/litert meghaladó értékek esetén az adatok és a kísérleti eljárás felülvizsgálatára van szükség. Ha a pH-érték a 6–8,5 tartományon kívül esik, és a vizsgálati anyag által felvett oxigén aránya nem éri el a 60%-ot, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgálati anyag alacsonyabb koncentrációja mellett.

Lásd még az I.5.2. pontban leírtakat.

V.3.3. Az eredmények megadása

Lásd az I.8. pontot.

V.4. A vizsgálati jegyzőkönyv

Az alábbiakban bemutatunk egy példát a vizsgálati jegyzőkönyvre.

MANOMETRIÁS RESPIROMETRIA VIZSGÁLAT

1. LABORATÓRIUM:

2. VIZSGÁLAT MEGKEZDÉSÉNEK DÁTUMA:

3. VIZSGÁLATI ANYAG:

Neve:

A törzsoldat koncentrációja: mg/liter

Kezdeti koncentráció a közegben, C₀: mg/liter

Térfogat a vizsgálati lombikban (V): ml

ThOD vagy KOI: O₂ (mg)/vizsgálati anyag (mg) (NH₄, NO₃)

4. OLTÓANYAG:

Eredete:

Alkalmazott kezelés:

Esetleges előkondicionálás:

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja a reakciós keverékben: mg/l

5. OXIGÉN FELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG

		Idő (napok)										
		0		7		14		21		28		
A vizsgálati anyag O ₂ -felvétele (mg)	1											
	2											
	a, átlag											
A vakpróba O ₂ -felvétele (mg)	3											
	4											
	b, átlag											
Korrigált BOI (mg)	(a ₁ -b _m)											
	(a ₂ -b _m)											
BOI / mg vizsgálati anyag	$\frac{(a_1 - b)}{C_0 V}$											
	$\frac{(a_2 - b)}{C_0 V}$											
% -os lebomlás (BOI/ThOD) × 100	D ₁ (a ₁)											
	D ₂ (a ₂)											
	Átlag *											
V = közeg térfogata a vizsgálati lombikban												

* A D₁-et és D₂-t nem átlagoljuk ha nagymértékű az eltérés közöttük.

Megjegyzés: hasonló elrendezésű adatlapok alkalmazhatók a referenciaanyag és a toxicitáskontrollok vonatkozásában is.

6. KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓBÓL ADÓDÓ OXIGÉNFOGYÁSI ÉRTÉKEKKEL (lásd az V. Mellékletet):

Nap	0	28	Különbség
(i) Nitrátkoncentráció (mg N/liter)			(N)
(ii) Oxigén-egyenértékben kifejezve (4,57 × N × V) (mg)	–	–	
(iii) Nitritkoncentráció (mg N/liter)			(N)
(iv) Oxigén-egyenértékben kifejezve (3,43 × N × V) (mg)	–	–	
(ii + iv) Teljes oxigén-egyenérték	–	–	

7. DOC-ANALÍZIS (nem kötelező):

Idő (nap)	Vakpróba (mg/l)	Vizsgálati anyag (mg/l)
0	C_{bl0}	C_0
28 *	C_{bt}	C_t
* vagy az inkubációs periódus végén		

$$\% \text{ DOC csökkenés} = \frac{1 - (C_t - C_{bt})}{C_0 - C_{bl0}} \times 100$$

8. SPECIFIKUS KÉMIAI ANALÍZIS (nem kötelező):

S_b = koncentráció a fizikai-kémiai (steril) kontrollban a 28. napon

S_a = koncentráció a beoltott lombikban a 28. napon

$$\% \text{ biológiai lebomlás} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOTIKUS LEBOMLÁS (nem kötelező):

a = oxigénfelvétel a steril lombikokban 28 nap után (mg)

$$\text{oxigénfelvétel/vizsgálati anyag (mg)} = \frac{a}{C_0 V}$$

(lásd az 1. és 3. szakaszokat)

$$\% \text{ abiotikus lebomlás} = \frac{100 a}{C_0 V ThOD}$$

VI. RÉSZ: ZÁRT PALACK MÓDSZER (C.4-E Módszer)

VI.1. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagból ásványianyag-táppoldatban általában 2–5 mg/liter töménységű oldatot készítünk, beoltjuk viszonylag kis számú, kevert populációból származó mikroorganizmussal, és szintültig töltött zárt üvegekben sötétben, állandó hőmérsékleten tartjuk. A lebomlást az oldott oxigén analízise révén követjük nyomon, 28 napon keresztül. A vizsgálati anyag által felvett oxigén (a párhuzamos oltóanyag-vakpróba esetében mért oxigénfelvétel mennyiségével korrigált) mennyiségét a ThOD vagy a KOI százalékában fejezzük ki.

VI.2. A vizsgálati módszer leírása

VI.2.1. Eszközök

- BOI-palackok, üveg dugókkal, pl. 250–300 ml űrtartalommal;
- Vízfürdő vagy inkubátor, az üvegek állandó hőmérsékleten (± 1 °C), sötétben tartására;
- Nagyméretű üvegek (2–5 literesek) a közeg elkészítéséhez és a BOI-palackok töltéséhez;
- Oldottoxigén-mérő vagy a Winkler-titráláshoz szükséges eszközök és reagensek.

VI.2.2. Az ásványianyag-táppoldat elkészítése

A törzsoldatok elkészítését az I.6.2. pont ismerteti.

1 ml (a) jelű oldatot összekeverünk 1 ml (d) oldattal, majd a keveréket hígítóvízzel az 1 literre kiegészítjük.

VI.2.3. Az oltóanyag előkészítése

Az oltóanyagot általában egy elsősorban kommunális szennyvizet feldolgozó szennyvíztisztító telepről vagy laboratórium-méretű egységből kifolyó másodlagos (kezelt) szennyvízből nyerjük. Az oltóanyagot másik lehetséges forrása a felszíni vizek. Általában az ásványianyag-táppoldathoz literenként egy csepp 0,05 ml–5 ml filtrátumot használunk; adott oltóanyagforrás vonatkozásában az optimális mennyiség megtalálásához szükség lehet előkísérletekre.

VI.2.4. A palackok előkészítése

Az ásványianyag-táppoldatot legalább 20 percen keresztül intenzíven levegőztetni kell. Valamennyi vizsgálati sorozatot ugyanabból az adagból származó ásványianyag-táppoldattal kell beállítani. A közeg általában akkor használható fel, ha legalább 20 órán keresztül állt a vizsgálati hőmérsékleten. Az oldott oxigén koncentrációját ellenőrizni kell, ennek 20 °C-on kb. 9 mg/liter körülnek kell lennie. A levegővel telített közeggel végzett valamennyi átviteli és töltési művelet buborékmentesen kell elvégezni például csövek használatával.

A BOI-palackok csoportjait előkészítjük a vizsgálandó és a referenciaanyag párhuzamos kísérleti sorozatainak vizsgálatára. Megfelelő számú BOI-palackra van szükség ahhoz, hogy – az oltóanyag-vakpróbákkal együtt – az oxigénfogyasztás mérése legalább két párhuzamosban elvégezhető legyen valamennyi vizsgálati időpontban, tehát például a 0., 7., 14., 21. és 28. napokon. A „10 napos ablak” azonosíthatóságának biztosítása céljából még több palack alkalmazására lehet szükség.

A nagyméretű üvegeket kb. a harmadukig töltjük a levegőztetett ásványianyag-táppoldattal. Ezt követően külön üvegekbe adagoljunk a vizsgálati, illetve a referenciaanyagot tartalmazó törzsoldatokból annyit, hogy a vegyi anyagok végső koncentrációja az oldatokban ne haladja meg a 10 mg/liter értéket. Egy további nagyméretű üveg tartalmát fogjuk felhasználni a vakpróba-hoz – ebbe nem teszünk sem vizsgálati sem referenciaanyagot.

Az oldott oxigén koncentrációja a BOI-palackokban nem eshet 0,5 mg/liter alá, hogy az oxigénhiány ne korlátozza az oltóanyag aktivitását. Ez a vizsgálati anyag koncentrációját kb. 2 mg/liter körüli értékre korlátozza. Nehezen lebontható, illetve alacsony ThOD értékkel rendelkező vegyületek esetében azonban 5–10 mg/liter koncentráció is alkalmazható. Egyes esetekben célszerű lehet párhuzamosan vizsgálni az adott anyagot két eltérő koncentráció, például 2 és 5 mg/liter alkalmazása mellett. A ThOD értékét általában az ammóniumsók képződése alapján számítjuk ki, de ha nitrifikáció várható, akkor a ThOD értékét a nitrátképződés alapján határozzuk meg (ThOD_{NO3}; lásd a II.2. Mellékletet). Ha a nitrifikáció bekövetkezik, de nem teljes, akkor az analízis útján meghatározott nitrit- és nitrátkoncentráció-változásoknak megfelelően az eredményt korrigálni kell.

Ha a vizsgálati anyag toxicitását is vizsgálni kell (például ha egy előző vizsgálat során kis mértékű biológiai lebonthatóság volt tapasztalható), akkor egy további sorozat palackra is szükség lesz.

Egy további nagyméretű üvegben az üveg térfogatának kb. harmadáig töltött levegőztetett ásványianyag-táppoldattal olyan oldatot készítünk, amely egyaránt tartalmaz vizsgálati és referenciaanyagot is, általában olyan koncentrációkban, mint a többi nagyméretű üvegben lévő, csak vizsgálati, illetve referenciaanyagot tartalmazó oldatok.

A nagyméretű üvegekben lévő oldatokat beoltjuk másodlagos kifolyó szennyvízből származó oltóanyaggal (egy csepp, azaz 0,05 ml–5 ml/liter koncentrációt alkalmazva), vagy egyéb forrásból – pl. folyóvízből – származó oltóanyaggal (lásd az I.6.4.2. pontot). Végül az oldatokat teljes térfogatig feltöltjük levegőztetett ásványianyag-táppalattal egy, az üvegek aljára leérő csövön keresztül, hogy biztosítsuk a keveredést.

VI.2.5. A palackok száma egy átlagos vizsgálat során

Egy átlagos vizsgálat során a következő palackokat alkalmazzuk:

- legalább 10 vizsgálati anyagot és oltóanyagot tartalmazó palack (vizsgálati oldat),
- legalább 10 csak oltóanyagot tartalmazó palack (oltóanyag-vakpróba),
- legalább 10 referenciaanyagot és oltóanyagot tartalmazó palack (eljárás kontroll),

továbbá, amennyiben szükséges, 6 vizsgálati anyagot, referenciaanyagot és oltóanyagot tartalmazó palack (toxicitáskontroll). Ahhoz azonban, hogy biztosítsuk a „10 napos ablak” pontos azonosíthatóságát, kb. kétszer ennyi palackra van szükség.

VI.2.6. A vizsgálat végrehajtása

A nagyméretű üvegek alsó negyedéből (nem az aljáról), az elkészített oldatokkal azonnal, egy csövön keresztül, a megfelelő BOI-palackokat színültig töltjük. Finom ütögetéssel eltávolítjuk a légbuborékokat. A nulladik időpontban vizsgálandó palackok tartalmán azonnal oldottoxigén-analízist végezzük a Winkler- vagy az elektróda módszer alkalmazásával. Ha Winkler-módszerrel határozzuk meg az oldott oxigén mennyiségét, a palackok tartalma tartósítható mangán(II)-szulfát és nátrium-hidroxid (az első Winkler-reagens) hozzáadásával. Az oxigént barna mangán(III)-hidroxid formájában megkötve tartalmazó, dugóval szorosan lezárt palackok sötétben 10–20 °C-on 24 óránál nem hosszabb ideig tárolhatók a Winkler-módszer további lépéseinek végrehajtása előtt. A többi palackot dugóval lezárjuk, figyelve arra, hogy ne maradjon bennük légbuborék, majd sötétben, 20 °C-on inkubáljuk őket. Valamennyi sorozatot kísérnie kell egy vakpróbasorozatnak, amelyben csak a beoltott ásványianyag-táppalattal vizsgáljuk. A 28 napos inkubációs periódus során adott mintavételi időpontokban (legalább hetente) valamennyi sorozatból legalább két-két palackban meghatározzuk az oldott oxigén mennyiségét.

A heti gyakoriságú mintavétel elvben lehetővé teszi a százalékos csökkenés felmérését egy 14 napos időintervallum során, míg a 3–4 naponta végrehajtott mintavétel – amelyhez nagyjából kétszer ennyi palack alkalmazására van szükség – elvben lehetővé teszi a „10 napos ablak” azonosítását.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálata esetén az eredményt korrigálni kell az esetlegesen bekövetkezett nitrifikáció következtében felvett oxigén mennyiségével. Ehhez az O₂-elektróda módszerrel meghatározzuk az oldott oxigén koncentrációját, majd mintát veszünk a BOI-palackból nitrit- és nitrát-analízis céljából. A nitrit- és nitrátkoncentráció változásából kiszámítható a felhasznált oxigén mennyisége (lásd az V. Mellékletet).

VI.3. A vizsgálati eredmények megadása

VI.3.1. Az eredmények kezelése

Először valamennyi mintavételi időpont vonatkozásában meghatározzuk a BOI értékét úgy, hogy a vizsgálati anyagnál mért oxigénfelvételtől (mg O₂/liter) kivonjuk a vakpróbában mért oxigénfelvételt. Ezt a korrigált oxigénfelvételt elosztjuk a vizsgálati anyag koncentrációjával (mg/liter), és így megkapjuk a specifikus BOI-értéket mg oxigén/mg vizsgálati anyag formában kifejezve. A biológiai lebomlás százalékos mértéke úgy számítható ki, hogy a specifikus BOI-értéket elosztjuk a specifikus ThOD-értékkel (a II.2. Mellékletben leírtak szerint kiszámítva), vagy a KOI értékkel (analízis útján meghatározva, lásd a II.3. Mellékletet); azaz:

$$\text{BOI} = \frac{[O_2 \text{ felvétel a vizsgálati anyagnál (mg)}] - [O_2 \text{ felvétel a vakpróbában (mg)}]}{\text{vizsgálati anyag a palackban (mg)}} =$$

$$= O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag (mg)}$$

$$\text{lebomlás (\%)} = \frac{\text{BOI } O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag (mg)}}{\text{ThOD } O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag (mg)}} \times 100 \text{ vagy,}$$

$$\text{lebomlás (\%)} = \frac{\text{BOI } O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag (mg)}}{\text{KOI } O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag (mg)}} \times 100$$

Megjegyzendő, hogy ez a két módszer nem ad szükségszerűen azonos eredményt; és az előbbi módszer használata ajánlott.

Nitrogéntartalmú anyagok vizsgálata esetén a megfelelő ThOD (NH_4 vagy NO_3) érték használandó, attól függően, hogy mi tudható, illetve várható a nitrifikáció bekövetkezéséről (II.2. Melléklet). Ha a nitrifikáció bekövetkezik, de nem teljes, akkor a nitrifikáció oxigénfelvétele miatt szükséges korrekciós tényező mértékét a nitrit- és nitrátkoncentráció változásából kell kiszámítani (lásd az V. Mellékletet).

VI.3.2. Az eredmények érvényessége

Az oltóanyag-vakpróbában az oxigéncsökkenés mértéke 28 nap után nem haladhatja meg a 1,5 mg oldott oxigén/liter értéket. Ennél magasabb értékek esetén a kísérleti eljárás felülvizsgálata szükséges. A vizsgálati palackokban a maradék oxigén koncentrációja soha nem eshet 0,5 mg/liter alá. Az ilyen alacsony oxigénkoncentráció csak akkor megengedhető, ha az oldott oxigén mérésére használt módszer ilyen alacsony szintek mellett is alkalmas a pontos mérésre.

Lásd még az I.5.2. pontot.

VI.3.3. Az eredmények megadása

Lásd az I.8. pontot.

VI.4. A vizsgálati jegyzőkönyv

A továbbiakban bemutatunk egy példát a vizsgálati jegyzőkönyvre.

ZÁRT PALACK MÓDSZER

1. LABORATÓRIUM:

2. VIZSGÁLAT MEGKEZDÉSÉNEK DÁTUMA:

3. VIZSGÁLATI ANYAG:

Neve:

A törzsoldat koncentrációja: mg/liter

Kezdeti koncentráció a palackokban: mg/liter

ThOD vagy KOI: $\text{O}_2(\text{mg}) / \text{vizsgálati anyag (mg)}$

4. OLTÓANYAG:

Eredete:

Alkalmazott kezelés:

Esetleges előkondicionálás:

Koncentráció a reakcióelegyben: mg/liter

5. AZ OLDOTTOXIGÉN-KONCENTRÁCIÓ MEGHATÁROZÁSA

Módszer: Winkler-módszer/oldottoxigén-mérés elektródával

Meghatározások a palackokból

	Inkubáció időtartama (napok)		Oldott oxigén (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Vakpróba (vizsgálati anyag nélkül)	1	C_1				
	2	C_2				
Átlag	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Vizsgálati anyag	1	a_1				
	2	a_2				
Átlag	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Megjegyzés: hasonló elrendezésű adatlapok alkalmazhatók a referenciaanyag és a toxicitáskontrollok vonatkozásában is.

6. KORREKCIÓ A NITRIFIKÁCIÓBÓL ADÓDÓ OXIGÉNFOGYÁSI ÉRTÉKEKKEL (lásd az V. Mellékletet)

Inkubáció időtartama (napok)	0	n ₁	n ₂	n ₃
(i) Nitrátkoncentráció (mg N/liter)				
(ii) Nitrátkoncentráció változása (mg N/liter)	-			
(iii) Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	-			
(iv) Nitritkoncentráció (mg N/liter)				
(v) Nitritkoncentráció változása (mg N/liter)	-			
(vi) Oxigén-egyenértékben kifejezve (mg/liter)	-			
(iii) + (vi) Teljes oxigén egyenérték (mg/liter)	-			

7. OLDOTT OXIGÉN CSÖKKENÉS:%-OS LEBOMLÁS

	Csökkenés n nap után (mg/liter)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
1. palack: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
2. palack: $(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})$				
1. palack:% $D_1 = (([(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100)/(\text{vizsg. Konc.} \times \text{ThOD}))$				
2. palack:% $D_2 = (([(m_{t0} - m_{tx}) - (m_{b0} - m_{bx})] \times 100)/(\text{vizsg. Konc.} \times \text{ThOD}))$				
% D átlag * = $(D_1 + D_2)/2$				

(*) A D₁-et és a D₂-t nem átlagoljuk, ha nagymértékű az eltérés közöttük.

m_{t0} = vizsgálati palackban mért érték a 0. időpontban

m_{tx} = vizsgálati palackban mért érték az x. időpontban

m_{b0} = vakpróbában mért átlagos érték a 0. időpontban

m_{bx} = vakpróbában mért átlagos érték az x. időpontban

vizsg. konc. = vizsgálati koncentráció

ThOD = a vizsgálati anyag ThOD értéke

Figyelembe kell venni a nitrifikáció következtében szükséges korrekciós tényezőt a 6. szakasz (iii) + (vi) sorából.

8. OLDOTTOXIGÉN-CSÖKKENÉS A VAKPRÓBÁBAN:

Oxigénfelvétel a vakpróbában: (m_{b0} - m_{b28}) mg/liter. Ez az érték a vizsgálat érvényességének elbírálása szempontjából lényeges, és nem haladhatja meg az 1,5 mg/liter értéket.

VII. RÉSZ: MITI-VIZSGÁLAT (C.4-F Módszer)

VII.1. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyag tenyészközegben létrehozott, speciális módon tenyésztett nem adaptált mikroorganizmusokkal beoltott, folyamatosan kevert oldatában vagy szuszpenziójában 28 napon keresztül mérjük az oxigénfelvételt egy sötétített, zárt, automata respirométerben 25 ± 1 °C hőmérsékleten. A fejlődött szén-dioxidot nátronmészsel nyeletjük el. A biológiai lebonthatóság (biodegradáció) mértékét az elméleti oxigénfelvétel (ThOD) százalékában kifejezett (a vakpróbában mért oxigénfelvétel értékével korrigált) oxigénfelvétel értékével adjuk meg. Az inkubációs periódus kezdetén és végén végzett kiegészítő specifikus kémiai analízisek – esetleg DOC-analízis – alapján pedig kiszámítjuk az elsődleges biológiai lebonthatóság százalékos értékét.

VII.2. A vizsgálati módszer leírása

VII.2.1. Eszközök

a) Automata elektrolitikus BOI-mérő vagy respirométer, általában 6 darab 300 ml űrtartalmú üveggel, amelyekhez CO₂-elnyelő töltőanyaggal felszerelt tartály csatlakozik.

b) 25 °C \pm 1 °C hőmérséklet fenntartására alkalmas, állandó hőmérsékletű szoba és/vagy vízfürdő;

c) membránszűrő berendezés;

d) szén analizátor (opcionális).

VII.2.2. Az ásványi közeg elkészítése

Az alábbi törzsoldatokat analitikai tisztaságú reagensek és víz (I.6.1. pont) felhasználásával készítjük:

(a) Kálium-dihidrogén-foszfát, KH ₂ PO ₄	8,50 g
(b) Dikálium-hidrogén-foszfát, K ₂ HPO ₄	21,75 g
(c) Dinátrium-hidrogén-foszfát-dodekahidrát, Na ₂ HPO ₄ 12 H ₂ O	44,60 g
(d) Ammónium-klorid, NH ₄ Cl	1,70 g

Vízben oldjuk, és 1 literre kiegészítjük.

(a) Az oldat pH-értéke 7,2 kell, hogy legyen.

(b) Magnézium-szulfát-heptahidrát, MgSO₄ 7H₂O

22,50 g

Vízben oldjuk, és 1 literre kiegészítjük.

(c) Kalcium-klorid vízmentes, CaCl₂

27,50 g

Vízben oldjuk, és 1 literre kiegészítjük.

(d) Vas (III)-klorid-hexahidrát, FeCl₃ 6H₂O

0,25 g

Vízben oldjuk, és 1 literre kiegészítjük.

3 ml-t összekeverünk valamennyi – (a), (b), (c) és (d) – oldatból, és vízzel 1 literre kiegészítjük.

VII.2.3. Az oltóanyag elkészítése

Friss mintákat gyűjtünk legalább 10 helyszínről, főleg olyan helyekről, ahol többfajta vegyi anyagot használnak és ürítenek ki. 1 literes mintákat gyűjtünk szennyvíziszapból, talajból, vízekből, stb. olyan helyekről, mint pl. szennyvíztisztító telepek, ipariszennyvíz-kezelő telepek, folyók, tavak, tengerek. A begyűjtött mintákat alaposan összekeverjük. Miután az lebegő anyagokat eltávolítottuk, és a keveréket állni hagyjuk, a felülúszó pH-értékét beállítjuk $7 \pm$ -re nátrium-hidroxid vagy foszforsav segítségével.

A szűrt felülúszó megfelelő mennyiségével megtöltünk egy töltő-ürítő (fill-and-draw) eleveniszap edényt, és a folyadékot kb. 23 ½ órán át levegőztetjük. 30 perccel a levegőztetés befejezését követően a felülúszó teljes mennyiségének kb. egyharmadát elöntjük, és az elöntött mennyiségnek megfelelő térfogatú oldatot öntünk a leülepedett anyaghoz, amely 0,1:0,1:0,1% arányban tartalmaz glükózt, peptont és kálium-foszfátot (pH-7), majd újakezdjük a levegőztetést. Ezt a műveletsort naponta megismételjük. A szennyvíziszap-fermentort az alábbi követelményeknek megfelelően kell működtetni: a kifolyó (kezelt) szennyvízből nyert folyadékoknak tisztának kell lenniük, a hőmérsékletnek a 25 ± 2 °C, a pH értéknek pedig a 7 ± 1 sávban kell maradnia, a szennyvíziszapnak jól kell ülepednie, a levegőztetésnek megfelelő intenzitásúnak kell lennie ahhoz, hogy folyamatosan aerob körülmények legyenek a keverékben, biztosítani kell az egysejtűek (protozoa) jelenlétét, és a szennyvíziszap aktivitását legalább háromhavonta ellenőrizni kell egy referenciaanyag segítségével. Az így készített szennyvíziszapot legkorábban egy hónap működtetést követően szabad oltóanyagként felhasználni, de nem később, mint négy hónapnyi működtetés után. Ezt követően a mintavételt – legalább 10 helyszínről – rendszeres időközönként meg kell ismételni, háromhavonta egyszer.

Annak érdekében, hogy a friss és a régi iszap aktivitása azonos legyen, egy használatban lévő eleveniszap szűrt felülűszoját össze kell keverni egy frissen gyűjtött, 10 különböző forrásból származó keverék azonos mennyiségű szűrt felülűszojával, és a keveréket a fenti eljárás szerint kell tenyészteni. Az iszapot az egység töltése után 18–24 órával kell kivenni és oltóanyagként felhasználni.

VII.2.4. Az üvegek előkészítése

Az alábbi hat üveget kell előkészíteni:

- 1.: vizsgálati anyag hígítóvízben 100 mg/l koncentrációban;
- 2., 3. és 4.: vizsgálati anyag ásványianyag-táppoldatban 100 mg/l koncentrációban;
- 5.: referenciaanyag (pl. anilin) ásványianyag-táppoldatban 100 mg/l koncentrációban;
- 6.: csak ásványianyag-táppoldat.

A rosszul oldódó vizsgálati anyagokat közvetlenül adagoljuk, tömeg vagy térfogat alapján, vagy a III. Mellékletben leírtaknak megfelelően kezeljük, azzal a különbséggel, hogy sem oldószerek, sem emulgeálószer nem alkalmazhatók. A CO₂-elnyelő anyagot valamennyi üveg esetében az erre szolgáló speciális tartókba kell helyezni. A 2., 3. és 4. üvegben a pH-értéket beállítjuk 7,0-re.

VII.2.5. A vizsgálat lebonyolítása

A 2., 3. és 4. üvegeket (vizsgálati szuszpenziók), valamint az 5. (eljáráskezelés) és 6. (oltóanyag-vakpróba) üvegeket beoltjuk az oltóanyag kis mennyiségét használva, úgy, hogy a szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja 30 mg/l legyen. Az 1. üveg abiotikus kontrollként szolgál, így ehhez nem adunk oltóanyagot. A berendezést összeszereljük, ellenőrizzük a légmentes záródást, elindítjuk a keveréket, és sötétséget biztosítva megkezdjük az oxigénfelvétel mérését. Naponta ellenőrizzük a hőmérsékletet, a keverőt és a coulometriás oxigénfelvétel-mérőt, továbbá feljegyzünk az üvegek tartalmának színében esetlegesen bekövetkezett bármilyen változást. Az oxigénfelvételt a hat üveg vonatkozásában közvetlenül, megfelelő módszer alkalmazásával kell leolvasni, például a BOI-görbét kirajzoló készülékről. Az inkubációs periódus végén – ez általában a 28. nap – megmérjük az üvegek tartalmának pH-értékét, és meghatározzuk a maradék vizsgálati anyag, és az esetlegesen keletkezett köztes anyagok koncentrációit, illetve, vízben oldódó anyagok esetében, a DOC-koncentrációt (lásd a II.4. Mellékletet). Illékony anyagok esetében különös körültekintéssel kell eljárni. Ha nitrifikáció várható, úgy a nitrit- és nitrátkoncentrációt is meg kell határozni, amennyiben lehetséges.

VII.3. A vizsgálati eredmények megadása

VII.3.1. Az eredmények kezelése

A BOI értékét egy adott időpontban úgy kapjuk meg, hogy az adott időpontig a vizsgálati anyag által felvett oxigén (az oltóanyag-vakpróba az azonos időpontig mért oxigénfelvétel mennyiségével korrigált) mennyiségét elosztjuk a vizsgálati anyag tömegével. Így a BOI értékét oxigén (mg)/vizsgálati anyag (mg) formában kapjuk meg, azaz:

$$BOI = \frac{[O_2 \text{ felvétel a vizsgálati anyagnál (mg)}] - [O_2 \text{ felvétel a vakpróba } n \text{ (mg)}]}{\text{vizsgálati anyag az üvegben (mg)}}$$

$$= O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag mg}$$

A biológiai lebomlás százalékos mértéke az alábbi képlet alapján számítható ki:

$$\text{biológiai lebomlás (\%)} = \text{ThOD (\%)} =$$

$$= \frac{BOI [O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag (mg)}]}{\text{ThOD} [O_2 \text{ (mg) / vizsgálati anyag (mg)}]} \times 100$$

Keverékek esetében a ThOD értékét elemi analízis alapján számítjuk ki, úgy, mint egyszerű vegyület esetében. A megfelelő ThOD értéket (ThOD_{NH4} vagy ThOD_{NO3}) kell használni, attól függően, hogy bekövetkezett-e nitrifikáció, és ha igen, teljes volt-e. Ha a nitrifikáció bekövetkezik, de nem teljes, akkor a nitrifikáció oxigénfelvétele miatt szükséges korrekciós tényező mértékét a nitrit- és nitrátkoncentráció változásából kell kiszámítani (lásd az V. Mellékletet).

Az elsődleges biológiai lebomlás százalékos mértékét a specifikus (kiindulási) anyag mennyiségének csökkenése alapján számítjuk ki (lásd az I.7.2. pontot).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Amennyiben az 1. üvegben fizikai-kémiai okokra visszavezethető csökkenés tapasztalható (abiotikus kontroll), úgy ezt a tényt bele kell foglalni a jelentésbe, és a biológiai lebomlás mértékének kiszámításához a 28. napon ebben az üvegben mért anyagkoncentrációt (S_b) kell használni.

DOC meghatározása esetén (opcionális), a végső biológiai lebomlás százalékos mértékét az alábbi képlet alapján számítjuk ki:

$$D_t = 1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_0 - C_{b0}} \times 100$$

az I.7.1. pontban leírtak szerint. Ha az 1. üvegben (abiotikus kontroll) DOC csökkenés tapasztalható, akkor a biológiai lebomlás kiszámításához az ebben az üvegben mért DOC koncentrációt kell használni.

Valamennyi eredményt a megadott adatlapokon kell rögzíteni.

VII.3.2. Az eredmények érvényessége

Az oltóanyag-vakpróba esetében mért oxigénfelvétel általában 20–30 mg O₂/liter, és nem szabad meghaladnia a 60 mg/liter értéket 28 nap alatt. 60 mg/litert meghaladó értékek esetén az adatok és a kísérleti eljárás felülvizsgálatára van szükség. Ha a pH érték a 6–8,5 tartományon kívül esik, és a vizsgálati anyag által felvett oxigén aránya nem éri el a 60%-ot, akkor a vizsgálatot meg kell ismételni a vizsgálati anyag alacsonyabb koncentrációja mellett.

Lásd még az I.5.2. pontban leírtakat.

Ha az anilin százalékos lebomlása, az oxigénfelvételtől számítva, 7 nap után nem éri el a 40%-ot, 14 nap után pedig a 65%-ot, akkor a vizsgálat érvénytelennek tekintendő.

VII.3.3. Az eredmények megadása

Lásd az I.8. pontot.

VII.4. Vizsgálati jegyzőkönyv

A továbbiakban bemutatunk egy példát a vizsgálati jegyzőkönyvre.

MITI (I) VIZSGÁLAT

1. LABORATÓRIUM:
2. VIZSGÁLAT MEGKEZDÉSÉNEK DÁTUMA:
3. VIZSGÁLATI ANYAG:

Neve:

Törzsoldat koncentráció: mg/l vegyi anyag

Induló koncentráció a közegben, C₀: mg/l vegyi anyag

Reakciós keverék térfogata, V: ml

ThOD: O₂(mg)/l

4. OLTÓANYAG:

Mintavételi helyszínek:

1. . . .	6. . . .
2. . . .	7. . . .
3. . . .	8. . . .
4. . . .	9. . . .
5. . . .	10. . . .

Szuszpendált szilárd anyagok koncentrációja az eleveniszapban mesterséges szennyvíz alkalmazásával történt akklimatizációt követően = . . . mg/l

Eleveniszap térfogata 1 liter végső közegben = . . . ml

Szennyvíziszap koncentrációja a végső közegben = . . . mg/l

5. OXIGÉN FELVÉTEL: BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG (BIODEGRADABILITÁS)

Alkalmazott respirométer típusa:

		Idő (napok)				
		0	7	14	21	28
O ₂ felvétel (mg) a vizsgálati anyagnál	a ₁					
	a ₂					
	a ₃					
O ₂ felvétel (mg) a vakpróbában	b					
Korrigált O ₂ felvétel (mg)	(a ₁ - b) (a ₂ - b) (a ₃ - b)					
BOI / mg vizsgálati anyag	(a - b) / C ₀ V	1. Üveg				
		2. Üveg				
		3. Üveg				
% biológiai lebomlás (BOD / ThOD) × 100		1				
		2				
		3				
		átlag *				

Megjegyzés: hasonló elrendezésű adatlapok alkalmazhatók a referenciaanyag esetében.

* Nem átlagolandó, ha a párhuzamos értékek között nagymértékű az eltérés.

6. DOC-MEGHATÁROZÁS (nem kötelező):

Üveg	DOC			% DOC csökkenés	Átlag
	Mért		Korrigált		
Víz + vizsgálati anyag	A			-	-
Iszap + vizsgálati anyag	b ₁		b ₁ - c		
Iszap + vizsgálati anyag	b ₂		b ₂ - c		
Iszap + vizsgálati anyag	b ₃		b ₃ - c		
Vakpróba	C		-	-	-

$$\% \text{ DOC-csökkenés: } \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. A SPECIFIKUS KÉMIAI ANALÍZIS ADATAI:

	Maradék vizsgálati anyag a vizsgálat végén	% lebomlás
Vakpróba vízzel	S _b	
Beoltott közeg	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\% \text{ lebomlás} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

A % lebomlás mértékét az a₁, a₂ és a₃ üvegek vonatkozásában egyaránt meg kell határozni.

8. MEGJEGYZÉSEK:

Az idő függvényében ábrázolt BOI-görbét csatolni kell, amennyiben rendelkezésre áll.

*I. Melléklet***RÖVIDÍTÉSEK ÉS DEFINÍCIÓK**

BOI: biokémiai oxigénigény (g): mikroorganizmusok által, a vizsgálati anyag metabolizálása során felvett oxigén mennyisége; kifejezhetjük oxigénfelvétel (g)/tesztanyag (g) formában is (lásd a C.5. módszert).

KOI: kémiai oxigénigény (g): a vizsgálati anyag forró, savas dikromáttal történő oxidálása során felvett oxigén mennyisége; a jelen lévő oxidálható anyag mennyiségét méri; kifejezhetjük oxigénfelvétel (g)/tesztanyag (g) formában is (lásd a C.6. módszert).

DOC: oldott szerves szén: egy oldatban jelen lévő szerves szén mennyisége, amely átsűrhető egy 0,45 mikrométeres szűrőn, vagy a felülúszóban marad 15 percig tartó 40000 m/s² (± 4000 g) intenzitású centrifugálást követően.

ThOD: elméleti oxigénigény (mg): egy vegyi anyag teljes oxidálásához szükséges oxigén teljes mennyisége; a molekuláris képletből számítjuk ki (lásd a II.2. Mellékletet); kifejezhetjük oxigénigény (mg)/tesztanyag (mg) formában is.

ThCO₂: elméleti széndioxid-felszabadulás (mg): a vizsgált vegyület ismert vagy mért széntartalmából a teljes ásványosodás során képződött szén-dioxid számított mennyisége; kifejezhetjük képződött szén-dioxid (mg)/tesztanyag (mg) formában is.

TOC: összes szerves szén: az oldatban és szuszpenzióban lévő szerves szén mennyiségeinek összege egy mintában.

IC: szervetlen szén.

TC: összes szén: egy mintában jelen lévő szerves és szervetlen szén összege.

Elsődleges biológiai lebomlás

Egy anyag biológiai folyamatok által okozott kémiai szerkezetének megváltozása, amely az adott anyag specifikus tulajdonságainak elvesztésével jár.

Teljes biológiai lebomlás

A lebomlás azon szintje, amikor a vizsgált vegyületet a mikroorganizmusok teljes mértékben hasznosítják, széndioxidot, vizet, ásványi sókat és igen kis mennyiségű biomasszát hozva létre.

Biológiailag könnyen lebontható anyagok

Némileg önkényesen megválasztott kategória, amely azon vegyi anyagokat foglalja magába, amelyek átmentek bizonyos meghatározott, teljes biológiai lebonthatóságot vizsgáló teszteken. Ezek a vizsgálatok annyira szigorúak, hogy a vizsgálatok eredményei alapján feltételezzük, hogy az ilyen anyagok vizes környezetben aerob körülmények között biológiai gyorsan és teljesen lebomlanak.

Biológiailag potenciálisan lebontható anyagok

Azon vegyi anyagokat magába foglaló kategória, amelyek biológiai lebomlására (elsődleges vagy teljes) vonatkozóan egyértelmű bizonyítékok állnak rendelkezésre, valamely elfogadott biológiai lebonthatósági vizsgálat alapján.

Kezelhetőség

Vegyületek azon tulajdonsága, hogy el lehet őket távolítani biológiai szennyvízkezelés során, a kezelési folyamatok működésének káros befolyásolása nélkül. Általában a biológiai könnyen lebontható vegyületek kezelhetőek, de a biológiai potenciálisan lebontható vegyületek nem mind azok. Abiotikus folyamatok is végbemehetnek.

Fáziskésés

A szerves szén fogyását mérő vizsgálatban a beoltástól a 10%-os lebomlás eléréséig tartó időszak. A fáziskésés gyakran nagyon változékony és nehezen reprodukálható.

Lebomlási idő

A fáziskésés végétől a maximális lebomlás 90%-ának eléréséig tartó időszak.

„Tíznapos ablak”

A 10%-os lebomlás elérését követő 10 nap.

II. Melléklet

MEGFELELŐ ÖSSZEFOGLALÓ PARAMÉTEREK KISZÁMÍTÁSA ÉS MEGHATÁROZÁSA

A választott módszertől függően szükség lesz bizonyos összefoglaló paraméterek megadására. Jelen szakasz ezen értékek meghatározásával foglalkozik. A paraméterek alkalmazását az egyes módszereket leíró szakaszok ismertetik.

1. Széntartalom

A széntartalmat ismert elemi összetétel alapján számítjuk ki, vagy az adott anyag elemi analízise révén határozzuk meg.

2. Elméleti oxigénigény (ThOD)

Az elméleti oxigénigény (ThOD) értéke kiszámítható, amennyiben az elemi összetétel ismert, vagy elemi analízis révén meghatározható. Az alábbi vegyület esetében,



nitifikáció nélkül,

$$ThOD_{NH_4} = ((16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2 na - o]) / MW) \text{ mg/mg}$$

vagy, nitifikációval,

$$ThOD_{NO_3} = ((16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2 n + 3s + 5/2 p + 1/2 na - o]) / MW) \text{ mg/mg}$$

3. Kémiai oxigénigény (KOI)

A kémiai oxigénigényt (KOI) a C.6. módszer szerint kell meghatározni.

4. Oldott szerves szén (DOC)

Az oldott szerves szén (DOC) definíció szerint az a bármilyen vegyi anyagból vagy keverékből származó, vízben lévő szerves szén, amely átszűrhető egy 0,45 mikrométeres szűrőn.

A vizsgálati edényekből vett mintákat megfelelő membránszűrőt használva azonnal átszűrjük. A filtrátum első 20 ml-ét (ez a mennyiség csökkenthető kisméretű szűrő alkalmazása esetén) elöntjük. Szénanalízis céljából 10–20 ml mennyiséget tartunk meg, illetve ennél kevesebbet, ha a minta injektálásra kerül (a konkrét mennyiség attól függ, hogy mennyi szükséges a szénanalizátorhoz). A DOC-koncentrációt egy olyan szerves szénanalizátor segítségével határozzuk meg, amely képes a vizsgálat során alkalmazott induló DOC-koncentráció 10%-ánál alacsonyabb szénkoncentrációk pontos mérésére.

Azok a szűrt minták, amelyek nem kerülnek aznap elemzésre, hűtőszekrényben 48 óráig tárolhatók későbbi analízis céljából; ennél hosszabb időtartamú tárolás -18°C alatt lehetséges.

Megjegyzések:

A membránszűrőket gyakran felületaktív anyagokkal kezelik, a hidrofilizáció elősegítése érdekében. Maga a szűrő tehát akár több mg oldható szerves szenet tartalmazhat, amely befolyásolhatja a biológiai lebonthatóság vizsgálat eredményeit. A felületaktív anyagokat és egyéb oldható szerves vegyületeket úgy távolítjuk el a szűrőkről, hogy ionmentes vízben forraljuk őket háromszor egy órán keresztül. Ezt követően a szűrők vízben egy hétig tárolhatók. Ha eldobható szűrőpatronokat használunk, úgy valamennyi adagot ellenőrizni kell oldható szerves szén kibocsátás szempontjából.

Az alkalmazott membránszűrő típusától függően a vizsgálati anyag adszorpció útján visszamaradhat, ezért ajánlott ezt megelőzni.

A TOC és a DOC megkülönböztetése céljából szűrés helyett alkalmazható 15 perces centrifugálás (40000 m/sec^2 vagy 4000 g) is. Ez a módszer nem megbízható 10 mg DOC/l alatti kiindulási koncentrációk esetén, mivel vagy nem kerül valamennyi baktérium eltávolításra, vagy a bakteriális plazma részét képező szén újra feloldásra kerül.

IRODALOM

- 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.

*III. Melléklet**ROSSZUL OLDÓDÓ ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE*

Rosszul oldódó anyagokkal végzett biológiai lebonthatósági vizsgálatok során az alábbi szempontokra kell különösen figyelni:

Bár a homogén folyadékoknál ritkán merülnek fel problémák a mintavétellel kapcsolatban, a szilárd anyagokat ajánlatos megfelelő módon homogenizálni, a homogenitás hiányából adódó problémák elkerülése érdekében. Különös körülményekkel kell eljárni olyankor, ha vegyi anyagok keverékéből, vagy nagy mennyiségű szennyeződést tartalmazó anyagokból kell néhány milligrammnyi reprezentatív mintát venni.

A vizsgálat során többféle rázási, illetve keverési módszer is alkalmazható. Vigyázni kell arra, hogy csak olyan mértékben alkalmazzunk rázást vagy keverést, amely a vegyi anyag eloszlatásához szükséges, illetve, hogy elkerüljük a túlmelegedést, a túlzott habzást és a bakériumok mechanikai károsodását.

A vegyi anyag stabil diszperziójának előállításához alkalmazhatunk emulgeálószeret. Az emulgeálószer nem lehet toxikus a baktériumokra nézve, és a vizsgálati körülmények között biológiailag nem bomolhat le, és nem okozhat habzást.

Az oldószerekre ugyanazok a kritériumok vonatkoznak, mint az emulgeálószerekre.

Szilárd anyagok esetében vivőanyag alkalmazása nem ajánlott, bár zsíros anyagok esetében szükség lehet rá.

Segédanyagok – mint pl. emulgeálószerek, oldószerek vagy vivőanyagok – alkalmazása esetén segédanyag-vakpróba is szükséges.

A rosszul oldódó vegyületek vizsgálatára a három respirometriás vizsgálat – CO₂, BOI, MITI – közül bármelyik használható.

IRODALOM

- de Morsier, A. et al.: Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
- Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol 13 (1), 169.

*IV. Melléklet**AZ OLTÓANYAGRA FELTEHETŐEN MÉRGEZŐ VEGYI ANYAGOK BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁGÁNAK FELMÉRÉSE*

Amikor egy vegyi anyag a könnyű biológiai lebonthatóság vizsgálata során nemlebonthatónak bizonyul, a következő eljárás ajánlott, amennyiben szükséges különbséget tenni a gátlás és az inertség között (Reynolds et al., 1987).

A biológiai lebonthatóság és a toxicitás vizsgálata során azonos vagy hasonló oltóanyagot kell alkalmazni.

Biológiai lebonthatóság szempontjából vizsgált vegyi anyagok toxicitásának felmérése céljából megfelelő módszer az eleveniszapos légzés gátlási vizsgálat (88/302/EGK Irányelv), BOI és/vagy növekedésgátlási módszerek alkalmazása (ezek közül bármelyik, illetve ezek kombinációja).

Ha a toxicitásra visszavezethető gátlást el akarjuk kerülni a biológiai lebonthatósági vizsgálatot ajánlott a toxicitási vizsgálatok során megállapított EC₅₀ érték 1/10-ét (vagy az EC₂₀ értéket) el nem érő vizsgálati anyag koncentráció alkalmazásával végrehajtani. Azok az anyagok, amelyek EC₅₀ értéke meghaladja a 300 mg/l értéket, nem valószínű, hogy toxikus hatásokat okoznak egy biológiai lebonthatósági vizsgálat során.

A 20 mg/liternél kisebb EC₅₀ értékkel rendelkező anyagok vizsgálata komoly problémákba ütközhet. Ilyenkor alacsony vizsgálati koncentrációkat kell alkalmazni, amely a szigorú és érzékeny Zárt palack vizsgálat, vagy ¹⁴C - jelölésű anyagok alkalmazását teszi szükségessé. Másik lehetőség akklimatizált oltóanyag használata, amely lehetővé teszi magasabb vizsgálati koncentrációk alkalmazását. Ekkor azonban a biológiai lebonthatósági vizsgálat specifikus kritériuma elvész.

IRODALOM

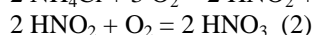
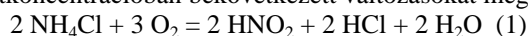
- Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 225.

V. Melléklet

AZ OXIGÉNFELVÉTELI ADATOK KORRIGÁLÁSA A NITRIFIKÁCIÓ HATÁSÁNAK TESZTELÉSÉRE

A nitrogént nem tartalmazó anyagok esetében a nitrifikáció hatásainak figyelmen kívül hagyása az oxigénfelvétel megállapításakor nem okoz szignifikáns (5%-ot meghaladó) hibát, akkor sem, ha a közegben lévő ammónium-N oxidációja rendszertelenül bekövetkezik a vizsgálati és vakpróba edények között. Nitrogéntartalmú vizsgálati anyagok esetében azonban a nitrifikáció súlyos hibák forrása lehet.

Ha a nitrifikáció bekövetkezett, de nem teljes, a reakciós keverék mért oxigénfelvétele korrigálható az ammónium-nitritre és nitrátra oxidálásához felhasznált oxigén mennyiségével, amennyiben az inkubáció során a nitrit- és nitrát-koncentrációban bekövetkezett változásokat meghatározzuk az alábbi egyenletek figyelembevételével:



Összesen:



Az (1) egyenletből látható, hogy ammónium-kloridban (NH_4Cl) lévő 28 g nitrogén nitritre oxidálása során az oxigénfelvétel 96 g, tehát a szorzótényező 3,43 (96/28). Hasonlóképpen, a (3) egyenletből látható, hogy 28 g nitrogén nitrátra oxidálása során az oxigénfelvétel 128 g, tehát a szorzótényező 4,57 (128/28).

Mivel a reakciók szekvenciálisak, tekintve, hogy meghatározott és különböző baktériumfajok felelősek értük, a nitritkoncentráció egyaránt nőhet és csökkenhet; ez utóbbit egyenértékű nitrátkoncentráció-növekedés kíséri. Tehát, a nitrátképződés során felhasznált oxigén mennyiségét a nitrátkoncentráció-növekedés 4,57-al való szorzása útján kapjuk meg, míg a nitritképződés során felhasznált oxigén mennyiségét a nitritkoncentráció-növekedés 3,43-al való szorzása útján kapjuk meg, illetve a nitritkoncentráció csökkenése során elveszett oxigén mennyiségét a nitritkoncentráció-csökkenés 3,43-al való szorzása adja meg.

Tehát:

$$\text{nitrátképződés során felhasznált O}_2 = 4,57 \times \text{nitrátkoncentráció növekedése} \quad (4)$$

és

$$\text{nitritképződés során felhasznált O}_2 = 3,43 \times \text{nitritkoncentráció növekedése} \quad (5)$$

és

$$\text{nitritkoncentráció-csökkenés során elveszett O}_2 = 3,43 \times \text{nitritkoncentráció csökkenése} \quad (6)$$

így

$$\text{nitrifikációból adódó O}_2 \text{ felvétel} = \pm 3,43 \times \text{nitritkonc. változás} + 4,57 \times \text{nitrátkonc. növekedése} \quad (7)$$

ebből

$$\text{C-oxidációból adódó O}_2 \text{ felvétel} = \text{teljes megfigyelt felvétel} - \text{nitrifikációból adódó felvétel} \quad (8)$$

Amennyiben csak az oxidált N teljes mennyiségét határozzuk meg, úgy a nitrifikációból adódó oxigénfelvétel mennyiségét első közelítésként vehetjük az oxidált N növekedésének 4,57-szorosának ($4,57 \times$ oxidált N növekedése).

A C-oxidációból adódó oxigénfelvétel korrigált értékét ezután összehasonlítjuk a II. Mellékletben leírtak szerint kiszámított $\text{ThOD}_{\text{NH}_3}$ értékkel.

C.5. LEBOMLÁS – BIOKÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A módszer célja szilárd vagy folyékony szerves anyagok biokémiai oxigénigényének (BOI) meghatározása.

Ezzel a módszerrel vízben oldható vegyületeket vizsgálunk, de a módszer elvileg illékony, illetve alacsony vízzoldékonysággal rendelkező vegyületek vizsgálatára is alkalmas.

A módszer csak olyan szerves anyagok esetében alkalmazható, amelyek a vizsgálat során alkalmazott koncentráció mellett nem gyakorolnak gátló hatást baktériumokra. Amennyiben a vizsgálati anyag nem oldható a vizsgálat során alkalmazni kívánt koncentrációban, úgy az anyag megfelelő mértékű diszpergálása céljából szükség lehet megfelelő eljárások – pl. ultrahangos diszpergálás – alkalmazására.

A vizsgálati anyag toxicitására vonatkozó adatok hasznosak lehetnek az alacsony vizsgálati eredmények értelmezése, illetve a megfelelő vizsgálati koncentráció megállapítása során.

1.2. Definíciók és egységek

A BOI definíció szerint annak az oldott oxigénnek a tömege, amely az adott anyagot tartalmazó oldat meghatározott mennyiségének meghatározott körülmények között történő biokémiai oxidációjához szükséges.

Az eredményt BOI (gramm) / vizsgálati anyag (gramm) formában fejezzük ki.

1.3. Referenciaanyagok

Az oltóanyag aktivitásának ellenőrzése végett megfelelő referenciaanyag alkalmazása szükséges.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyag előre meghatározott mennyiségét megfelelő közegben oldjuk vagy diszpergáljuk, mikroorganizmusokkal beoltjuk, majd állandó meghatározott szobahőmérsékleten, sötétben inkubáljuk.

A BOI értékét a vizsgálat elején és végén mért oldott oxigén tartalom különbségének meghatározása útján számítjuk ki. A vizsgálat időtartamának legalább öt napnak kell lennie, de nem lehet több, mint 28 nap.

A vizsgálattal párhuzamosan el kell végezni egy vizsgálati anyagot nem tartalmazó vakpróbát.

1.5. Minőségi kritériumok

A BOI meghatározása nem tekinthető a biológiai lebonthatóság megállapításának az adott anyag vonatkozásában; ez a vizsgálat csupán egy tesztvizsgálatnak tekinthető.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

A vizsgálandó anyagból oldatot vagy diszperziót készítünk úgy hogy az alkalmazott módszernek megfelelő BOI-koncentrációt kapjunk. Ezt követően a BOI értékét egy megfelelő nemzeti vagy nemzetközi standardizált módszer alkalmazásával határozzuk meg.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

Az induló oldat BOI értékét kiszámítjuk a kiválasztott standardizált módszer segítségével, majd átszámítjuk BOI (gramm) / vizsgálati anyag (gramm) formába.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

Az alkalmazott módszert fel kell tüntetni.

A biokémiai oxigénigényt legalább három érvényes mérés átlagaként kell meghatározni.

Valamennyi, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges adatot és kiegészítő megjegyzést bele kell foglalni a jelentésbe, különösen a vizsgálati anyagnak az eredményeket befolyásoló szennyeződései, halmazállapota, toxikus hatásai és összetétele vonatkozásában.

Ha a biológiai nitrifikáció gátlása céljából segédanyagot használunk, úgy a jegyzőkönyvben ezt is fel kell tüntetni.

4. IRODALOM

Példák standardizált módszerekre:

- NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.
- NBN 407: Biochemical oxygen demand.
- NEN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).
- The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.
- ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

C.6. LEBOMLÁS – KÉMIAI OXIGÉNIGÉNY

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A módszer célja szilárd vagy folyékony halmazállapotú szerves anyagok kémiai oxigénigényének (KOI) önkényesen megválasztott, standardizált módon történő mérése, meghatározott laboratóriumi körülmények között.

A vizsgálati anyag képletére vonatkozó adatok hasznosak lehetnek a vizsgálat végrehajtása és az eredmények értékelése szempontjából (pl. halogén-sók, szerves vegyületek vas (II)-sói, klórozott szerves vegyületek).

1.2. Definíciók és egységek

A kémiai oxigénigény az anyag oxidálhatóságának a mérőszáma, amelyet az anyag által meghatározott laboratóriumi körülmények között felhasznált oxidáló reagens mennyiségével ekvivalens oxigénmennyiséggel fejezünk ki.

Az eredményt KOI (gramm) / vizsgálati anyag (gramm) formában fejezzük ki.

1.3. Referenciaanyagok

Új anyag vizsgálatokor nem kell minden esetben referenciaanyagokat alkalmazni. A referenciaanyagokat elsősorban a módszer időnkénti kalibrálása céljából alkalmazzuk, illetve, hogy lehetővé tegyék az eredmények összehasonlíthatóságát másik módszer alkalmazása esetén.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyag vízben oldott vagy diszpergált előre meghatározott mennyiségét oxidáljuk kálium-dikromáttal erős kénsavas közegben, ezüst-szulfát katalizátorral, visszafolyatás (reflux) mellett két órán keresztül. A maradék dikromát mennyiségét ismert faktorú vas (II)-ammónium-szulfáttal történő titrálás útján határozzuk meg.

Klórtartalmú anyagok esetében higany-szulfát (*) hozzáadásával mérsékeljük a klorid zavaró hatását.

(* A higany-sókat tartalmazó oldatokat használat után megfelelő módon kezelni kell, hogy megakadályozzuk a higany kikerülését a környezetbe.)

1.5. Minőségi kritériumok

A meghatározás önkényes jellege miatt a KOI-értéket egy „oxidálhatósági mérőszámnak” tekintjük, és szerves anyagok mérésére szolgáló gyakorlati módszerként alkalmazzuk.

A klorid ionok jelenléte befolyásolhatja a vizsgálatot; szervesetlen redukáló vagy oxidáló anyagok szintén befolyásolhatják a KOI meghatározását.

Egyes gyűrűs vegyületek és számos illékony anyag (pl. alacsony szénatomszámú zsírsavak) nem oxidálódnak teljes mértékben e vizsgálat során.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

A vizsgálandó anyagból oldatot vagy diszperziót készítünk úgy, hogy 250–600 mg/liter közötti KOI-értéket kapjunk.

Megjegyzés:

Rosszul oldódó és nem diszpergálható anyagok esetében kimérhetünk 5 mg KOI értéknek megfelelő mennyiségű finomra porított vagy folyékony anyagot és vízzel a kísérleti berendezésbe adagolhatjuk.

A kémiai oxigénigény (KOI) meghatározására gyakran – és különösen rosszul oldódó anyagok esetében – alkalmasabb lehet e módszernek egy módosított változata, amelynek során egy zárt rendszert alkalmazunk nyomáskiegyenlítővel (H. Kelkenberg, 1975). E variáns segítségével gyakran sikeresen vizsgálhatók a hagyományos módszer által csak nehezen meghatározható anyagok – pl. ecetsav – is. Piridin vizsgálatára azonban ez a módszer sem alkalmas. Ha az (1) hivatkozásban előírt kálium-dikromát koncentrációt megemeljük 0,25 N (0,0416 M) értékre, ez

megkönnyíti a vizsgálati anyag 5–10 mg-jának közvetlen bemérését, amely elengedhetetlen vízben rosszul oldódó anyagok KOI értékének meghatározásához [(2) hivatkozás].

Egyéb esetekben a KOI értékét inentől egy megfelelő nemzeti vagy nemzetközi standardizált módszer alkalmazásával határozzuk meg.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A kísérleti edény tartalmának KOI értékét kiszámítjuk a kiválasztott standardizált módszer segítségével, majd átszámítjuk KOI (gramm) / vizsgálati anyag (gramm) formába.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

Az alkalmazott referenciamódszert fel kell tüntetni.

A kémiai oxigénigényt legalább három mérés átlagaként kell meghatározni. Valamennyi, az eredmények értelmezése szempontjából lényeges adatot és kiegészítő megjegyzést bele kell foglalni a jelentésbe, különösen a vizsgálati anyagnak az eredményeket befolyásoló szennyeződései, halmazállapota és alapvető tulajdonságai (amennyiben ismertek) vonatkozásában.

Ha a klorid befolyásoló hatásának minimalizálása céljából higany-szulfátot alkalmazunk, úgy ezt is jegyzőkönyvbe kell venni.

4. IRODALOM

(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.

Példák standardizált módszerekre:

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 the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg / litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

C.7. LEBOMLÁS – ABIOTIKUS LEBOMLÁS: HIDROLÍZIS A pH FÜGGVÉNYÉBEN

1. MÓDSZER

Ez a módszer az (1) számú OECD Vizsgálati Irányelven (Test Guideline) alapul.

1.1. Bevezetés

A hidrolízis egy, az abiotikus lebomlást szabályozó fontos reakció. Ez a reakció különösen lényeges a biológiailag rosszul lebontható anyagok esetében; emellett befolyásolhatja egy anyag perzisztenciáját a környezetben.

A legtöbb hidrolízisreakció pszeudo-elsőfokú, így a felezési idők a koncentrációtól függetlenek. Ez általában lehetővé teszi a laboratóriumi koncentrációk mellett kapott eredmények extrapolációját környezeti körülményekre.

Ezen kívül több példa (2) mutat a tiszta és a természetes vizek esetében kapott eredmények megfelelő mértékű egyezőségére különböző típusú vegyi anyagok esetében.

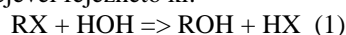
A vizsgálat végrehajtása szempontjából hasznos, ha előzetes adatokkal rendelkezünk az anyag göznyomásával kapcsolatban.

Ez a módszer csak vízben oldódó anyagok esetében alkalmazható. Az anyag szennyeződései hatással lehetnek az eredményre.

A vegyi anyagok hidrolitikus viselkedése környezeti körülmények között gyakrabban előforduló pH értékek (pH 4–9) mellett vizsgálandó.

1.2. Definíciók és egységek

A hidrolízis fogalma egy RX vegyi anyag vízzel való reakciójához kapcsolódik. Ez a reakció az X csoport –OH nettó cseréjével fejezhető ki:



Az RX koncentráció csökkenési sebessége a következőképpen fejezhető ki:

$$\text{sebesség} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] \quad (2)$$

Mivel a víz sokkal nagyobb mennyiségben van jelen, mint a vegyi anyag, ezt a típusú reakciót általában pszeudo-elsőfokú reakciónak hívjuk, amelynél a megfigyelt sebességi állandót az alábbi összefüggés alapján lehet meghatározni:

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad (3)$$

Ez a konstans egy pH-érték és egy hőmérséklet, T, esetében az alábbi kifejezés alapján határozható meg:

$$k_{\text{obs}} = (2,303 / t) \times \log (C_0 / C_t) \quad (4)$$

ahol:

t = idő,

C₀ = az anyag koncentrációja a 0. időpontban,

C_t = az anyag koncentrációja a t. időpontban, és

2,303 = a természetes és 10-es alapú logaritmusok közötti váltószám.

A koncentrációkat gramm/liter vagy mól/liter formában fejezzük ki.

A k_{obs} konstans mértékegysége az (idő)⁻¹.

A „felezési idő”, t_{1/2} definíció szerint a vizsgálati anyag koncentrációjának 50%-kal való csökkenéséhez szükséges időtartam, azaz:

$$C_t = t_{1/2} C_0 \quad (5)$$

A (4) és (5) kifejezésekből levezethető, hogy:

$$t_{1/2} = 0,693/k_{\text{obs}} \quad (6)$$

1.3. Referenciaanyagok

Új anyag vizsgálatok nem kell minden esetben referenciaanyagokat alkalmazni. A referenciaanyagokat elsősorban a módszer végrehajtásának időnkénti ellenőrzése céljából alkalmazzuk, illetve, hogy lehetővé tegyék az eredmények összehasonlíthatóságát másik módszer alkalmazása esetén.

A következő anyagok kerültek már alkalmazásra referenciaanyagként:

Acetilszalicilsav (aszpirin)

Tiofoszforsav-o,o-dietil-o-(6-metil-2-(1-metil-etil) 4-pirimidinil)-észter. (Dimpylate, Diazinon)

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálati anyagot vízben oldjuk alacsony koncentrációban; a pH értéket és a hőmérsékletet szabályozzuk.

Az anyag koncentrációjának időbeli csökkenését tetszőleges megfelelő analitikai eljárás segítségével követjük nyomon.

A koncentráció logaritmusát az idő függvényében ábrázoljuk, és amennyiben egy egyenest kapunk, úgy az elsőfokú sebességi állandó meghatározható az egyenes meredekségéből (lásd a 2. pontot).

Amennyiben a sebességi állandó közvetlen meghatározása egy adott hőmérsékletnél gyakorlati okokból nem célszerű, úgy általában meg lehet becsülni a konstans értékét az Arrhenius-összefüggés segítségével, amely a sebességi állandó hőmérséklettől való függését adja meg. A megfelelő hőmérséklet mellett meghatározott sebességi állandó logaritmusának az abszolút hőmérséklet (K) reciprokéjaként függvényében ábrázolt egyeneséből extrapolálni tudunk olyan sebességi állandó értékeket is, amelyek közvetlenül nem meghatározhatóak.

1.5. Minőségi kritériumok

A (2) hivatkozásban említett dokumentum tanúsága szerint, szerves struktúrák 13 osztálya esetében a hidrolízis sebességi állandó értékek nagy pontossággal meghatározhatóak.

A reprodukálhatóság különösen függ a pH-értéktől és a hőmérséklettől, továbbá hatással lehet rá a mikroorganizmusok jelenléte, illetve speciális esetekben az oldott oxigén koncentrációja.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Reagensok

1.6.1.1. Pufferoldatok

A vizsgálatot három pH-érték mellett végezzük el: 4,0, 7,0 és 9,0.

Erre a célra pufferoldatokat kell készíteni reagens tisztaságú anyagok és desztillált vagy ioncserélt steril víz felhasználásával. A Függelék felsorol néhány példát pufferrendszerekre.

Az alkalmazott pufferrendszer befolyásolhatja a hidrolízis sebességét. Amennyiben erre nézve bizonyíték áll rendelkezésre, úgy egy másik pufferrendszert kell alkalmazni. A (2) hivatkozásban a borát- vagy acetátpuffer alkalmazása ajánlott a foszfát helyett.

Amennyiben a pufferoldatok pH-értéke a vizsgálati hőmérsékleten nem ismert, úgy ez meghatározható egy kalibrált pH-mérő segítségével a kiválasztott hőmérsékleten $\pm 0,1$ pH-egység pontossággal.

1.6.1.2. Vizsgálati oldatok

A vizsgálati anyagot a kiválasztott pufferben kell feloldani úgy, hogy a koncentráció ne haladja meg a 0,01 M értéket, vagy a telítettségi koncentráció felét, amennyiben ez utóbbi alacsonyabb.

A vízzel elegyíthető szerves oldószerek alkalmazása csak alacsony vízdoldékonyságú anyagok esetében ajánlott.

Az oldószert mennyisége nem érheti el az 1%-ot, és nem zavarhatja a hidrolízis folyamatát.

1.6.2. Eszközök

Dugóval lezárt üveglombikokat alkalmazunk; és a csiszolt csatlakozási felületeken nem lehet zsír.

Amennyiben a vizsgálati anyag vagy a pufferrendszer illékony, vagy a vizsgálatot magas hőmérsékleten végezzük, úgy légmentesen zárt csövek alkalmazása megfelelő, lehetőleg folyadék feletti légtér jelenléte nélkül.

1.6.3. Analitikai módszer

Az alkalmazott módszernek specifikusnak kell lennie, hogy lehetővé tegye a vizsgálati anyag meghatározását a vizsgálati oldat koncentrációk mellett; alkalmazható több megfelelő analitikai eljárás kombinációja is.

Hogy milyen analitikai módszert alkalmazunk, az az anyag jellegétől függ, de az alkalmazott módszernek megfelelően pontosnak és érzékenynek kell lennie ahhoz, hogy segítségével észlelhető legyen az induló koncentráció 10%-os csökkenése.

1.6.4. Vizsgálati körülmények

A vizsgálatot termosztáttal szabályozott zárt tér, vagy a kiválasztott hőmérséklethez képest $\pm 0,5$ °C eltéréssel beállított állandó hőmérsékletű fürdő alkalmazásával kell végrehajtani. A hőmérsékletet $\pm 0,1$ °C pontossággal kell mérni és szabályozni. A fény okozta zavaró hatásokat megfelelő módon kell kiküszöbölni.

Könnyen oxidálható anyagok esetében az oldott oxigént el kell távolítani (pl. nitrogénnel vagy argonnal való ötperces buborékolatással, az oldat elkészítését megelőzően).

1.6.5. Vizsgálati eljárás

1.6.5.1. Elővizsgálat

Valamennyi anyag esetében végre kell hajtani egy elővizsgálatot $50 \pm 0,5$ °C hőmérsékleten, a következő három különböző pH-érték mellett: 4,0, 7,0 és 9,0. Megfelelő számú mérést kell végezni ahhoz, hogy meg lehessen becsülni, hogy a különböző pH-értékek mellett 50 °C hőmérsékleten a felezési idő ($t_{1/2}$) rövidebb-e 2-4 óránál, illetve, hogy 10%-nál kisebb

mértékű hidrolízis figyelhető-e meg 5 nap alatt. (Ezek az értékek becslhetően egy napnál rövidebb, illetve egy évnél hosszabb felezési időknél felelnek meg a környezetihez közelebb álló körülmények között (25 °C). Amennyiben az előzetes vizsgálat alapján megállapítható, hogy 50 °C-on mindhárom pH-érték mellett (4, 7 és 9) a vizsgálati anyag legalább 50%-a hidrolizált 2-4 óra alatt, vagy a hidrolízis aránya nem érte el a 10%-ot öt nap alatt, úgy további vizsgálatokra nincs szükség.

Egyéb esetekben, illetve azon pH-értékek esetében, amelyekre a fenti feltétel nem teljesült, az 1. vizsgálatot kell elvégezni.

1.6.5.2. 1. vizsgálat

Az 1. vizsgálatot egyetlen hőmérsékleten – lehetőleg $50 \pm 0,5$ °C-on – végezzük el, lehetőleg steril körülmények között, azon pH-értékek mellett, amelyek esetében az előzetes vizsgálat eredménye további vizsgálódás szükségességét jelezte.

A meghatározott pH-értékek esetében meg kell vizsgálni, hogy pszeudo-elsőfokú-e a reakció; ehhez megfelelő számú mintát (legalább négyet) kell kiválasztani a 20–70% hidrolízis tartomány lefedéséhez.

Valamennyi pH-érték esetében, amely mellett végrehajtjuk az 1. vizsgálatot, meg kell határozni a reakció fokát.

A sebességi állandó becslése 25 °C-on:

A továbblépés iránya attól függ, hogy az 1. vizsgálat alapján pszeudo-elsőfokúnak bizonyult-e a reakció, vagy sem.

Ha az 1. vizsgálat eredménye alapján nem állapítható meg bizonyossággal a reakció pszeudo-elsőfokú jellege, akkor a további kísérleteket a 2. vizsgálatnál leírtak szerint kell lebonyolítani.

Amennyiben az 1. vizsgálat eredménye alapján megállapítható, hogy a reakció pszeudo-elsőfokú, úgy a további kísérleteket a 3. vizsgálatnál leírtak szerint kell lebonyolítani. [Ezen kívül bizonyos körülmények között előfordulhat, hogy az 50 °C-on meghatározott sebességi állandókból kiszámíthatóak a 25 °C melletti sebességi állandó, az 1. vizsgálat eredményeinek felhasználásával (lásd a 3.2. pontot)].

1.6.5.3. 2. vizsgálat

Ezt a vizsgálatot minden olyan pH-érték esetében el kell végezni, amelynél az 1. vizsgálat eredménye ennek szükségességét jelezte,

– vagy egyetlen, 40 °C alatti hőmérsékleten,

– vagy két különböző 50 °C feletti hőmérsékleten, amelyek különbsége minimum 10 °C.

Minden egyes pH-érték és hőmérséklet esetében, amelyek mellett a 2. vizsgálatot elvégezzük, legalább hat, egymástól megfelelő távolságra lévő pontot kell venni, hogy a hidrolízis fokai a 20–70% sávba essenek.

Egy pH-értéken és egy hőmérsékleten a meghatározást két párhuzamosban végezzük. Amennyiben a 2. vizsgálatot két 50 °C feletti hőmérsékleten bonyolítjuk le, úgy a párhuzamos meghatározást lehetőleg az alacsonyabb hőmérsékleten kell végezni.

Minden egyes pH-érték és hőmérséklet esetében, amelyek mellett a 2. vizsgálatot elvégezzük, grafikus becslést kell adni a felezési időre ($t_{1/2}$) amennyiben ez lehetséges.

1.6.5.4. 3. vizsgálat

Ezt a vizsgálatot minden olyan pH-érték esetében el kell végezni, amely vonatkozásában az 1. vizsgálat eredménye ennek szükségességét jelezte,

– vagy egyetlen, 40 °C alatti hőmérsékleten,

– vagy két különböző 50 °C feletti hőmérsékleten, amelyek különbsége minimum 10 °C.

Minden egyes pH-érték és hőmérséklet esetében, amelyek mellett a 3. vizsgálatot elvégezzük, legalább három adatpontot kell venni, az elsőt a 0. időpontban, a másodikat és harmadikat pedig 30%-ot meghaladó fokú hidrolízis mellett; a k_{obs} konstans és a ($t_{1/2}$) értékét ki kell számítani.

2. ADATOK

Pszeudo-elsőfokú viselkedés esetén a k_{obs} értékeit a vizsgálatokban szereplő minden egyes pH-érték és hőmérséklet vonatkozásában megkaphatjuk a koncentráció logaritmusát az idő függvényében ábrázoló grafikonokból az alábbi kifejezés felhasználásával:

$$k_{obs} = -\text{meredekség} \times 2,303 \quad (7)$$

Ezen kívül a $t_{1/2}$ kiszámítható a (6) egyenlet alapján.

A $k_{25\text{ °C}}$ érték az Arrhenius-egyenlet alkalmazásával értékelendő, amennyiben szükséges.

Nem pszeudo-elsőfokú viselkedés esetén lásd a 3.1. pontot.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

3.1. A vizsgálati jegyzőkönyv

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

- a vizsgálati anyag meghatározása;
- a referenciaanyagok alkalmazásával kapott eredmények (amennyiben volt ilyen);
- az alkalmazott analitikai módszer elve és részletes leírása;
- minden egyes vizsgálatnál: hőmérséklet, pH-érték, pufferösszetétel és egy valamennyi koncentráció-idő adatpontot tartalmazó táblázat; $t_{1/2}$
 - pszeudo-elsőfokú reakció esetében a k_{obs} és $t_{1/2}$ értékek, a kiszámítási eljárás feltüntetésével;
 - nem pszeudo-elsőfokú reakció esetében az eredményt úgy kell megadni, hogy a koncentráció logaritmusát az idő függvényében ábrázoljuk;
 - az eredmények értelmezéséhez szükséges valamennyi információ és megfigyelés.

3.2. Az eredmények értelmezése

Előfordulhat, hogy a vizsgálati anyagok sebességi állandó értékeit (25 °C-on) elfogadható pontossággal ki lehet számítani, amennyiben egy adott vizsgálati anyag esetében rendelkezésre állnak kísérleti úton meghatározott aktivációs energia értékek az anyag homológjaira vonatkoztatva, és feltéve, hogy elfogadható bizonyossággal feltételezhető, hogy a vizsgálati anyag aktivációs energiája nagyságrendileg ugyanakkora.

4. IRODALOM

- (1) OECD, Párizs, 1981, Test Guideline 111, Decision of the Council C(81) 30 final.
- (2) W. Mabey and T. Mill, „Critical Review of Hydrolysis of Organic Compounds in Water Under Environmental Conditions”, J. Phys. Chem. Ref. Data, 1978, vol. 7 (2), 383415.

Függelék

Pufferoldatok

A. A CLARK- ÉS LUBS-féle pufferoldat

Az alábbi táblázatokban szereplő pH-értékek a potenciális mérésekből lettek kiszámítva a Sørensen-féle standard egyenletek felhasználásával. A tényleges pH-értékek 0,04 egységgel magasabbak a táblázatban feltüntetett értékeknél.

Összetétel	pH
0,1 mol/l kálium-hidrogén-ftalát + 0,1 mol/l HCl 20 °C-on 2,63 ml 0,1 mol/l HCl + 50 ml ftalát 100 ml-re kiegészítve	3,8
0,1 mol/l kálium-hidrogén-ftalát + 0,1 mol/l NaOH 20 °C-on 0,40 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-re kiegészítve 3,70 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml ftalát 100 ml-re kiegészítve	4,0 4,2
0,1 mol/l monokálium-foszfát + 0,1 mol/l NaOH 20 °C-on 23,45 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-re kiegészítve 29,63 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-re kiegészítve	6,8 7,0
35,00 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml foszfát 100 ml-re kiegészítve	7,2

Összetétel	pH
0,1 mol/l H_3BO_3 + 0,1 mol/l KCl + 0,1 mol/l NaOH 20 °C-on	
16,30 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml bórsav 100 ml-re kiegészítve	8,8
21,30 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml bórsav 100 ml-re kiegészítve	9,0
26,70 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml bórsav 100 ml-re kiegészítve	9,2

B. KOLTHOFF ÉS VLEESHOUWER-féle pufferoldat

Összetétel	pH
0,1 mol/l monokálium citrát és 0,1 mol/l NaOH 18 °C-on (a gombásodást egy apró timolkristály hozzáadásával kell megakadályozni)	
2,0 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrát 100 ml-re kiegészítve	3,8
9,0 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrát 100 ml-re kiegészítve	4,0
16,3 ml 0,1 mol/l NaOH + 50 ml citrát 100 ml-re kiegészítve	4,2

C. A SÖRENSEN-féle pufferoldat

0,05 mol/l bórax + 0,1 mol/l HCl

Összetétel		pH			
ml Bórax	ml HCl	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
8,0	2,0	8,91	8,96	8,77	8,59
8,5	1,5	9,01	9,06	8,86	8,67
9,0	1,0	9,09	9,14	8,94	8,74
9,5	0,5	9,17	9,22	9,01	8,80
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 mol/l bórax + 0,1 mol/l NaOH

Összetétel		pH			
ml Bórax	ml NaOH	Sörensen 18 °C	Walbum		
			10 °C	40 °C	70 °C
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

C.8 FÖLDIGILISZTATESZT

FÖLDIGILISZTATESZT MESTERSÉGES TALAJBAN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálatban a tesztanyagot mesterséges talajhoz adjuk, amelybe 14 napra földigilisztákat helyezünk. A 14 nap eltelte után (a másik választható módszerrel hét nap után) megvizsgáljuk a tesztanyag földigilisztákra kifejtett letális hatását. A módszerrel viszonylag rövid idő alatt tesztelhető – a földigiliszták által a bőrön keresztül és táplálkozással felvett – vizsgálati anyag hatása.

1.2. Definíciók és mértékegységek

LC₅₀: a vizsgálati anyag azon koncentrációja, amely a teszt ideje alatt az állatok 50 százalékának pusztulását okozza.

1.3. Referenciaanyagok

Rendszeresen referenciaanyagot alkalmazunk annak ellenőrzésére, hogy a vizsgálati rendszer érzékenysége nem változott-e meg.

Referenciaanyagként analitikai tisztaságú klór-acetamid használata javasolt.

1.4. A módszer elve

A talaj változékonny közeg, ezért ebben a vizsgálatban pontosan definiált mesterséges vályogtalajt használunk. A kifejlett földigilisztákat (*Eisenia foetida*) (lásd a megjegyzést a Függelékben) meghatározott összetételű, a vizsgálati anyag különböző koncentrációival kezelt mesterséges talajban tartjuk. A tartály tartalmát a vizsgálat kezdetétől számított 14 nap eltelte után (a másik választható módszer szerint hét nap után) tálcára szórjuk, és valamennyi koncentrációnál megszámoljuk az élő földigilisztákat.

1.5. Minőségi kritériumok

A vizsgálati módszert úgy tervezték meg, hogy a tesztközeg és a szervezetek szempontjából a lehető legnagyobb mértékben reprodukálható legyen. A vizsgálat csak akkor érvényes, ha a kontrollban a mortalitás a vizsgálat végére nem haladja meg a 10 százalékot.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Anyagok

1.6.1.1. Vizsgálati közeg

Alapközegként meghatározott összetételű mesterséges talajt használunk.

a) Az alapközeg (mesterséges talaj) összetétele a száraz tömeg százalékában kifejezve:

- 10% tőzegmoha (finomra őrölve, látható növényi maradványokat nem tartalmazhat, pH-értékének az 5,5–6,0 tartományhoz a lehető legközelebb kell lennie);
- 20% kaolinit-agyag, amelynek kaolinit-tartalma lehetőleg 50% felett van;
- körülbelül 69% ipari kvarchomok (legnagyobb része finom homok, a mennyiség legalább 50 százalékának szemcsemérete 0,05–0,2 mm); ha a tesztanyag vízben nem diszpergálható kielégítő mértékben, akkor vizsgálati tartályonként 10 g-ot készenlében tartunk, és a vizsgálati anyagot ebbe keverjük;
- körülbelül 1% porított, kémiaiilag tiszta kalcium-karbonát (CaCO₃), a pH (6,0 ± 0,5) beállítására.

b) Tesztközeg

A tesztközeg mesterséges talajt, vizsgálati anyagot és ioncserélt vizet tartalmaz.

A víztartalom a mesterséges talaj száraz tömegére vonatkoztatva hozzávetőleg 25–42%. A közeg víztartalmát a minta 105 °C-on tömegállandóságig történő szárításával határozzuk meg. A tesztközeg nedvesítésekor döntő kritérium, hogy a mesterséges talajhoz pontosan annyi vizet adjunk, amennyit felvesz. Gondosan ügyelni kell arra, hogy a keverésnél a vizsgálati anyagot a mesterséges talajban egyenletesen eloszlassuk. A vizsgálati anyag bekeverési módját fel kell jegyezni.

c) Kontrollközeg

A kontrollközeg mesterséges talajt és vizet tartalmaz. Ha a vizsgálatban valamilyen adalékanyagot is alkalmazunk, akkor egy olyan kontrollt is be kell állítani, amely az adalékanyagot azonos mennyiségben tartalmazza.

1.6.1.2. Tesztedények

Körülbelül 1 liter térfogatú üvegtartályokat használunk (szellőzőnyílásokkal ellátott műanyag fedéllel, üvegtetővel vagy műanyag filmmel lefedve), amelyekbe a teszt- vagy a kontrollközeg 500 g száraz tömegének megfelelő nedves teszt- illetve kontroll-közeget teszünk.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

A tartályokat klímakamrában, állandó megvilágítás mellett, 20 ± 2 °C hőmérsékleten tartjuk. A megvilágítás intenzitásának a 400–800 lux tartományba kell esnie.

A vizsgálat időtartama 14 nap, azonban a mortalitást a vizsgálat kezdete után már hét nappal is le lehet olvasni.

1.6.3. A vizsgálat menete

Vizsgálati koncentrációk:

A vizsgálati anyag koncentrációit az alapközeg 1 kg száraz tömegére vonatkoztatva, milligrammokban kifejezve adjuk meg [mg/kg].

Elővizsgálat:

A vizsgálati anyag 0–100 százalékos mortalitást okozó koncentrációit elővizsgálattal határozhatjuk meg. Így nyerünk információt arra vonatkozóan, hogy milyen koncentrációkat alkalmazunk a minősítő vizsgálatban.

A vizsgálati anyagot a következő koncentrációkban kell vizsgálni: 1000; 100; 10; 1; 0,1 [mg anyag/kilogramm tesztközeg (száraz tömeg)].

Ha teljes minősítő vizsgálatot fogunk végezni, akkor az elővizsgálathoz elegendő koncentrációnként (és a kezeletlen kontrollhoz) egy-egy edény, melyek mindegyikébe 10 földigilisztát teszünk.

Minősítő vizsgálat:

Az elővizsgálat eredményei alapján határozzuk meg a minősítő vizsgálatban alkalmazott koncentrációkat. Legalább öt, olyan mértani sorozatot alkotó koncentrációértéket kell kiválasztani, melyek a 0–100% mortalitási tartományt átfogják, és a hígítási tényező nem nagyobb, mint 1,8.

Az LC_{50} és a konfidenciatartomány akkor becsülhető a lehető legnagyobb pontossággal, ha a fenti elvet alkalmazzuk.

A minősítő vizsgálatot koncentrációnként legalább négy, egyenként 10 földigilisztát tartalmazó párhuzamosban, négy kezeletlen kontroll mellett (szintén 10-10 földigilisztát tartalmaz) kell végezni. A párhuzamos vizsgálatok eredményeinek átlagát és standard deviációját adjuk meg.

Amennyiben két egymást követő koncentráció – 1,8 aránynál – 0% és 100% mortalitást ad, ez a két érték elegendő annak a tartománynak a megadására, amely az LC_{50} -értéket tartalmazza.

A mesterséges talaj és a vizsgálati anyag keverése:

A vizsgálati közeget – amennyiben lehetséges – adalékanyag hozzáadása nélkül, csak víz belekeverésével készítjük. Közvetlenül a vizsgálat kezdete előtt a vizsgálati anyag ioncserélt vízzel vagy más oldószerrel készített emulzióját vagy diszperzióját a vizsgálati közeggel összekeverjük, vagy a mesterséges talajra – kromatográfiás vagy más hasonló porlasztóval – egyenletesen rápermetezzük.

Amennyiben a vizsgálati anyag nem oldódik vízben, akkor a lehető legkisebb mennyiségű szerves oldószerben (például hexánban, acetonban vagy kloroformban) kell feloldani.

A vizsgálati anyag oldékonyságának növeléséhez, diszpergálásához vagy emulgeálásához csak illékony adalékanyagokat szabad alkalmazni. A tesztközeget használat előtt szellőztetni kell, és az elpárolgott vizet is pótoljuk. A kontrollnak azonos mennyiségű adalékanyagot kell tartalmaznia.

Amennyiben a vizsgálati anyag szerves oldószerekben sem oldható, nem diszpergálható és nem emulgeálható, akkor – 500 g száraz tömegű mesterséges talaj kezeléséhez szükséges mennyiségű – vizsgálati anyagot 10 g finom kvarchomokba keverünk, és ezt adjuk 490 g száraz tömegnek megfelelő mesterséges talajhoz.

Minden edénybe 500 g száraz tömegnek megfelelő tesztközeget és a felszínére 10 földigilisztát helyezünk. Felhasználás előtt a földigilisztákat 24 órán át a vizsgálati közeghez hasonló nedves alapközegekben kondicionáljuk, utána gyorsan megmossuk, a felesleges vizet szűrőpapírral felitatjuk, csak ezután helyezzük őket a tesztközeg felszínére.

A tartályokat (a mesterséges talaj kiszáradása ellen) perforált műanyagfedéllel, üvegtetővel vagy filmmel lefedjük, majd 14 napon át az előírt vizsgálati körülmények között tartjuk.

Az eredményt 14 nap után (másik választható módszer szerint hét nap után) olvassuk le. A vizsgálati közeget üvegből vagy rozsdamentes acélból készült tálra szórjuk. A földigilisztákat megvizsgáljuk, és az élő állatokat megszámláljuk. A földigilisztákat akkor tekintjük elpusztultnak, ha az elülső végük enyhe mechanikus ingerlésére nem reagálnak.

Ha az eredményt hét nap után leolvassuk, és a tesztet folytatni kívánjuk a 14. napig, akkor a tartályba visszatöltjük a tesztközeget, és az élő földigilisztákat újra a felszínére helyezzük.

1.6.4. Tesztszervezetek

Kifejlett (legalább kéthónapos, clitellummal rendelkező), *Eisenia foetida* fajú (lásd a megjegyzést a Függelékben), 300–600 mg tömegű földigilisztákat kell alkalmazni. (A tartási módszerek leírását lásd a Függelékben.).

2. ADATOK

2.1. Az eredmények feldolgozása és értékelése

Az elpusztult földigiliszták százalékos arányát a vonatkozó koncentrációkkal együtt kell megadni.

Amennyiben elegendő adat áll rendelkezésre, az LC₅₀-értéket és a megbízhatósági tartományt (p=0,05) standard módszerek (Litchfield és Wilcoxon, 1949, az ekvivalens módszerhez) alkalmazásával kell meghatározni. Az LC₅₀-érték megadása: a vizsgálati anyag milligrammokban kifejezett mennyisége 1 kg (száraz tömeg) vizsgálati közegre vonatkoztatva (mg/kg).

Azokban az esetekben, ahol a hatásgörbe meredeksége túl nagy ahhoz, hogy az LC₅₀-érték számítható legyen, elegendő, ha ezt az értéket grafikus módszerrel becsüljük.

Amennyiben két egymást követő koncentráció – 1,8 aránynál – 0% és 100% mortalitást ad, ez a két érték elegendő annak a tartománynak a megadására, amely a LC₅₀-értéket tartalmazza.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

3.1. Az eredménylap

Az eredménylap, amennyiben lehetséges, a következő információkat tartalmazza:

- a vizsgálat a fentiekben ismertetett kritériumoknak megfelelően került-e elvégzésre;
- az elvégzett vizsgálat típusa (elővizsgálat és/vagy minősítő vizsgálat);
- a vizsgálati körülmények pontos leírása, illetve, hogy a vizsgálat a módszernek megfelelően került elvégzésre; bármilyen eltérést ismertetni kell;
- a vizsgálati anyag a vizsgálati közegbe való bekeverési módjának pontos leírása;
- a tesztszervezetre vonatkozó információk (faj, kor, átlagos tömeg és tömegtartomány, tartási és táplálási körülmények, az állatok eredete);
- az LC₅₀-érték meghatározására használt módszer;
- a vizsgálat eredményei, az összes felhasznált adat megadásával;
- a megfigyelt tünetek ismertetése, illetve a tesztszervezet viselkedésének változásai;
- mortalitás a kontrollcsoportnál;
- az LC₅₀-érték vagy a legnagyobb vizsgált koncentráció, amely nem eredményezett mortalitást, illetve az a legkisebb koncentráció, amely a vizsgálat kezdete után 14 nappal (másik választható módszer szerint hét nappal) 100% mortalitást okozott,
- a koncentráció/válasz görbe grafikus ábrázolása;
- a referenciaanyaggal kapott eredmények, a jelen vizsgálattal összefüggésben vagy korábbi minőségellenőrzésből.

4. IRODALOMJEGYZÉK

- (1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Decision of the Council C (81) 30 final.
- (2) Edwards, C. A. és Lofty, J.R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331.
- (3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671.
- (4) Litchfield, J. T. és Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, 99. old.
- (5) Az Európai Közösség Bizottsága, *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 künstlichen Boden'*, in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, exomed, Landsberg, 1986.

Függelék

A földigiliszták táplálása és tartása a vizsgálat előtt

A tenyésztéshez 30-50 kifejlett földigilisztát friss mesterséges talajt tartalmazó tenyésztődobozba teszünk, majd 14 nap elteltével kivesszük őket. Ezeket az állatokat további tenyészedeényekhez lehet használni. A kokonokból kikelt földigiliszták kifejlett koruk elérése után (az előírt körülmények között tartva, két-három hónap elteltével) használhatók fel a vizsgálatokhoz.

A tenyésztés és a táplálás körülményei

Klímakamra: 20 ± 2 °C hőmérséklet, lehetőség szerint állandó megvilágítással (fényintenzitás: 400–800 lux).

Tenyészedeények: 10-20 liter térfogatú, alacsony dobozok.

Tenyészetalaj: Az *Eisenia foetida*-t különféle állati trágyák alkalmazásával is lehet tenyészteni. Tenyészkezőgként célszerű 50 térfogatszázalék tőzegtől és 50 térfogatszázalék szarvasmarha vagy lótrágyából álló keveréket használni. A közeg pH-értékének 6-7 körül kell lennie (a pH-t kalcium-karbonáttal állítjuk be), valamint kis vezetőképességgel kell rendelkeznie (kisebb, mint 6 mohm, illetve 0,5% sókoncentráció).

A talajnak nyirkosnak kell lennie, azonban ne legyen túl nedves.

A fentiekben ismertetett módszer mellett más megfelelő eljárást is lehet alkalmazni.

Megjegyzés: Az *Eisenia foetidának* két alfaja létezik, melyeket egyes taxonómusok két külön fajnak tekintenek (Bouche, 1972). Ezek morfológiailag hasonlóak, de az egyikük, az *Eisenia foetida foetida* szelvényein jellegzetes átlós csíkozás vagy sávozás található, míg az *Eisenia foetida andreinél* a sávozottság hiányzik, viszont színe a vörös különféle árnyalatai lehetnek. Amikor csak lehetséges, az *Eisenia foetida andrei*-t kell használni. Más fajok is alkalmazhatók, ha a szükséges módszer rendelkezésre áll.

C.9 BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

ZAHN–WELLENS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A módszer célja a vízoldható, nem illékony szerves anyagok teljes lehetséges biológiai lebonthatóságának vizsgálata statikus rendszerben, viszonylag nagy mikroorganizmus-koncentráció mellett.

A szuszpendált szilárd anyag fizikai-kémiai adszorpció játszódhat le, amit a kapott eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd 3.2. pont).

A vizsgálandó anyagokat az 50–400 mg/liter DOC-értékeknek megfelelő koncentrációtartományban, vagy a 100–1000 mg/liter KOI-értékeknek megfelelő koncentrációtartományban alkalmazzuk (DOC – oldott szerves szén; KOI – kémiai oxigénigény). A viszonylag nagy koncentrációk előnye az analitikai megbízhatóság. A toxikus tulajdonságokkal rendelkező anyagok késleltethetik vagy meggátolhatják a lebomlási folyamatot.

A módszer szerint az oldott szerves szén koncentrációja vagy a kémiai oxigénigény szolgál a vizsgálati anyag teljes biológiai lebonthatóságának értékeléséhez.

Megfelelő analitikai módszer egyidejű alkalmazása lehetővé teszi az anyag elsődleges biológiai lebonthatóságának (az eredeti kémiai szerkezet eltűnése) értékelését.

A módszert csak azokra az anyagokra lehet – a fent megjelölt koncentrációban – alkalmazni, amelyek:

- a vizsgálati körülmények között vízben oldhatóak;
- a vizsgálati körülmények között gőznyomásuk elhanyagolható;
- a baktériumokra nézve nem gátló tulajdonságúak;
- a vizsgálati rendszeren belül csak korlátozott mértékben adszorbeálódnak;
- nem tűnnek el habzás révén a vizsgálati oldatból.

A vizsgálati anyag legfontosabb komponenseinek relatív arányaira vonatkozó információk hasznosak a kapott eredmények értékelésénél, különösen azokban az esetekben, ahol az eredmények kis vagy jelentéktelen biológiai lebonthatóságot mutatnak.

Szükség van a tesztanyag mikroorganizmusokon kifejtett toxicitási adataira a megfelelő vizsgálati koncentráció megválasztásához, illetve az eredmények magyarázatához, amennyiben a kapott eredmények kis biológiai lebonthatóságot mutatnak.

1.2. Definíciók és mértékegységek

A vizsgálat végén elért biológiai lebonthatóságot – mint a Zahn–Wellens-vizsgálattal kapott biológiai lebonthatóságot – a következő képlettel számítjuk ki:

$$D_T [\%] = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

ahol:

D_T – biológiai lebonthatóság a T időpontban;

C_A – DOC- (vagy KOI-)érték a vizsgálati keverékben, a vizsgálat megkezdése után három órával [mg/l] (DOC – oldott szerves szén; KOI – kémiai oxigénigény);

C_T – DOC- vagy KOI-érték a vizsgálati keverékben a mintavétel időpontjában [mg/l];

C_B – DOC- vagy KOI-érték a vakpróbában a mintavétel időpontjában [mg/l];

C_{BA} – DOC- vagy KOI-érték a vakpróbában három órával a vizsgálat megkezdése után [mg/l].

A biológiai lebonthatóság mértékét egész százalékra kerekítve kell megadni.

A százalékos biológiai lebonthatóságot mint a vizsgálati anyag DOC- (vagy KOI-)csökkenés százalékában kell megadni.

A három óra utáni és a számított vagy megfelelően mért kezdeti érték közötti különbség mértéke hasznos információt jelent az anyag lebomlására vonatkozóan (lásd 3.2. Az eredmények kiértékelése).

1.3. Referenciaanyagok

Bizonyos esetekben – amikor új anyagot vizsgálunk – célszerű lehet referenciaanyagok alkalmazása; azonban speciális referenciaanyagot még nem határoztak meg.

1.4. A módszer elve

Eleveniszapot, ásványi anyagokat, valamint a vizsgálati anyagot – mint kizárólagos szénforrást – vizes oldatban együtt egy-négy literes, keverővel és levegőztetővel ellátott üvegedénybe helyezünk. A keveréket 20–25 °C-on, szórt fény mellett 28 napon keresztül kevertetjük és levegőztetjük. A lebomlási folyamatot a DOC- (vagy a KOI-)érték szűrt oldatból – naponta vagy más megfelelő rendszeres időközönként – történő meghatározásával követjük. A biológiai lebomlás mértékét egy adott időpontban úgy határozzuk meg, hogy mért DOC- (vagy KOI-)csökkenést a vizsgálat kezdete után három órával mért érték százalékában fejezzük ki. A kapott eredményeket az idő függvényében ábrázoljuk, és így megkapjuk a biológiai lebomlás görbéjét.

Amennyiben specifikus analitikai módszert alkalmazunk, a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai lebomlás következtében bekövetkező változásait is mérni kell (primer biológiai lebomthatóság).

1.5. Minőségi kritériumok

A vizsgálat reprodukálhatósága egy körvizsgálatban megfelelőnek bizonyult.

A módszer érzékenységet jelentős mértékben meghatározza a vakpróba szórása, valamint – kisebb mértékben – az oldott szerves szén meghatározásának pontossága, illetve a vizsgálati anyag mennyisége a folyadékban.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. A vizsgálat előkészítése

1.6.1.1. Vegyszerek

Hígítóvíz: 5 mg/liter-nél kisebb szerves széntartalmú ivóvíz. A kalcium- és a magnézium-ionok együttes mennyisége nem haladhatja meg a 2,7 mmol/liter értéket; különben megfelelő mennyiségű ioncserélt vagy desztillált vízzel kell hígítani.

Kénsav, A. R.	50 g/l
Nátrium-hidroxid oldat, A. R.	40 g/l
Ásványianyag-táppoldat, egy liter ioncserélt vízben oldva:	
ammónium-klorid, NH ₄ Cl, A. R.	38,5 g
nátrium-dihidrogén-foszfát, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, A. R.	33,4 g
kálium-dihidrogén-foszfát, KH ₂ PO ₄ , A. R.	8,5 g
dikálium-hidrogén-foszfát, K ₂ HPO ₄ , A. R.	21,75 g

A keverék tápanyagként és pufferrendszerként is szolgál.

1.6.1.2. Eszközök

1–4 liter űrtartalmú üvegedények (például hengeres edények).

Megfelelő tengelyre szerelt üveg- vagy fémkeverővel ellátott keverőberendezés (a keverőnek körülbelül 5–10 cm-rel az edény alja felett kell forognia). 7–10 cm hosszú rudat forgató mágneses keverő is használható.

2–4 mm belső átmérőjű üvegcső a levegő bevezetésére. A csővég körülbelül 1 cm-rel az edény alja felett legyen.

Centrifuga (hozzávetőleg 3550 g).

pH-mérő.

Oldottoxigén-mérő.

Szűrőpapír.

Membránszűrő-készülék.

0,45 µm-es pórusméretű membránfilterek. A membránfilterek akkor megfelelőek, ha nem oldódik ki belőlük szerves szén, illetve nem adszorbeálják az anyagot.

A szerves széntartalom és a kémiai oxigénigény meghatározására szolgáló analitikai berendezés.

1.6.1.3. Az oltóanyag előkészítése

A szennyvíztisztító telepről származó eleveniszapot a (fentiekben ismertetett) hígítóvízzel történő többszöri centrifugálással vagy üleptéssel mossuk.

Az eleveniszapnak megfelelő állapotúnak kell lennie. Ilyen iszapot a megfelelően működő szennyvíztisztító telepekről lehet beszerezni. Annak érdekében, hogy az oltóanyag a lehető legtöbbféle baktériumot tartalmazza, célszerű a különböző forrásokból – például különböző szennyvíztelepekről, talajextraktumokból, folyóvizetkből – származó oltóanyagokat keverni. A keveréket aztán a fent leírt módszer szerint kell kezelni.

Az eleveniszap aktivitásának ellenőrzéséhez lásd az alábbiakban a „Funkcionális ellenőrzés” című részt.

1.6.1.4. A vizsgálati oldatok készítése

A vizsgálati edénybe töltünk 500 ml hígítóvizet, 2,5 ml/liter ásványianyag-táppoldatot, valamint annyi eleveniszapot, amennyi 0,2–1,0 g/liter szárazanyagának felel meg a végső keverékben. Adjuk hozzá megfelelő mennyiségben a vizsgálandó anyag törzsoldatát, hogy végül a DOC-koncentráció 50–400 mg/liter legyen. A megfelelő KOI-értékek 100–1000 mg/liter. Egészítsük ki hígítóvízzel 1–4 literre. A teljes térfogat megválasztása a DOC illetve a KOI meghatározásához szükséges mintaszámtól, valamint az analitikai eljáráshoz szükséges mennyiségtől függ.

Általában két liter elegendő. Legalább egy kontrollédényt (vakpróbát) kell valamennyi vizsgálati sorozattal együtt beállítani. A vakpróba csak eleveniszapot és hígítóvízzel készült ásványianyag-táppoldatot tartalmaz, a vizsgálati edényben lévővel megegyező mennyiségben.

1.6.2. A vizsgálat kivitelezése

A vizsgálati edényt mágneses keverővel vagy pálcás keverővel szórt fény mellett vagy sötétszobában 20–25 °C hőmérsékleten kevertetjük. A levegőztetést sűrített levegővel végezzük, amelyet – szükség esetén – vattaszűrő és mosóedény beiktatásával tisztítunk. Biztosítani kell, hogy a lebegőanyag ne ülepedjen le, illetve az oxigénkoncentráció ne csökkenjen 2 mg/liter alá.

A pH-értéket rendszeres időközönként (például naponta) ellenőrizzük, illetve szükség esetén a pH 7–8 értékre állítjuk.

A párolgási veszteségeket a mintavétel előtt szükséges mennyiségű ioncserélt vagy desztillált vízzel pótoljuk. Jelöljük a folyadékszintet a vizsgálati edényen a vizsgálat kezdete előtt. Minden mintavétel után az új szintet meg kell jelölni (keverés és levegőztetés nélkül). Az első mintát minden esetben a vizsgálat kezdete után három órával kell venni, hogy megállapítsuk a vizsgálati anyag az eleveniszapon történő adszorpciójának mértékét.

A vizsgálati anyag lebomlását a DOC vagy a KOI mérésével követjük nyomon naponta vagy más célszerűen megválasztott időközönként. A vizsgálati edényből, valamint a vakpróbából vett mintákat alaposan kimosott szűrőpapíron szűrjük. Az első 5 ml vizsgálati oldatot elöntjük. A nehezen szűrődő iszapokat a szűrés előtt 10 perces centrifugálással távolítjuk el. A vizsgálat 28 napig tart.

Megjegyzés: Azokat a mintákat, amelyek zavarosak maradnak, membránszűrőn kell leszűrni. A membránszűrőből semmilyen szerves anyag nem oldódhat ki, illetve az nem adszorbeálhat szerves anyagot.

Az eleveniszap funkcionális vizsgálata

Ismert anyagot tartalmazó edénnyel minden vizsgálati sorozat esetén párhuzamos mérést kell végezni, az eleveniszap funkcionális kapacitásának ellenőrzésére. Erre a célra a dietilén-glikol megfelelő.

Adaptáció

Amennyiben az analízist viszonylag rövid időközönként (például naponta) végezzük, a lebomlási görbéből az adaptáció egyértelműen észlelhető (lásd a 2. ábrát). A vizsgálatot ezért nem szabad közvetlenül a hétvége előtt elkezdeni.

Amennyiben az adaptáció a vizsgálat periódus végén történik, a vizsgálatot meg lehet hosszabbítani, amíg a lebomlás befejeződik.

Megjegyzés: amennyiben szükség van az adaptált iszap tulajdonságainak átfogóbb ismeretére, akkor az eleveniszapot még egyszer ki kell tenni ugyanazoknak a vizsgálati körülményeknek, a következő eljárás szerint:

Allítsuk le a keverést és a levegőztetést, és hagyjuk, hogy az eleveniszap leülepedjen. A felülúszót szívjuk le, töltjük fel a hígítóvízzel két literre, kevertessük 15 percig, majd újra üleptessük. Ezután ismét szívjuk le a felülúszót, a visszamaradó iszappal pedig ismételjük meg a tesztet, azonos anyagok felhasználásával, az 1.6.1.4. és az 1.6.2. pontokban foglaltak szerint. Az eleveniszapot üleptetés helyett centrifugálással is el lehet különíteni.

Az adaptált iszapot friss iszappal is keverhetjük, szárazsúlyban számolva 0,2–1 g/liter koncentrációban.

Megjegyzések az analitikához

A mintákat általában alaposan kimosott szűrőpapíron szűrjük (a mosáshoz ioncserélt vizet kell használni).

A szűrés után is zavaros mintákat membránszűrőn (0,45 µm) szűrjük.

A DOC-koncentrációt két párhuzamos mérést végezve, a minta-szűrletekből határozzuk meg (az első 5 ml vizsgálati oldatot elöntjük), TOC-készülék segítségével. Amennyiben a szűrletet nem lehet ugyanazon a napon analizálni, akkor a következő napig hűtőszekrényben tároljuk. Hosszabb ideig nem tárolható.

A KOI-t a minta-szűrletekből határozzuk meg, a KOI-mérési módszer szerint, a (2) irodalmi hivatkozásban leírt módon.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A DOC- és/vagy a KOI-t legalább két párhuzamos mintából határozzuk meg, az 1.6.2. pontban ismertetettek szerint. A lebomlást a „T” időpontban az 1.2. pontban megadott képlet segítségével számítjuk ki.

A lebomlási százalékot egész számra kerekítve kell megadni. A vizsgálat végére elért lebomlás mértékét, mint a „Zahn-Wellens-tesztrel elért biológiai lebonthatóságot” adjuk meg.

Megjegyzés: Amennyiben a vizsgálat vége előtt a lebomlás befejeződik, és ezt az eredményt a következő napon végzett második analízis is igazolja, a vizsgálat befejezettnek tekinthető.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

3.1. A vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati jegyzőkönyv, amennyiben lehetséges, a következőket tartalmazza:

- az anyag kezdeti koncentrációját;
- a vizsgálati anyagra vonatkozó minden egyéb információt és kísérleti eredményt, az alkalmazott referenciaanyag megnevezését, valamint a vakpróba eredményeit;
- a három óra elteltével mért koncentráció értékét;
- a biológiai lebomlási görbét és annak magyarázatát;
- a tesztszervezetek mintavételi időpontját és helyét, az adaptációs állapotot, az alkalmazott koncentrációt stb.;
- a vizsgálati eljárás bármilyen megváltoztatásának tudományos indokait.

3.2. Az eredmények értékelése

A DOC (KOI) teljes lecsökkenése, amely fokozatosan, több nap, esetleg hét alatt megy végbe, azt mutatja, hogy a vizsgálati anyag biológiailag lebontható.

A fizikai-kémiai adszorpció bizonyos esetekben befolyásolhatja az eredményt; ez abból látható, hogy a vizsgálat kezdetétől számított 1–3 óra alatt a DOC teljesen eltűnik, valamint a kontroll- és a vizsgálati felülúszó DOC-tartalmának különbsége feltűnően kicsi.

Amennyiben különbséget akarunk tenni a biológiai lebomlásból vagy a részleges biológiai lebomlásból, illetve az adszorpcióból származó DOC-csökkenés között, további vizsgálatokra van szükség.

A vizsgálat többféleképpen elvégezhető, de a legjobb módszer az, ha a felülúszót vagy az eleveniszapot inokulumként respirometrikus vizsgálatban használjuk.

Azokat az anyagokat lehet potenciálisan biológiailag lebonthatóknak tekinteni, amelyeknél a DOC (KOI) nagymértékű, nem adszorpció következtében történő csökkenését tapasztaljuk. A DOC (KOI) részleges, nem adszorpció következtében történő csökkenése részleges biológiai lebonthatóságra utal. A DOC (KOI) kis mértékű csökkenése, illetve változatlansága azt mutatja, hogy a vizsgálati anyag gátolja a mikroorganizmusokat; ezt bomlás és iszapvesztés is kíséri, aminek eredményeképpen a felülúszó zavaros lesz. A vizsgálatot alacsonyabb koncentrációkat alkalmazva megismételjük.

Vegyület-specifikus analitikai módszert vagy ¹⁴C-gyel jelzett vizsgálati anyagot alkalmazva növelhető a vizsgálat érzékenysége. Amennyiben ¹⁴C-gyel jelzett vegyületet alkalmazunk, akkor a ¹⁴CO₂-visszanyerés igazolja, hogy biológiai lebomlás játszódott le.

Amennyiben az eredményeket a primer biológiai lebomlás szempontjából adjuk meg, akkor meg kell magyarázni – amennyiben lehetséges – a kémiai szerkezet változásait, melyek után a kiindulási anyag tovább már nem bontható.

Az analitikai módszer validitását (a vakpróbáéval együtt) meg kell adni.

4. IRODALOMJEGYZÉK

(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, *Official Journal of the European Communities*, No. L 251, 19.9.1984.

Függelék

Példa értékelésre

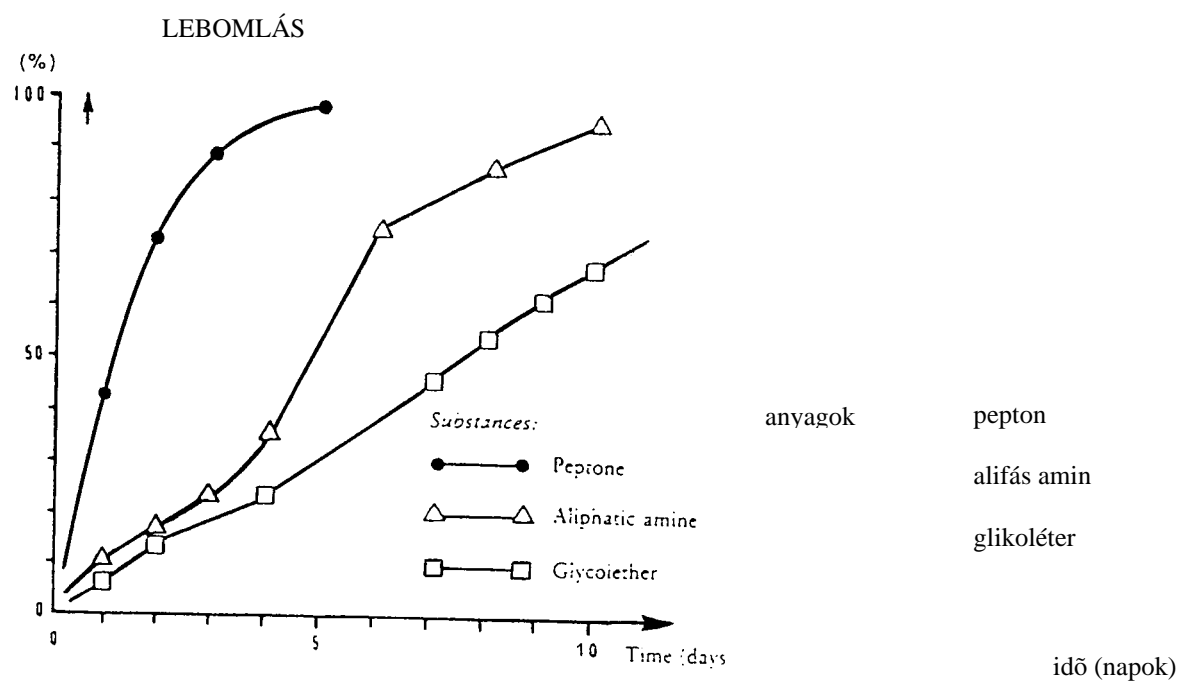
Szerves vegyület:	4-etoxi-benzoésav
Elméleti vizsgálati koncentráció:	600 mg/l
Elméleti DOC:	390 mg/l
Oltóanyag (inokulum): szennyvíztelep
Adaptációs állapot:	nincs adaptálva
Analízis:	DOC-meghatározás
A minta mennyisége:	3 ml
Kontrollanyag:	dietilén-glikol
A vegyület toxicitása:	1000 mg/l alatt nem toxikus alkalmazott teszt: fermentációs vizsgálat

Vizsgálati idő	Kontrollanyag				Vizsgálati anyag		
	Vakpróba DOC ¹ (mg/l)	DOC ¹ (mg/l)	Nettó DOC ¹ (mg/l)	Lebomlási százalék	DOC ¹ (mg/l)	Nettó DOC ¹ (mg/l)	Lebomlási százalék
0 óra	–	–	300,0	–	–	390,0	–
3 óra	4	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1. nap	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2. nap	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5. nap	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6. nap	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7. nap	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8. nap	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9. nap	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10. nap	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

¹ A három párhuzamos mérés átlaga.

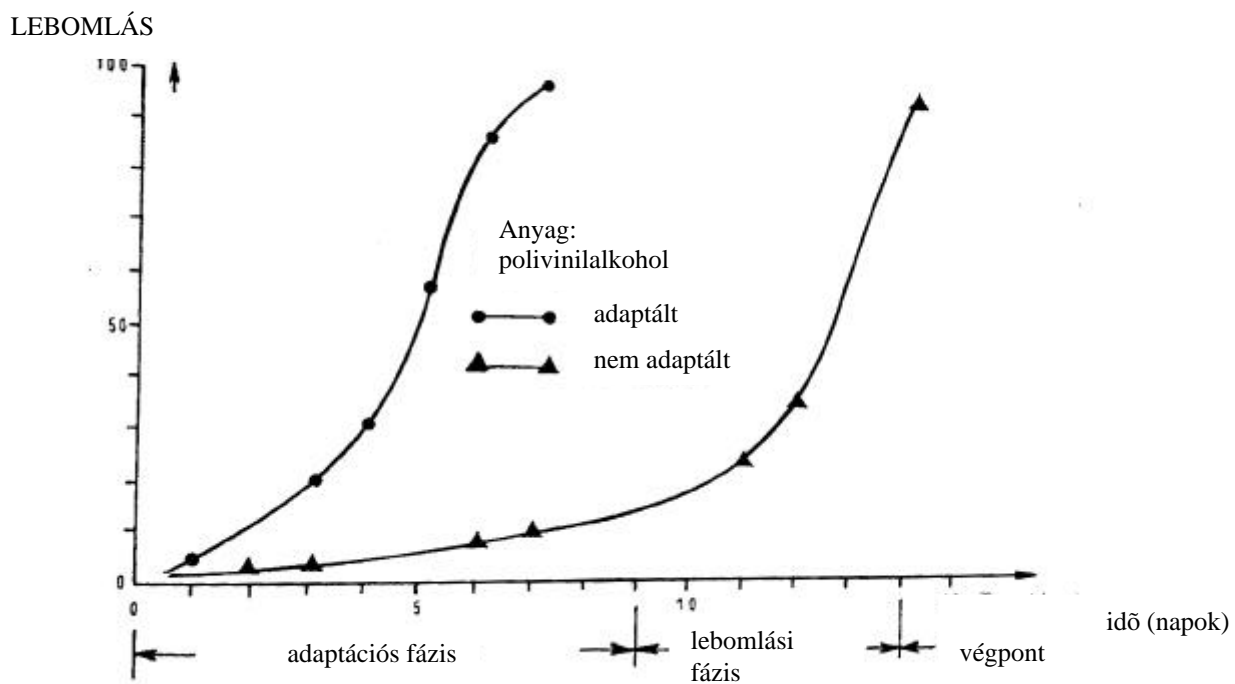
1. ábra

Példa biológiai lebomlási görbékre



2. ábra

Példák iszap-adaptációra



C.10 BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

ELEVENISZAP-SZIMULÁCIÓS VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

1.1.1. Általános megjegyzések

A módszert csak azokra az anyagokra lehet – a vizsgálatban alkalmazott koncentrációban – alkalmazni, amelyek:

- a vizsgálati körülmények között vízben olyan mértékben oldódnak, hogy a vizsgálati oldatok elkészíthetők;
- a vizsgálati körülmények között gőznyomásuk elhanyagolható;
- a baktériumokra nézve nem gátló tulajdonságúak.

A vizsgálati anyag legfontosabb komponenseinek arányaira vonatkozó információk hasznosak a kapott eredmények értékelésénél, különösen azokban az esetekben, ahol az eredmények kis vagy elhanyagolható mértékű biológiai lebonthatóságot mutatnak.

A vizsgálati anyag mikroorganizmusokon kifejtett toxicitására vonatkozó információkra szükség van a megfelelő vizsgálati koncentráció megválasztásához, illetve az eredmények magyarázatához, amennyiben a kapott eredmények kis mértékű biológiai lebonthatóságot mutatnak.

1.1.2. A teljes biológiai lebonthatóság meghatározása (DOC/KOI-analízis)

A módszer célja a teljes biológiai lebonthatóság meghatározása az anyag és bármely metabolitja csökkenésének mérésével, eleveniszapos szennyvíztisztítási modellben, 12 mg/liter DOC-értéknél (illetve hozzávetőleg 40 mg/liter KOI-értéknél) nagyobb koncentrációban. 20 mg/litert DOC-értéket tekintenek optimálisnak (DOC – oldott szerves szén; KOI – kémiai oxigénigény).

A vizsgálati anyag szerves szén tartalmát (vagy kémiai oxigénigényét) meg kell határozni.

1.1.3. A elsődleges biológiai lebonthatóság meghatározása (specifikus analízis)

A módszer célja a primer biológiai lebonthatóság meghatározása eleveniszapos szennyvíztisztítási modellben, hozzávetőleg 20 mg/liter koncentrációban, speciális analitikai módszer alkalmazásával. (Amennyiben az analitikai módszer követelményei, illetve az anyag toxicitása ezt megengedi, nagyobb illetőleg kisebb koncentrációt is lehet alkalmazni.) Ez lehetővé teszi az anyag primer biológiai lebonthatóságának (az elsődleges kémiai szerkezet megváltozása) értékelését.

A módszernek *nem* célja a vizsgálati anyag mineralizációjának meghatározása.

A vizsgálati anyag meghatározásához rendelkezni kell a megfelelő analitikai módszerrel.

1.2. Definíciók és mértékegységek

1.2.1. DOC/KOI-analízis

Az anyag lebomlásának mértékét a következő képlettel kapjuk meg:

$$DR [\%] = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100 \quad [1(a)]$$

ahol:

- DR – a tesztanyag lebomlásának mértéke a DOC (vagy a KOI) százalékában, adott átlagos tartózkodási időn belül;
- T – a vizsgálati anyag koncentrációja a befolyóban, DOC mg/literben (vagy KOI mg/literben) kifejezve;
- E – DOC-koncentráció (vagy KOI-koncentráció) a vizsgálati edény elfolyójában, mg DOC/literben (vagy mg KOI/literben) kifejezve;
- E₀ – DOC-koncentráció (vagy KOI-koncentráció) a vakpróba elfolyójában mg DOC/literben (vagy mg KOI/literben) kifejezve.

A vizsgálati anyag lebomlását átlagos tartózkodási időn belül a DOC (vagy a KOI) fogyásának százalékában adjuk meg.

1.2.2. Specifikus analízis

A vizsgálati anyag adott tartózkodási időn belüli százalékos fogyását a vizes fázisból (R_w) a következő képlettel számíthatjuk ki:

$$R_w [\%] = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100 \quad [1(b)]$$

ahol:

C_1 – az anyag koncentrációja a vizsgálati egység befolyójában (mg anyag/literben a specifikus analízissel meghatározva);

C_0 – az anyag koncentrációja a vizsgálati egység elfolyójában (mg anyag/literben a specifikus analízissel meghatározva).

1.3. Referenciaanyagok

Bizonyos esetekben – amikor új anyagot vizsgálunk – célszerű lehet referenciaanyagok alkalmazása; azonban konkrét anyagot jelenleg még nem javasolnak.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A teljes biológiai lebonthatóság meghatározásához két eleveniszapos kísérleti egységet (OECD ellenőrző vizsgálatban használt berendezést vagy porózus edényt) kell párhuzamosan alkalmazni. A vizsgálati anyagot az egyik egység befolyójához (szintetikus vagy kommunális szennyvíz) kell adni; a másik egység csak a szennyvizet kapja. A primer biológiai lebonthatóság meghatározásához csak egy egységet kell alkalmazni.

Az elfolyóban vagy DOC- (vagy KOI-) koncentrációt mérünk, illetve a vizsgálati anyag koncentrációját specifikus analízissel.

A vizsgálati anyagból származó DOC-ot nem szükséges külön megmérni.

Amennyiben a DOC-koncentrációt (vagy KOI-koncentrációt) mérjük, a vizsgálati elfolyó és a kontroll elfolyó mért átlagos koncentrációi között – feltételezés szerint – a le nem bomlott vizsgálati anyag miatt áll fenn különbség.

Amennyiben specifikus analízist végzünk, a kiindulási molekula koncentrációjának változását mérjük (primer biológiai lebomlás).

Az egységeket átváltási eljárással össze is lehet kapcsolni.

1.5. Minőségi kritériumok

Az anyag kezdeti koncentrációja a végzett analízis típusától és annak korlátaitól függ.

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Előkészítés

1.6.1.1. Eszközök

Azonos típusú berendezésből kettőre van szükség, kivéve, amikor specifikus analízist végzünk. A vizsgálatához kétfajta készüléket lehet használni:

Az OECD ellenőrző vizsgálatban használt berendezés

A berendezés (l. Függelék) a mesterséges szennyvizet tároló edényből (A) szivattyúból (B), levegőztető edényből (C), üleptető edényből (D), az eleveniszap recirkuláltatására szolgáló mammutszivattyúból (E) és a kezelt elfolyó összegyűjtésére szolgáló edényből (F) áll.

Az (A) és az (F) edények lehetőleg üveg vagy megfelelő műanyag edények, melyek alkalmasak legalább 24 liter folyadék tárolására. A (B) szivattyúnak állandó áramlást kell biztosítani a levegőztető edény felé; bármilyen rendszer alkalmazható, feltéve, hogy biztosítja a megfelelő áramlást és koncentrációt. Működtetéskor az üleptető edényt (D) olyan magasan kell elhelyezni, hogy a levegőztető edényben három liter kevert folyadék legyen. A légbefúvó csontot (G) az (C)

edény alsó, kúpos részébe helyezzük. A levegőztető berendezésen keresztüláramló levegő mennyiségét áramlásmérő segítségével ellenőrizni kell.

A mammutszivattyút (E) úgy kell beállítani, hogy az eleveniszapot az ülepítő edényből folyamatosan és szabályosan recirkuláltassa a levegőztető edény (C) felé.

A porózus edény

Az edény porózus polietilén lapokból (2 mm vastagság, a maximális pórusméret 95 µm) készül, amelyet 14 cm belső átmérőjű és 45° kúpos alappal rendelkező hengerbe kell helyezni (2. Függelék, 1. ábra és 2. ábra). A porózus edény megfelelő műanyagból készült, 15 cm belső átmérőjű tömör edénybe helyezzük, amelynek hengeres részében 17,2 cm magasságnál kimenete van. Az edénybe 3 liter folyadék fér. Megfelelő műanyagból készült merev támasztógyűrű fogja körbe a belső edény felső részét, így a belső és a külső edény között 0,5 cm tér van.

A porózus edényt vízfürdőbe is helyezhetjük. A belső edény aljába porlasztott levegőt vezetünk.

Az (A) és az (F) edények lehetőleg üveg vagy megfelelő műanyag edények, melyek alkalmasak legalább 24 liter folyadék tárolására. A (B) szivattyúnak állandó áramlást kell biztosítani a levegőztető edény felé; bármilyen rendszer alkalmazható, feltéve, hogy biztosítja a megfelelő áramlást és koncentrációt.

Tartalék porózus edényekre is szükség van, hogy a használat közben eltömődött edényeket kicserélhessük. Az eltömődött edényeket hipoklorit-oldatban 24 órán át áztatjuk, majd csapvízben alaposan kiöblítjük.

1.6.1.2. Szűrés

A szűréshez 0,45 µm pórusméretű membránszűrőket használunk. A membránszűrők akkor megfelelőek, ha nem szabadul fel belőlük szén, illetve nem adszorbeálják az anyagot.

1.6.1.3. Szennyvíz

Mind mesterséges, mind kommunális szennyvizet alkalmazhatunk.

Példa a mesterséges szennyvízre:

Oldjuk fel 1 liter csapvízben a következő mennyiségeket:

pepton	160 mg;
húsextraktum	110 mg;
karbamid	30 mg;
NaCl	7 mg;
CaCl ₂ · H ₂ O	24 mg;
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg;
K ₂ HPO ₄	28 mg.

Példa kommunális szennyvízre:

A kommunális szennyvizet minden nap frissen vesszük, elsősorban kommunális szennyvizet kezelő szennyvíztelep elsődleges ülepítő tartályának túlfolyójából.

1.6.1.4. A vizsgálati anyagból készült törzsoldat

A vizsgálati anyagból például 1%-os töménységű oldatot juttatunk a vizsgálati edénybe. A vizsgálati anyag koncentrációját határozzuk meg, hogy – a szennyvízhez vagy a második szivattyún keresztül közvetlenül a levegőztető edénybe – adagolt mennyiség az előírt tesztkoncentrációnak megfelelő legyen.

1.6.1.5. Inokulum

Megjegyzés: Amennyiben kommunális szennyvizet alkalmazunk, ne alacsony baktériumszámú oltóanyagot, hanem eleveniszapot használjunk.

Többféle inokulumot is használhatunk.

Az alábbi három típus példa, bármelyik választható:

a) Inokulum másodlagos elfolyóból

Az inokulumot elsősorban kommunális szennyvizet kezelő szennyvíztelep jó minőségű másodlagos elfolyójából kaphatjuk. A mintavétel és a felhasználás közötti időben az elfolyót aerob körülmények között kell tartani. Az inokulum elkészítéséhez a mintát szűrőpapíron leszűrjük, az első 200 ml szűrletet elöntjük. Felhasználásig a szűrletet aerob körülmények között tartjuk. Az elkészített inokulumot a mintavétel napján fel kell használni. Az oltáshoz legalább 3 ml inokulum szükséges.

b) Többkomponensű inokulum (többféle oltóanyag keverésével készül)

Inokulum másodlagos elfolyóból

Lásd a fenti leírást.

Inokulum talajból

100 g nem sterilizált, kerti termőtalajt 1000 ml klórmentes ivóvízben szuszpendálunk. (Túl nagy mennyiségű agyagot, homokot vagy humuszt tartalmazó talajok nem megfelelőek.). Kevertetés után 30 percig a szuszpenziót ülepedni hagyjuk. A felülúszót szűrőpapíron leszűrjük, az első 200 ml szűrletet elöntjük. A szűrletet a felhasználásig levegőztetjük. Az inokulumot a mintavétel napján fel kell használni.

Inokulum felszíni vízből

Inokulumot mezoszaprób felszíni vízből is lehet készíteni. A mintát szűrőpapíron leszűrjük, az első 200 ml szűrletet elöntjük. A szűrletet a felhasználásig aerob körülmények között tartjuk. Az inokulumot a mintavétel napján fel kell használni.

A háromféle inokulum azonos mennyiségeit egyesítjük, alaposan összekeverjük, és a végső inokulumot ebből a keverékből vesszük. Legalább 3 ml inokulumot használunk az oltáshoz.

c) Inokulum eleveniszapból

Bizonyos mennyiségű – legfeljebb 3 liter eleveniszapot (a szuszpendált lebegőanyag-tartalom max. 2,5 g/liter) veszünk elsősorban kommunális szennyvizet kezelő szennyvíztelep levegőztető medencéjéből, és ezt inokulumként használjuk.

1.6.2. A vizsgálati eljárás

A vizsgálatot szobahőmérsékleten (18–25 °C) végezzük.

Ha szükséges, alacsonyabb – de 10 °C-nál nem alacsonyabb – hőmérséklet is lehetséges. Amennyiben az anyag lebomlik ilyen hőmérsékleten, általában további vizsgálatra nincs szükség. Amennyiben azonban az anyag nem bomlik le, a vizsgálatot 18–25 °C hőmérsékleten is el kell végezni.

1.6.2.1. A beüzemelési és az iszapképződési periódus (az iszapképződés és a berendezés stabilizálódása, egyensúlyi állapot beállása)

Az iszapképződési periódus az az időszak, amely alatt az eleveniszap szuszpendált szilárdanyaga, valamint az egység teljesítménye az üzemelési körülményeknek megfelelő, egyensúlyi állapotra áll be.

A beüzemelési periódus az az időszak, amely alatt a vizsgálati anyag első hozzáadása után a lebomlás mértéke egy viszonylag állandó értékre áll be. Ez az időszak nem lehet hat hétnél hosszabb.

Az értékelési periódus a vizsgálati anyag lebomlási platójának (viszonylag állandó és általában nagy érték) elérésétől számított három hétig tart. Az olyan anyagok esetében, amelyek az első hat hétben csak kis mértékben bomlanak le, vagy egyáltalán nem bomlanak le, az értékelési periódus a következő három hét.

Első lépésként töltjük fel az edényeket a befolyóba kevert inokulummal.

Bekapcsoljuk a levegőztetőt (amennyiben az OECD ellenőrző vizsgálatot hajtjuk végre, az (E) mammutszivattyút) és az adagoló rendszert (B).

A tesztanyagot nem tartalmazó befolyót 1 liter/óra vagy 0,5 liter/óra áramlási sebességgel engedjük át a levegőztető edényen (C); ez átlagosan 3, illetve 6 óras tartózkodási időt ad.

A levegőztetés sebességét úgy kell szabályozni, hogy a (C) edény tartalmát állandóan szuszpenzióban tartsa, és az oldottoxigén-tartalom legalább 2 mg/liter legyen.

A habzást megfelelő módon meg kell akadályozni. Az eleveniszapot károsító habzásgátlót nem szabad használni.

A levegőztető edény (C) felső része körül (és amennyiben az OECD ellenőrző vizsgálatot hajtjuk végre, a (D) ülepitő edény alján és a keringető körben) felgyülemelő iszapot kefével vagy más megfelelő eszközzel naponta legalább egyszer vissza kell vinni a kevert folyadékba.

Amennyiben az iszap nem ülepszik le, a sűrűsége megnövelhető 5 százalékos vas(II)-klorid-oldat 2 ml-es adagban történő hozzáadásával. Az eljárást szükség szerint megismételhetjük.

Az elfolyót 20 vagy 24 órán keresztül az (E) vagy az (F) edényben gyűjtjük; a mintát alapos kevertetés után vesszük. Az (E), illetve az (F) edényt alaposan meg kell tisztítani.

A folyamat hatékonyságának megfigyelése és ellenőrzése céljából az összegyűlt elfolyó szűrletének kémiai oxigénigényét (KOI) vagy az oldott szerves széntartalmát (DOC) hetente legalább kétszer mérni kell (0,45 µm-es membránszűrő alkalmazásával; a szűrlet első kb. 20 ml-et elöntjük).

A kémiai oxigénigény (KOI) vagy az oldott szerves szén tartalom csökkenés (DOC) egyenletessé válik, ha nagyjából hasonló napi lebomlást mérünk.

A levegőztető tartályban az eleveniszap szárazanyagtartalmát hetente kétszer meg kell határozni (mg/literben). Az egységet a következő két módon lehet üzemeltetni: ha az eleveniszap szárazanyagtartalma nagyobb, mint 2,5 g/liter, akkor a felesleges eleveniszapot eldobjuk, vagy naponta 500 ml kevert folyadékot valamennyi edényből elhasználunk, hogy az iszap átlagos tartózkodási ideje 6 nap legyen.

Amennyiben a két egység mért és becsült paraméterei, a folyamat hatékonysága (a KOI vagy a DOC csökkenése), az iszapkoncentráció, az iszap ülepedési képessége, az elfolyó zavarossága stb.) állandó értéken maradnak, a vizsgálati anyagot beadagolhatjuk az egyik edény befolyójába, az 1.6.2.2. pont szerint.

Másik megoldás szerint a vizsgálati anyagot az iszapnövekedési periódus kezdetén adjuk hozzá (1.6.2.1. pont), különösen, ha eleveniszapot használunk inokulumként.

1.6.2.2. A vizsgálat menete

Az beüzemelési időszaknak megfelelő körülményeket kell fenntartani, és a vizsgálati anyag (hozzávetőleg 1%-os) törzsoldatának elegendő mennyiségét kell az befolyóhoz hozzáadni, hogy a vizsgálati anyag a szennyvízben a kívánt koncentrációban legyen jelen (körülbelül 10–20 mg DOC/liter vagy 40 mg KOI/liter). Ezt a törzsoldatnak a szennyvízbe naponta történő bekeverésével, vagy külön adagolórendszerrel lehet megvalósítani. A megfelelő koncentrációt fokozatosan alakítsuk ki. Amennyiben a vizsgálati anyag nem fejt ki toxikus hatást az eleveniszapra, akkor nagyobb koncentrációkat is lehet vizsgálni.

A vakpróba-egységet csak az befolyóval tápláljuk, a vizsgálati anyag hozzáadása nélkül. Az elfolyóból analízisre adott mennyiségeket veszünk, membránszűrőn (0,45 µm) leszűrjük, melyből az első kb. 20 ml-t elöntjük.

A leszűrűt mintákat még a mintavétel napján analizáljuk, vagy pedig a mintákat megfelelő módszerrel – például minden 10 ml szűrletre számítva 0,05 ml 1%-os HgCl₂-oldat hozzáadásával, 24 órára 2–4 °C hőmérsékleten, hosszabb időre –18 °C alatti hőmérsékleten tárolva – tartósítani kell.

A vizsgálati anyag hozzáadásától számított beüzemelési idő nem haladhatja meg a hat hetet, az értékelési időszak pedig nem lehet rövidebb, mint három hét, vagyis a végső eredmények kiszámításához körülbelül 14–20 meghatározást kell végezni.

Kapcsolt üzemmód

Az egységek összekapcsolását a két edény levegőztető edényeiben lévő 1,5 l kevert folyadék (beleértve a zagyot is) naponta egyszer történő kicserélése jelenti. Amennyiben a vizsgálati anyag erősen abszorbeálódik, csak 1,5 liter felülúszót szívjunk le az ülepítőedényből, és ezt a másik egység eleveniszapot tartalmazó edényébe töltjük.

1.6.2.3. Analízis

Kétféle vizsgálatot végezhetünk, az anyag viselkedésének megállapítására:

DOC- és KOI-analízis:

A DOC-koncentrációkat, illetve a KOI-t két párhuzamosban kell meghatározni, a (2) irodalmi hivatkozás szerint.

Specifikus analízis

A vizsgálati anyag koncentrációit megfelelő analitikai módszerrel kell meghatározni. Amennyiben lehetséges, az iszapon adszorbeálódott anyag meghatározását is el kell végezni.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

2.1. Kapcsolt üzemmód

Amennyiben a kapcsolt üzemmódot alkalmazzuk, a tesztanyag csökkenésének mértékét (DR) naponta ki kell számítani, az 1.2.1. pont szerint.

Az csökkenés (DR) napi értékét az átoltást kísérő anyagátvitel miatt háromórás átlagos tartózkodási idő esetén a [2] egyenlettel, hatórás átlagos tartózkodási idő esetén pedig a [3] egyenlettel kell korrigálni – ekkor a DR_c-értéket kapjuk.

$$DR_c = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DR_c = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

A DR_c-értékek sorozatának átlagát, valamint a standard eltérést a [4] egyenlet szerint kell kiszámítani:

$$S_{DR_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR_c} - DR_{c_i})^2}{n-1}} \quad [4]$$

ahol:

$$\begin{aligned} S_{DR_c} & \text{ – a DR}_c\text{-értékek sorozatának standard eltérése;} \\ \overline{DR_c} & \text{ – a DR}_c\text{-értékek átlaga;} \\ n & \text{ – a meghatározások száma.} \end{aligned}$$

Megfelelő statisztikai eljárás – például Nalimov (6) – szerint a DR_c-sorozat szélső értékeit elhagyjuk, majd 95%-os valószínűségi érték mellett, a szélső értékeket már nem tartalmazó DR_c-sorozat átlagát és standard deviációját újra kiszámítjuk.

A végső eredményt ezután az [5] egyenlet segítségével számítjuk ki:

$$DR_c = \overline{DR_c} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} S_{DR_c} \quad [5]$$

ahol:

$t_{n-1; \alpha}$ – n számú, táblázat szerinti E és E_o értékek 95%-os statisztikai megbízhatóság (P = 1-α) mellett.

Az eredmények ismertetésekor meg kell adni az átlagot, 95% valószínűségi szintnél lévő toleranciaszinttel, a vonatkozó standard deviációt, valamint a szélső értékeket nem tartalmazó DR_c-sorozat adatainak számát, illetve a szélső értékek számát, például:

$$\begin{aligned} DR_c & = 98,6 \pm 2,3\% \text{ DOC-csökkenés} \\ s & = 4,65\% \text{ DOC-csökkenés} \\ n & = 18 \\ x & = \text{a szélső értékek száma} \end{aligned}$$

2.2. Nem kapcsolt üzemmód

Az egységek teljesítményét a következők szerint lehet ellenőrizni:

$$\text{KOI / DOC\%-os csökkenés} = \frac{\text{szennyvíz KOI / DOC} - \text{effluens KOI / DOC}}{\text{szennyvíz KOI / DOC}} \times 100$$

A napi csökkenéseket grafikusán ábrázolhatjuk, a trendek – például akklimatizálódás – megállapítására.

2.2.1. A KOI/DOC-meghatározás alkalmazása

Az csökkenés mértékének (DR) napi értékét az 1.2.1 pontban foglaltak szerint kell kiszámítani.

A DR-értékek sorozatának átlagát ki kell számítani; ezenkívül a standard eltérést is kiszámítjuk, a következő képlet szerint:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n-1}} \quad [6]$$

ahol:

s_{DR} – a DR_i -értékek sorozatának standard deviációja;

\overline{DR} – a DR_i -értékek átlaga;

n – a meghatározások száma.

A DR-sorozat szélső értékeit elhagyjuk, a megfelelő statisztikai eljárás – például Nalimov (6) – szerint, majd 95 százalékos valószínűségi szintnél, a szélső értékeket már nem tartalmazó DR-sorozat átlagát és standard deviációját újra kiszámítjuk.

A végső eredményt ezután az [7] egyenlet segítségével számítjuk ki:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1; \alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR} \quad [7]$$

ahol:

$t_{n-1; \alpha}$ – n számú E és E_0 értékpár táblázat szerinti értéke és a P statisztikai megbízhatóság ($P = 1 - \alpha$), míg P95%-nál van.

Az eredmények ismertetésekor meg kell adni az átlagot, 95% valószínűségi szintnél lévő toleranciaszinttel, a vonatkozó standard deviációt, valamint a szélső értékeket nem tartalmazó DR-sorozat adatainak számát, illetve a szélső értékek számát, például:

DR = 98,6 ± 2,3% DOC-csökkenés

S = 4,65% DOC-csökkenés

n = 18

x = a szélső értékek száma

2.2.2. A specifikus analízis alkalmazása

A vizsgálati anyagnak a vizes fázisból (R_w) történő százalékos elfogyását az 1.2.2. pont szerint kell számítani.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

3.1. A vizsgálati jegyzőkönyv

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

- a 3. függelékben található űrlapot, a vizsgálat körülményeinek megadásával;
- milyen berendezést választottunk: OECD ellenőrző vizsgálat szerinti berendezést vagy porózus edényt;
- milyen üzemmódot választottunk: kapcsolt vagy nem kapcsolt;
- a szennyvíz típusa: mesterséges vagy kommunális, amennyiben kommunális szennyvizet választottunk, a mintavétel helye és ideje;
- az inokulum típusa, a mintavétel helyének és idejének megadásával;
- amennyiben speciális analízist végeztünk, annak ismertetése, az analitikai módszer leírásával;
- a KOI illetve a DOC csökkenésének az idő függvényében való ábrázolását (az beüzemelési és az értékelési periódusban is),
 - a vizsgálati anyag mennyisége a törzsoldatban, KOI- vagy DOC-értékben kifejezve;
 - amennyiben specifikus analízist végeztünk, a vizsgálati anyagnak a vizes fázisból történő százalékos csökkenése az idő függvényében ábrázolva (beüzemelési és értékelési periódus);
 - a DOC vagy a KOI átlagos csökkenését és ennek standard deviációját az értékelési periódus eredményeiből számítjuk, azaz akkor, amikor a vizsgálati anyag mennyiségének csökkenése állandó, vagy az állandó körülmények mellett történő üzemelés idején;
 - az eleveniszap koncentrációja az idő függvényében ábrázolva;
 - az eleveniszapra vonatkozó minden megjegyzés (az iszapfelesleg eltávolítása, duzzadás megjelenése, FeCl₃-alkalmazása stb.);
 - a vizsgálati anyag koncentrációja;
 - az iszap analízisének eredményei;
 - minden információ, illetve kísérleti eredmény, amely a vizsgálati anyagra illetve a referenciaanyagra (amennyiben alkalmaztunk) vonatkozik;
 - az eljárás megváltoztatásának tudományos indokai.

3.2. Az eredmények magyarázata

A vizsgálati anyagnak a vizes fázisból történő csupán kis mértékű elfogyása a tesztanyag mikroorganizmusokra kifejtett gátló hatásának következtében léphet fel. Ezt mutathatja a bomlás és az iszapveszteség, a felülúszó zavarossága, valamint a kísérlet alatt a bontás (KOI- vagy DOC-csökkenés) hatékonyságának csökkenése.

Bizonyos esetekben a fizikai-kémiai adszorpció is befolyásolhatja az eredményeket. A molekulára gyakorolt biológiai hatás és a fizikai-kémiai adszorpció közötti különbséget a megfelelő deszorpció után az iszap analízisével mutathatjuk ki.

Amennyiben a biológiai lebomlás (vagy a részleges biológiai lebomlás) és az adszorpció között különbséget kell tenni, akkor további vizsgálatokat kell végezni.

Ezt több módon lehet megtenni, azonban a legmeggyőzőbb a felülúszónak mint inokulumnak alkalmazása alapvizsgálatban.

Amennyiben a DOC vagy a KOI csökkenése nagy, akkor ennek oka a biológiai lebomlás, míg kis csökkenés esetén a biológiai lebomlást az eliminációtól nem lehet megkülönböztetni. Például amennyiben egy oldható vegyület nagy (98%) adszorpcióval állandót mutat, az iszapveszteség 10% naponta, akkor akár 40%-os elimináció lehetséges; 30%-os iszapveszteségnél az adszorpció következtében fellépő elimináció és a felesleges iszappal történő fogyás mértéke 65%-os is lehet.

Amennyiben specifikus analízist végzünk, figyelmet kell fordítani az anyag szerkezete és a specifikus analízis kapcsolatára. Ebben az esetben a megfigyelt jelenséget nem lehet az anyag mineralizációjával magyarázni.

4. IRODALOM

[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, *Official Journal of the European Communities*, No L 251, 19.9.1984.

[3] Painter, H. A., King, E. F.: WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR 70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom

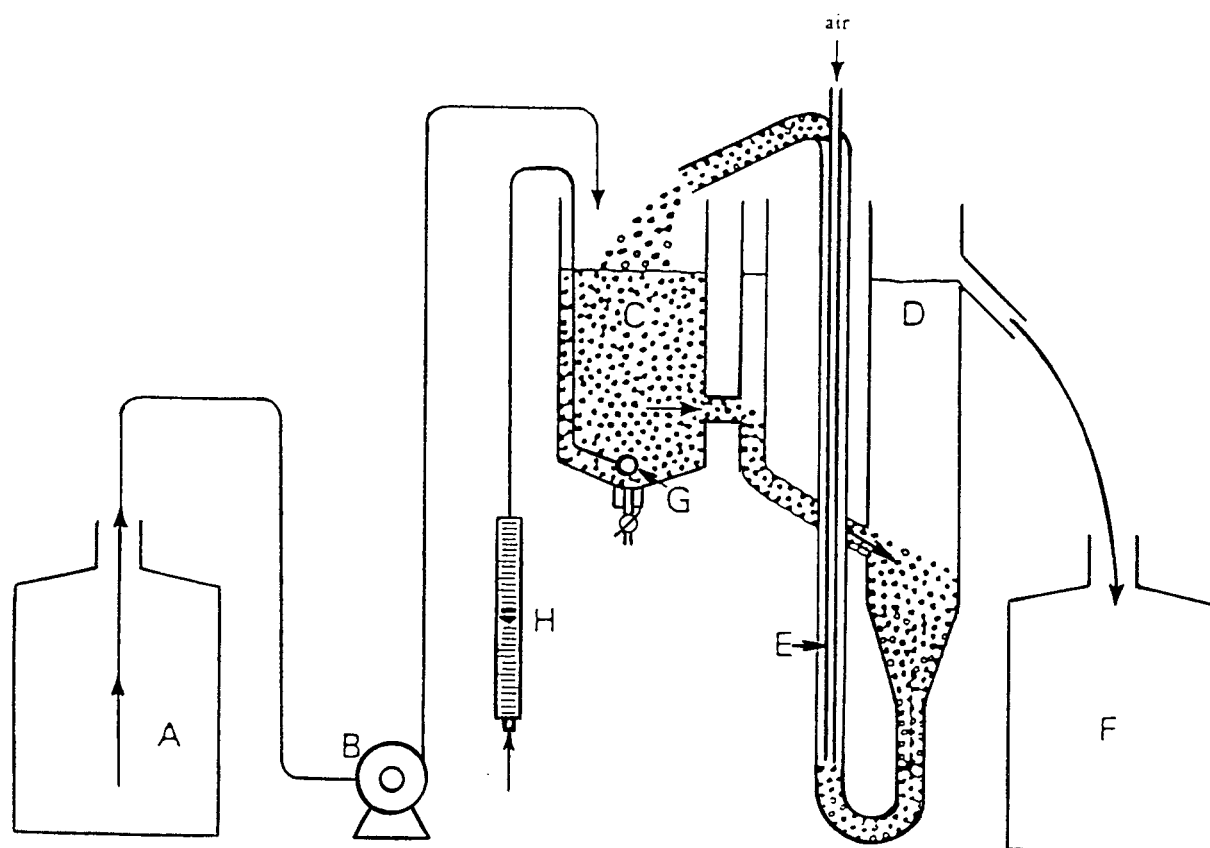
[4] Wierich, P., Gerike P.: The fate of soluble recalcitrant and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5., No 2., June 1981, pp. 161 to 171.

[5] Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 109.22.4. 1982, amending Council Directives 73/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, *Official Journal of the European Communities*, No L 347.17.12. 1973

[6] Streuli, H.: Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreissertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden (1980), *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie* 303, pp. 406–408.

1. Fűgglék

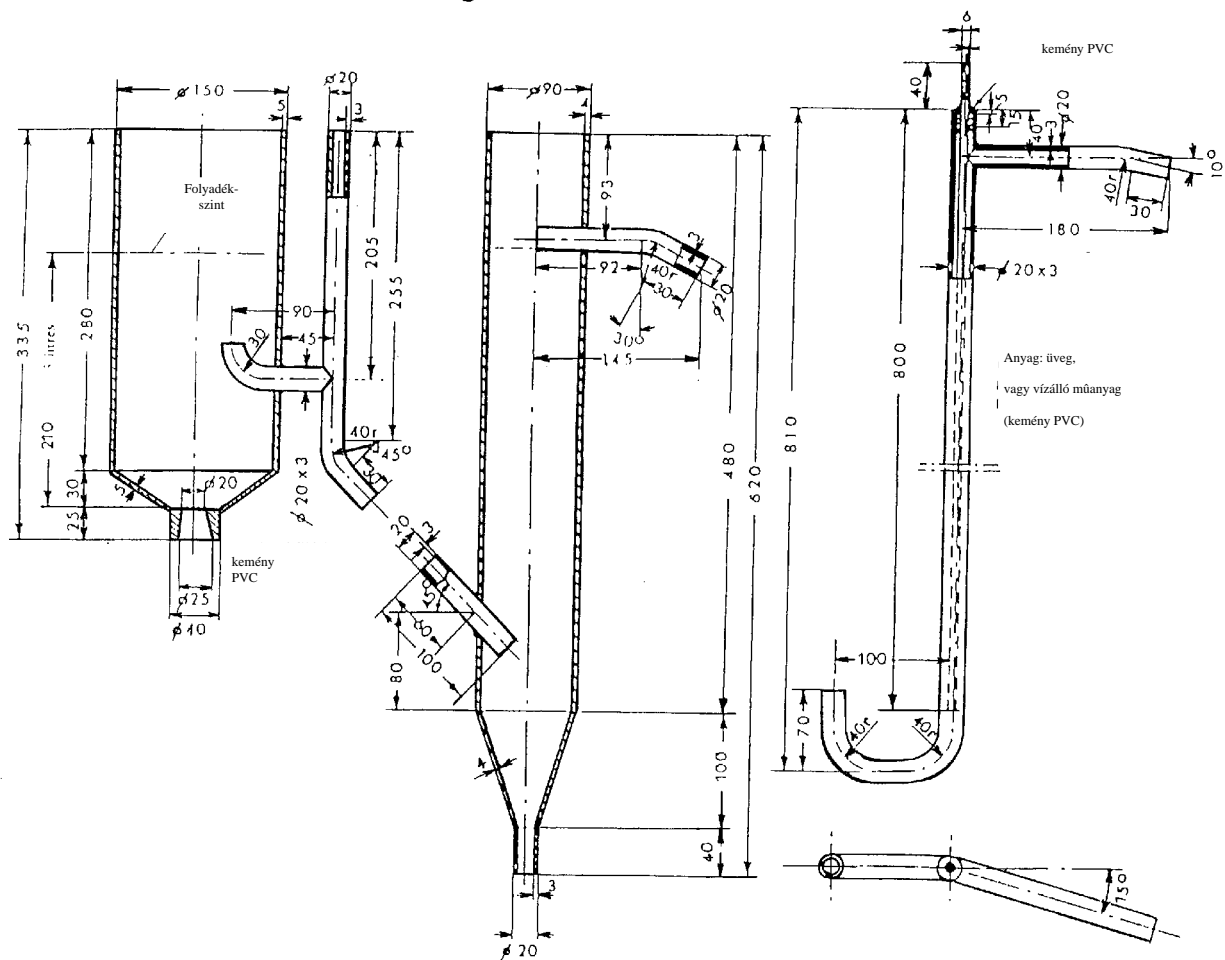
1. ábra



Jelölések:

A	tárolóedény
B	szivattyú
C	levegőztető edény (3 liter térfogatú)
D	ülepítő edény
E	mammutszivattyú
F	gyűjtőedény
G	légbefúvó csomagtű
H	levegőáramlás-mérő

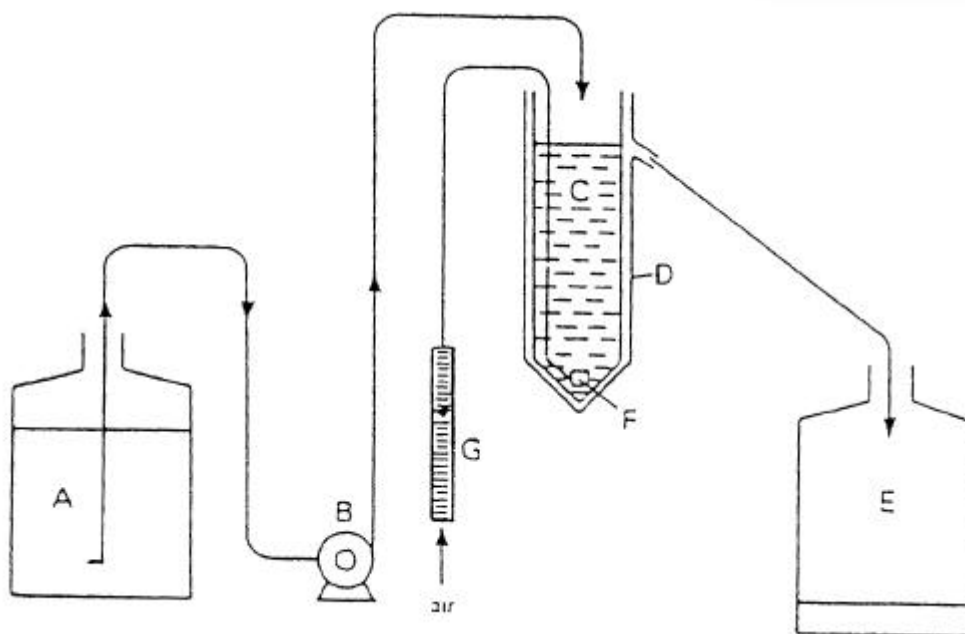
2.ábra



2. Függelék

1. ábra

A biológiai lebbonthatóság mérésére használt berendezés

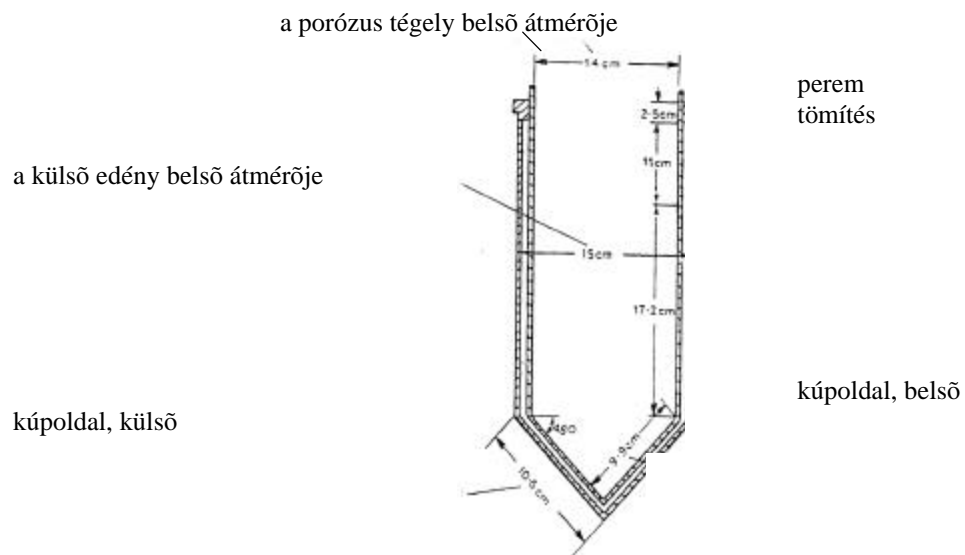


A: tárolóedény
B: szivattyú
C: porózus levegőztető edény

D: külső (nem porózus) edény
E: elfolyógyűjtő edény
F: porlasztó
G: levegőáramlás-mérő

2. ábra

A háromliteres porózus levegőztető edény részletes rajza



3. Függelék

*Az eleveniszap-szimulációs vizsgálat vizsgálati körülményei
A megfelelő négyzeteket ikszeljük be!*

Berendezés

OECD ellenőrző vizsgálat
Porózus edény

Üzem mód

Egyedi egység
Kapcsolt üzem mód
Nem kapcsolt üzem mód

Transzinokuláció

Nincs
Eleveniszap
Felülűszó

Átlagos tartózkodási idő

Három óra
Hat óra

Tápanyagforrás

Kommunális szennyvíz
Mesterséges szennyvíz

Inokulum

Másodlagos elfolyó
Kevert inokulum
Eleveniszap

A vizsgálati anyag hozzáadása

A vizsgálat kezdetekor
Lépésenként növekvő mennyiségben
Iszapképződést követően

Analízis

Specifikus
KOI
DOC

C.11 BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

ELEVENISZAP LÉGZÉSGÁTLÁSI TESZT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A módszerrel a különböző koncentrációkban alkalmazott tesztanyag mikroorganizmusokra kifejtett hatása vizsgálható oly módon, hogy meghatározott körülmények között a mikroorganizmusok légzési sebességét mérjük.

A vizsgálati eljárás egy olyan gyorseszteszt, melynek segítségével meghatározhatók azok az anyagok, melyek az aerob mikroorganizmusokkal szennyvízkezelést végző üzemek működését kedvezőtlenül befolyásolhatják, illetve segítségével meghatározhatók a vizsgálati anyag nem gátló koncentrációi a biológiai lebonthatósági vizsgálatokhoz.

A minősítő vizsgálatot elővizsgálat előzheti meg, amely információt szolgáltat a minősítő vizsgálatban alkalmazandó tartományról.

A teszt során két vizsgálati anyag nélküli kontrollmérést is be kell iktatni, egyet a vizsgálat kezdetekor, egyet pedig a végén. Referenciaanyag használatával minden eleveniszap-tételt ellenőrizni kell.

A módszert azokra az anyagokra lehet legjobban alkalmazni, amelyek vízben oldódnak, és kis illékonyságuk következtében feltehetően a vízben maradnak.

A vizsgálati közegben korlátozottan oldódó anyagok esetében előfordulhat, hogy nem lehet meghatározni az EC₅₀ értéket.

Az oxigénfelvételen alapuló eredmények helytelen következtetésekhez vezethetnek, amennyiben a vizsgálati anyag képes az oxidatív foszforiláció kiiktatására.

A vizsgálat végrehajtásához célszerű a következő információkkal rendelkezni:

- oldhatóság vízben;
- gőznyomás;
- szerkezeti képlet;
- a vizsgálati anyag tisztasága.

Figyelem!

Az eleveniszap patogén organizmusokat is tartalmazhat, ezért körültekintően kell kezelni.

1.2. Definíciók és mértékegységek

A légzési sebesség a szennyvízben lévő mikroorganizmusok oxigénfogyasztása, általában mg O₂/mg iszap/óra értékben kifejezve.

A vizsgálati anyag valamely koncentrációja vonatkozásában a gátló hatás kiszámításakor a légzési sebességet a két kontroll légzési sebesség átlagaként kell megadni:

$$\% - os \ gátlás = \frac{2 R_s}{R_{C1} + R_{C2}} \times 100$$

ahol:

- R_s = oxigénfogyasztás a vizsgálati anyag adott koncentrációjánál;
- R_{C1} = az oxigénfogyasztás sebessége, 1. kontroll;
- R_{C2} = az oxigénfogyasztás sebessége, 2. kontroll.

Ennél a módszernél az EC₅₀ a vizsgálati anyag azon koncentrációja, amelynél – adott körülmények között – a légzési sebesség a kontroll légzési sebességének 50 százaléka.

1.3. Referenciaanyagok

Referenciaanyagként célszerű 3,5-diklórfenolt – amely ismert légzésgátló anyag – alkalmazni, és az EC₅₀ értékét minden eleveniszap-tételre vonatkozóan meghatározni. Így értékelhetjük, hogy az eleveniszap érzékenysége megfelelő-e.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A meghatározott mennyiségű mesterséges szennyvízzel táplált eleveniszap légzési sebességét a táplálás után 30 és/vagy 3 óra elteltével határozzuk meg. Ugyanennek az eleveniszapnak a vizsgálati anyag különböző koncentrációi jelenlétében (de minden más szempontból azonos körülmények között) is megmérjük a légzési sebességét. A vizsgálati anyag gátló hatását egy bizonyos koncentráció esetén a két kontroll átlagos légzési sebességének százalékában kell kifejezni. Az EC₅₀-értéket különböző koncentrációk esetében kapott eredményekből számítjuk ki.

1.5. Minőségi kritériumok

A vizsgálat eredményei csak akkor fogadhatók el, ha

- a két kontroll légzési sebessége egymástól maximum 15 százalékban tér el;
- a 3,5-diklórfenol EC₅₀-értéke (30 perc és/vagy három óra) az elfogadható 5–30 mg/liter tartományba esik.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Reagensek

1.6.1.1. A tesztoldatok készítése

A vizsgálati anyag oldatait a törzsoldatból a vizsgálat kezdetekor frissen kell készíteni. Ha az alábbi eljárást alkalmazzuk, 0,5 g/liter törzsoldat-koncentráció megfelelő.

1.6.1.2. A referenciaanyag oldatai

3,5-diklórfenol-oldat elkészítéséhez például 0,5 g 3,5-diklórfenolt 10 ml 1 mol/liter koncentrációjú NaOH-ban oldunk, ezt körülbelül 30 ml vízzel hígítjuk, kevertetés közben 0,5 mol/liter koncentrációjú H₂SO₄-et adunk hozzá a csapadékkiválás megindulásáig – hozzávetőleg 8 ml 0,5 mol/liter koncentrációjú H₂SO₄ szükséges –, végül a keveréket desztillált vízzel 1 literre egészítjük ki. Az oldat pH-ját 7–8-ra állítjuk be.

1.6.1.3. Mesterséges szennyvíz

Az mesterséges (szintetikus) szennyvíz előállításához a következő anyagokat 1 liter vízben oldjuk:

- 16 g pepton;
- 11 g húsextraktum;
- 3 g karbamid;
- 0,7 g NaCl;
- 0,4 g CaCl₂ × 2H₂O;
- 0,2 g MgSO₄ × 7H₂O;
- 2,8 g K₂HPO₄.

1. megjegyzés: Az így elkészített szintetikus szennyvíz koncentrációja 100-szorosa az OECD Technical Reportban előírt koncentrációnak („A szintetikus mosószerekben alkalmazott felületaktív anyagok biológiai lebonthatóságának meghatározásához javasolt módszer”, 1976. június 11.), és dikálium-hidrogén-foszfátot is tartalmaz.

2. megjegyzés: Amennyiben az elkészített oldatot nem használjuk fel azonnal, akkor azt sötétben, 0–4 °C-on tároljuk legfeljebb egy hétig, olyan körülmények között, amelyek nem változtatják meg az oldat összetételét. A oldatot tárolás előtt sterilizálhatjuk is, illetve a pepton és a húsextraktot csak röviddel a vizsgálat megkezdése előtt adjuk hozzá. Felhasználás előtt alaposan keverjük össze, a pH-t pedig állítsuk be.

1.6.2. Eszközök

A mérőberendezés összeállításának módja nincs pontosan előírva. Azonban a fejrésznél üres térköz legyen, valamint a szonda a mérőlombik nyakához szorosan illeszkedjen.

Általános laboratóriumi felszerelések, valamint az alábbiak szükségesek:

- a légzés mérésére alkalmas mérőberendezés;
- levegőztető berendezés;
- pH-mérő;
- oldotoxigén-mérő.

1.6.3. Az inokulum előkészítése

A vizsgálatban inokulumként olyan eleveniszapot kell használni, amely főként kommunális szennyvizet kezelő szennyvíztisztító telepről származik.

Amennyiben szükséges, a laboratóriumba történő visszatérés után a durva részecskéket rövid ideig – például 15 percig – tartó ülepítéssel különítsük el, a finomabb részecskéket tartalmazó réteget pedig felhasználás céljából dekantáljuk. Alternatív módszer az iszap néhány percig történő kevertetése.

Ezenkívül, ha gyanítjuk, hogy gátló hatású anyag van jelen, az iszapot csapvízzel vagy izotóniás oldattal mossuk ki. Centrifugálás után a felülúszót szívjuk le (az eljárást háromszor ismétljük meg).

Kisebb mennyiségű iszapot vegyünk ki, mérjük meg és szárítsuk ki. Az eredmény alapján kiszámíthatjuk azt a nedves iszapmennyiséget, amelyet fel kell vízben szuszpendálnunk ahhoz, hogy olyan eleveniszapot kapjunk, amely a 2–4 g/l szilárd anyag koncentrációval rendelkezik. Ez 0,8–1,6 g/l koncentrációt eredményez a vizsgálati közegben, amennyiben az alábbi eljárást betartjuk.

Amennyiben az iszapot az iszapvétele napján nem tudjuk felhasználni, akkor a fenti módon elkészített eleveniszapot minden literéhez 50 ml szintetikus szennyvizet adunk. Ezt egy éjszakán keresztül 20 ± 2 °C hőmérsékleten levegőztetjük a másnapi felhasználásig. Felhasználás előtt a pH-t ellenőrizzük, és szükség esetén a pH-t 6–8 értékre állítjuk. A szuszpendált szilárd anyagot az előzőek alapján határozzuk meg.

Amennyiben ugyanabból a tételből származó iszapot kívánunk a következő napokon felhasználni (legfeljebb négy napig), akkor az iszap minden literére vonatkozóan további 50 ml szintetikus szennyvizet kell a munkanap végén hozzáadni.

1.6.4. A vizsgálat kivitelezése

Időtartam/expozíciós idő: 30 perc és/vagy három óra, levegőztetés mellett;

Víz: ivóvíz (szükség esetén klórmentes);

Levegő: tiszta, olajmentes; a levegőáram mennyisége 0,5–1 liter/perc;

Mérőberendezés: lapos aljú lombik, például BOI-lombik;

Oxigénmérő műszer: regisztráló berendezéssel ellátott megfelelő oxigénelektroda;

Táplódat: szintetikus szennyvíz (lásd fent);

Vizsgálati anyag: a vizsgálati anyag oldatát a vizsgálat kezdetekor frissen kell készíteni;

Referenciaanyag: például 3,5-diklórfenol (legalább három különböző koncentrációban);

Kontroll: vizsgálati anyagot nem tartalmazó inokulált minta;

Hőmérséklet: 20 ± 2 °C.

Az alábbiakban kísérleti eljárást ismertetünk, mind a vizsgálati anyagra, mind a referenciaanyagra vonatkozóan, az expozíciós idő három óra.

Tesztedényként például egyliteres főzőpoharakat alkalmazunk.

Legalább öt, egymástól egy konstans tényezővel különböző – amely konstans célszerűen nem nagyobb 3,2-nél – koncentrációt kell alkalmazni.

A 0. időpontban 16 ml szintetikus szennyvizet vízzel 300 ml-re hígítunk, majd 200 ml inokulumot adunk, majd a teljes keveréket (500 ml) az első edénybe töltjük (első kontroll, C₁).

A vizsgálati edényt folyamatosan levegőztetni kell annak érdekében, hogy az oldott oxigén koncentrációja ne csökkenjen 2,5 mg/liter alá, valamint a lélegzési sebesség mérése előtt közvetlenül az oxigén koncentrációja hozzávetőleg 6,5 mg/liter legyen.

A „15 perc” időpontban (a 15 perc tetszőlegesen választható, azonban kényelmes időintervallumot jelent) a fentieket meg kell ismételni, azzal az eltéréssel, hogy a 16 ml szintetikus szennyvízhez a vizsgálati anyag törzsoldatából 100 ml-t adunk, majd 300 ml vizet, és az elegyet inokulummal 500 ml-re egészítjük ki. Ezt a keveréket a második edénybe töltjük, és az fentiek szerint levegőztetjük. A folyamatot a vizsgálati anyag különböző térfogatú oldataival 15 percenként megismételjük, és így egy olyan edénysorozatot kapunk, amely a vizsgálati anyag különböző koncentrációjú oldatait tartalmazza. Végül elkészítjük a második kontrollt (C₂) is.

Három óra elteltével a pH-t feljegyezzük, majd az első edényben lévő, erőteljesen kevertetett elegyet a mérőberendezésbe öntjük, és 10 percen keresztül mérjük a légzési sebességet.

A meghatározást 15 perces időközönként valamennyi edény tartalmával megismételjük, ilyen módon biztosítjuk, hogy az expozíciós idő minden edény esetében három óra legyen.

A referenciaanyagot minden inokulum-tétel esetében azonos módon kell vizsgálni.

Eltérő eljárás – azaz egynél több oxigén-mérőműszer – lesz szükséges, ha 30 perc expozíciós időt alkalmazunk.

Amennyiben a kémiai oxigénigényt is mérjük, további, vizsgálati anyagot, szintetikus szennyvizet, valamint vizet tartalmazó, azonban eleveniszapot nem tartalmazó edényeket kell előkészíteni. Az oxigénfogyasztást 30 perc és/vagy három óra (expozíciós idő) elteltével meg kell mérni és fel kell jegyezni.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A légzési sebességet hozzávetőleg 6,5 mg O₂/liter és 2,5 mg O₂/liter között, vagy – amennyiben a légzési sebesség kicsi – 10 perces időszak alatt felvett görbe alapján számoljuk. A légzési görbe azon szakaszának, amely alapján a légzési sebességet számítjuk, lineárisnak kell lennie.

Amennyiben a két kontroll légzési sebessége egymáshoz képest több, mint 15 százalékkal eltér, vagy az EC₅₀ (30 perces és/vagy három órás) értéke nincs a megfelelő tartományon belül (5–30 mg/liter 3,5-diklórfenol esetében), akkor a vizsgálat érvénytelen, és azt meg kell ismételni.

A százalékos gátlást valamennyi vizsgálati koncentrációra vonatkozóan kiszámítjuk (lásd az 1.2. pontot), a koncentráció függvényében féllogaritmusos (vagy log-probit) papíron ábrázoljuk, és az EC₅₀ értéket meghatározzuk.

Az EC₅₀ 95 százalékos megbízhatósági határát standard eljárás alkalmazásával állapítjuk meg.

3. VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

3.1. Az eredménylap

A vizsgálati jegyzőkönyv, amennyiben lehetséges, a következő információkat tartalmazza:

- vizsgálati anyag kémiai azonosítási adatai;
- a vizsgálati rendszer: az eleveniszap eredete, koncentrációja és vizsgálat előtti kezelése;
- vizsgálati körülmények:
- a reakcióelegy pH-ja a légzésmérés előtt;
- vizsgálati hőmérséklet;
- a vizsgálat időtartama;
- a referenciaanyag, és ennek mért EC₅₀ értéke;
- abiotikus oxigénfelvétel (amennyiben van);
- eredmények:
- az összes mért adat;
- gátlási görbe, és az EC₅₀ számítási módszere;
- EC₅₀ és – amennyiben lehetséges – a 95% megbízhatósági határ, az EC₂₀- és az EC₈₀-érték;
- az összes olyan megfigyelés illetve a vizsgálati módszertől való eltérés, amely befolyásolhatja az eredményeket.

3.2. Az eredmények értékelése

Az EC₅₀-érték csupán egy iránymutatást ad arra vonatkozóan, hogy a vizsgálati anyag eleveniszapos módszerrel kezelhető, illetve a szennyvíz-mikroorganizmusokra toxikus-e, mivel a környezetben lejátszódó komplex kölcsönhatásokat laboratóriumi vizsgálatban nem lehet pontosan modellezni. Ezenkívül azok a vizsgálati anyagok, amelyek az ammónia oxidációjára gátló hatást gyakorolhatnak, nem a tipikus gátlási görbéket adják. Ebből következően az ilyen görbéket megfelelő óvatossággal kell magyarázni.

4. IRODALOMEGYZÉK

[1] International Standard ISO 8192-1986.

[2] Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.

[3] Brown, D., Hitz, H.R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.

[4] ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries Recommended Method No. 103, also described by:

[5] Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.

[6] Schaefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.

[7] OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Decision of the Council, C (81) 30 final.

C.12 BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

MÓDOSÍTOTT SCAS-TEST

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A módszer célja a vízoldható, nem illékony szerves anyagok viszonylag hosszú idő alatt, nagy koncentrációjú mikroorganizmusok jelenlétében történő végső biológiai lebonthatóságának értékelése. A mikroorganizmusok életképességének fenntartása ez alatt az idő alatt ülepített szennyvíz naponta történő hozzáadásával történik. (Hétfégen a szennyvizet 4 °C hőmérsékleten kell tárolni. Másik módszerként OECD ellenőrző vizsgálat szerinti szintetikus szennyvizet is lehet használni.)

A szuszpendált szilárd anyagokon fizikai-kémiai adszorpció játszódhat le, amit a kapott eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd 3.2. pont).

A folyadékfázis hosszú visszatartási ideje (36 óra), valamint a rendszeres tápanyag-hozzáadás miatt a vizsgálat nem a szennyvíztisztító telepen fennálló körülményeket modellezi. A különböző vizsgálati anyagokkal kapott eredmények azt mutatják, hogy a módszer kifejezetten jó körülményeket biztosít a biológiai lebontáshoz.

A vizsgálati körülmények rendkívül kedvezőek az olyan mikroorganizmusok szelekciójához és/vagy adaptációjához, amelyek képesek a vizsgálati anyag lebontására. (Az eljárást más vizsgálatban használandó, akklimatizált inokulumok előállítására is alkalmazni lehet.)

A módszer szerint az oldott szerves szén koncentrációjának mérésével határozzuk meg a vizsgálati anyag végső biológiai lebonthatóságát. Célszerűbb a DOC-értéket a savanyítás és a levegőztetés után meghatározni, mint a $C_{\text{összes}} - C_{\text{szervetlen}}$ különbségből számítani.

Megfelelő, specifikus analitikai módszer egyidejű alkalmazása lehetővé teszi az anyag primer biológiai lebonthatóságának (az eredeti kémiai szerkezet eltűnése) értékelését.

A módszert csak azokra az anyagokra lehet a vizsgálatban alkalmazott koncentrációban használni, amelyek:

- vízben oldhatóak (legalább 20 mg oldott szerves szén/liter-ig);
- gőznyomásuk elhanyagolható;
- a baktériumokra nézve nem gátló tulajdonságúak;
- a vizsgálati rendszeren belül jelentős mértékben nem adszorbeálódnak;
- nem tűnnek el habzás révén a vizsgálati oldatból.

A vizsgálati anyag szervesszén-tartalmát meg kell határozni.

A vizsgálati anyag legfontosabb komponenseinek arányaira vonatkozó információk hasznosak a kapott eredmények értékelésénél, különösen azokban az esetekben, ahol az eredmények kis vagy elhanyagolható mértékű biológiai lebonthatóságot mutatnak.

A vizsgálati anyag mikroorganizmusokon kifejtett toxicitására vonatkozó információkra szükség van a megfelelő vizsgálati koncentráció megválasztásához, illetve az eredmények magyarázatához, ha a kapott eredmények kis biológiai lebonthatóságot mutatnak.

1.2. Definíciók és mértékegységek

C_T = az ülepített szennyvízben jelen levő, vagy a levegőztetés kezdetén ahhoz adott vizsgálati anyag, szerves szén koncentrációban (mg/liter) kifejezve.

C_t = a vizsgálati felülúszóban mért oldott szerves szén koncentrációja a levegőztetési periódus végén (mg/liter).

C_c = a kontroll felülúszóban mért oldott szerves szén koncentrációja a levegőztetési periódus végén (mg/liter).

Ebben a módszerben a biológiai lebomlás definíció szerint a szerves szén elfogyását jelenti. A biológiai lebomlást a következőképpen fejezhetjük ki:

a naponta hozzáadott anyag, D_{da} mennyiségének százalékos csökkenése:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

ahol D_{da} = lebomlás/napi hozzáadás

a jelen lévő anyag mennyiségének százalékos lebomlása minden nap kezdetén (D_{ssd}):

[2 (a)]

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{t_i} - C_{c_i} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{t_i} - C_{c_i}} \times 100$$

$$= \frac{2C_T + 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100$$

[2 (b)]

ahol D_{ssd} = lebomlás/anyag a nap kezdetén;

az „i” és az „i+1” indexek a mérési napoknak felelnek meg.

A 2(a) egyenletet célszerű használni, ha az elfolyó DOC-értéke napról napra változik, míg a 2(b) egyenlet használata akkor ajánlott, ha az elfolyó DOC-értéke az egymást követő napok során viszonylag állandó marad.

1.3. Referenciaanyagok

Bizonyos esetekben – amikor új anyagot vizsgálunk – referenciaanyagok alkalmazása célszerű lehet; azonban speciális referenciaanyagot itt nem javasolunk.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Szennyvízkezelő telepről származó eleveniszapot SCAS-készülékbe (semi-continuous activated sludge) teszünk. Ezután a vizsgálati anyagot, valamint az ülepített kommunális szennyvizet hozzáadjuk, majd a keveréket 23 órán át levegőztetjük. Ezután a levegőztetést abbahagyjuk, az iszapot hagyjuk leüledni, majd a felülúszót leszívjuk.

A levegőztető kamrában maradó iszapot ezután összekeverjük a vizsgálati anyag és a szennyvíz újabb azonos mennyiségével, és a műveletet megismételjük.

A biológiai lebomlást a felülúszó oldott szerves szén tartalmának meghatározásával állapítjuk meg. Ezt az értéket össze kell hasonlítani a kizárólag ülepített szennyvizet tartalmazó kontroll értékével.

Amennyiben specifikus analitikai módszert alkalmazunk, a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai lebomlás során bekövetkező változásait mérjük (primer biológiai lebonthatóság).

1.5. Minőségi kritériumok

Az – oldott szerves szén elfogyásán alapuló – módszer reprodukálhatóságának megállapítása még nem történt meg. (Amennyiben primer biológiai lebomlásról van szó, azok az anyagok, amelyek nagy mértékű lebomlást mutatnak, meglehetősen pontos adatokat adnak.)

A módszer érzékenységét jelentős mértékben meghatározza a vakpróba szórása, valamint – kisebb mértékben – az oldott szerves szén meghatározásának pontossága, illetve a vizsgálati anyag mennyisége az egyes ciklusok kezdetén.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészületek

Megfelelő számú tiszta levegőztető egységet – vagy eredeti, 1,5 literes SCAS-egységet – használunk, valamint minden vizsgálati anyaghoz és kontrollhoz szereljük levegőztető csöveket. A vizsgálati egységekbe vezetett sűrített levegőt vattaszűrő közbeiktatásával tisztítjuk. A levegő szerves szennyezést nem tartalmazhat, valamint a párolgási veszteségek csökkentésére vízgőzzel telíteni kell.

Literenként 1–4 g szuszpendált szilárd anyagot tartalmazó kevert folyadékmintát veszünk, elsősorban kommunális szennyvizet kezelő telepről. Mindegyik levegőztető egységbe körülbelül 150 ml kevert folyadék szükséges.

A vizsgálati anyag törzsadatait desztillált vízzel kell elkészíteni; a szokásosan alkalmazandó koncentráció 400 mg szerves szén/liter, amely minden egyes levegőztetési ciklus kezdetén 20 mg szén/liter tesztanyag-koncentrációt ad, amennyiben nem történik biológiai lebomlás.

Nagyobb koncentrációkat is alkalmazhatunk, amennyiben a mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitás ezt lehetővé teszi.

A törzsoldat szervesszén-tartalmát mérjük meg.

1.6.2. Vizsgálati körülmények

Aerob mikroorganizmusokat használunk nagy koncentrációban (1–4 g szuszpendált szárazanyag/liter). Az effektív visszatartási periódus 36 óra. A szennyvízben lévő széntartalmú anyag jelentős mértékben oxidálódik, általában a levegőztetési ciklus kezdetétől számított nyolc órán belül. A levegőztetési időszak hátralévő részében az iszap endogén módon „lélegzik”, és ezen idő alatt egyedül a vizsgálati anyag az elérhető szubsztrátum, kivéve, ha az is könnyen metabolizálódik. Ezek a körülmények, a naponkénti újbóli inokulálással kombinálva (kommunális szennyvíz mint tápanyag alkalmazása esetén) rendkívül kedvező körülményeket teremtenek mind az akklimatizálódáshoz, mind a nagyfokú biológiai lebomláshoz.

1.6.3. A vizsgálat kivitelezése

A vizsgálatot 20–25 °C közötti hőmérsékleten kell végezni.

Főleg kommunális szennyvizet feldolgozó, eleveniszapos szennyvíztisztítást végző telepről vagy laboratóriumi egységből kevert folyadékmintát veszünk, és azt a laboratóriumi munka ideje alatt aerob körülmények között tartjuk. Minden levegőztetési egységet valamint a kontroll egységet 150 ml kevert folyadékkal feltöltjük (amennyiben eredeti SCAS-egységet használunk, a megadott térfogatértékeket tízzel meg kell szorozni), és megkezdjük a levegőztetést. 23 óra elteltével a levegőztetést leállítjuk, az iszapot pedig 45 percen keresztül üleptjük. Az edények csapjait sorban kinyitjuk, és a felülúszóból 100 ml-t leengedünk. Közvetlenül a felhasználás előtt veszünk az üleptített szennyvízmintából, és ebből 100 ml-t a levegőztető egységben lévő iszaphoz adunk. A levegőztetést újra elindítjuk. Ebben a fázisban vizsgálati anyagot nem kell hozzáadni, az egységbe pedig csak addig kell naponta kommunális szennyvizet adni, amíg az üleptetés után nem kapunk tiszta felülúszót. Ez rendszerint két hetet vesz igénybe, mely elteltével az oldott szerves szén levegőztetési ciklusok utáni értéke a felülúszóban konstans értékhez közelít.

Az időszak végére az egyes leülepedett iszapokat összekeverjük, és az így kapott iszaphoz minden egységbe 50 ml-t adunk.

A kontroll egységbe 95 ml üleptített szennyvizet és 5 ml vizet, a vizsgálati egységbe 95 ml üleptített szennyvizet és 5 ml megfelelő tesztanyag törzsoldatot (400 mg/liter) adunk. A levegőztetést elindítjuk, és 23 órán át folytatjuk. Az iszapot ezután 45 percig üleptjük, a felülúszót leengedjük, és oldott szerves szén tartalmát megmérjük.

Az előbbieken ismertetett töltés-leengedés eljárást a vizsgálat ideje alatt naponta ismételni kell.

Üleptetés előtt szükséges lehet az egység falainak megtisztítása, a folyadékszint feletti szilárdanyaglerakódás eltávolítására. Minden egységnek legyen saját kaparója vagy keféje, a keresztszennyeződés megakadályozása érdekében.

Ideális esetben az oldott szerves szén koncentrációját a felülúszóban naponta kell meghatározni, de kevésbé gyakori meghatározás is elfogadható. Az analízis előtt a folyadékot kimosott, 0,45 µm-es membránszűrőn leszűrjük, vagy centrifugáljuk. A membránszűrő akkor megfelelő, ha a szűrés során nem oldódik ki belőle szerves szén a folyadékba, illetve a szűrő nem adszorbeálja az anyagot. Centrifugálás során a minta hőmérséklete nem haladhatja meg a 40 °C-ot.

Azokra az anyagokra nézve, amelyek csak csekély biológiai lebomlást mutatnak, illetőleg semmilyen biológiai lebomlást nem mutatható ki, a vizsgálat időtartamát nem lehet pontosan meghatározni. A tapasztalat azonban azt mutatja, hogy ilyen esetben a vizsgálatnak legalább 12 hétig, de legfeljebb 26 hétig kell tartania.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

Az oldott szerves szén koncentrációját a vizsgálati egységben lévő, illetve a kontroll egységben lévő felülúszóra vonatkozóan az idő függvényében ábrázoljuk.

A biológiai lebomlás előrehaladásával a vizsgálati mintában mért érték közelíteni fog a kontroll értékéhez. Amikor a két érték közötti különbség értékét három egymást követő mérésben állandónak találjuk, a továbbiakban ugyanilyen számú mérés elegendő az adatok statisztikai feldolgozásához, és a vizsgált vegyület biológiai lebonthatóságát (D_{da} vagy D_{ssd}) kiszámítjuk (lásd 1.2.).

3. VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

3.1. Az eredménylap

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

- a szennyvízre vonatkozó valamennyi információ, az alkalmazott egység típusa, a vizsgálati anyagra vonatkozó kísérleti eredmények, a referenciaanyag (amennyiben használtunk), valamint a vakpróba eredményei;
- hőmérséklet;
- a fogyás grafikus ábrázolása az idő függvényében, magyarázattal és a számítási módszer (lásd az 1.2. pontot);
- az eleveniszap és a szennyvíz vételének helyére és idejére vonatkozó információk;
- az adaptációs státusz, koncentráció stb.;
- a vizsgálati eljárás módosításának tudományos indokai;
- aláírás és dátum.

3.2. Az eredmények értékelése

Mivel ezzel a módszerrel olyan anyag vizsgálható, amelyik biológiailag nem bontható le könnyen, a DOC kizárólag a biológiai lebomlás következtében történő csökkenése rendszerint fokozatos, napok vagy hetek alatt zajlik le, kivéve azokat az eseteket, ahol az akklimatizáció hirtelen történik meg. Ezt az anyag néhány hét utáni, gyors elfogyása jelzi.

Azonban a fizikai-kémiai adszorpció bizonyos esetekben befolyásolhatja az eredményeket; ez abból látható, hogy a kezdetben hozzáadott DOC teljes vagy részleges elfogyása figyelhető meg. Az ezután lejátszódó jelenségek több tényezőtől, például az adszorpció mértékétől vagy a szuszpendált anyagnak az elfolyóban meglévő koncentrációjától függenek. Általában a kontroll és a vizsgálati felülúszó DOC-koncentrációja közötti különbség a kezdeti kis értéktől kezdve fokozatosan növekszik, és ez a különbség a kísérlet hátramaradó részében egy új értékre áll be, kivéve, ha akklimatizáció játszódik le.

Amennyiben a biológiai lebomlás (vagy a részleges biológiai lebomlás) és az adszorpció között különbséget kell tenni, akkor további vizsgálatokra van szükség. Ezt többféle módon lehet megtenni, a legmegfelelőbb módszer a felülúszónak vagy az iszapnak inokulumként alapvizsgálatban (célszerűen respirometrikus vizsgálatban) történő használata.

Azokat az anyagokat lehet potenciálisan biológiailag lebonthatónak tekinteni, amelyeknél a DOC nagymértékű, nem adszorpció következtében történő csökkenését tapasztaljuk. A részleges, nem adszorpció következtében történő csökkenés csak bizonyos mértékű biológiai lebonthatóságra utal.

A DOC kis mértékű csökkenése vagy nem csökkenése azt mutatja, hogy a vizsgálati anyag gátolja a mikroorganizmusokat; ezt bomlás és iszapvesztés is mutatja, aminek eredményeképpen a felülúszó zavaros lesz. A vizsgálatot a vizsgálati anyag kisebb koncentrációját alkalmazva meg kell ismételni.

Vegyület-specifikus analitikai módszert vagy ¹⁴C-gyel jelzett vizsgálati anyagot alkalmazva nagy érzékenységet érhetünk el. Amennyiben ¹⁴C-gyel jelzett vegyületet alkalmazunk, akkor a ¹⁴CO₂ megjelenése igazolja, hogy biológiai lebomlás játszódott le.

Amennyiben az eredményeket a primer biológiai lebomlás formájában adjuk meg, akkor meg kell magyarázni – amennyiben lehetséges – a kémiai szerkezet változásait, amely a kiindulási vizsgálati anyag bomlásának leállását okozza

Az analitikai módszer validitását meg kell adni, a vakpróba-válással együtt.

4. IRODALOMJEGYZÉK

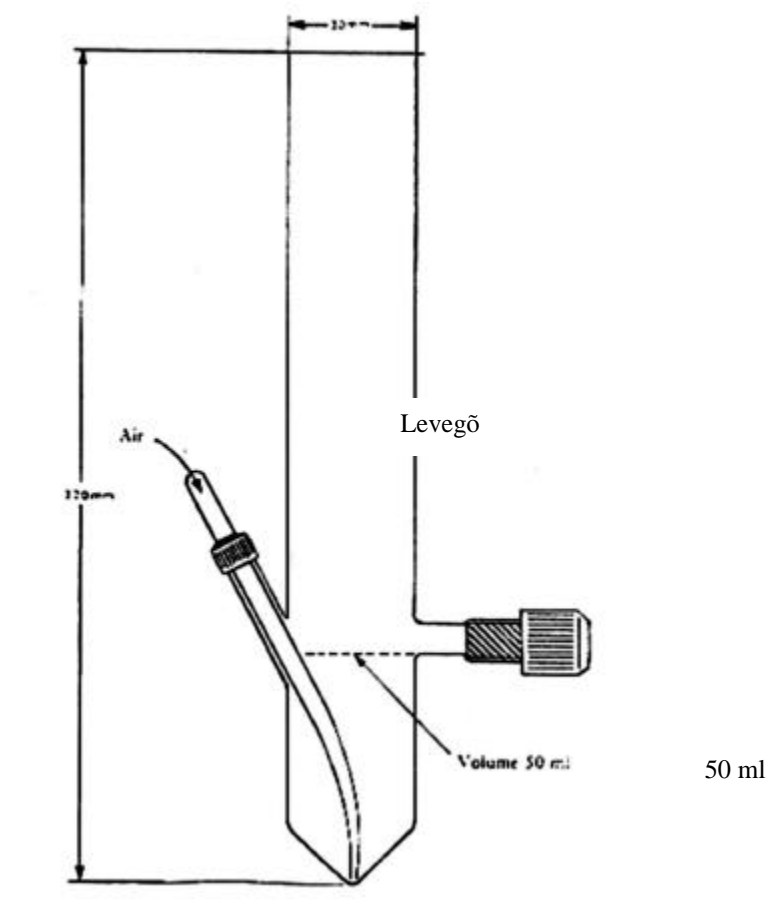
[1] OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, Decision of the Council C (81) 30 final.

*Függelék**SCAS-vizsgálat: példa az eredmények megadására*

Anyag	C_T [mg/l]	$C_T - C_c$ [mg/l]	Százalékos biológiai lebomlás [D ₅₀]	Vizsgálati idő [nap]
4-acetil-aminobenzol-szulfonát	17,2	2,0	85	40
Tetrapropilén-benzolszulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
Dietilén-glikol	16,5	0,2	98,8	40
Anilin	16,9	1,7	95,9	40
Ciklopentán-tetraarboxilát	17,9	3,2	81,1	120

1. ábra

Példa a vizsgálati berendezésre



C.13. A BIOKONCENTRÁCIÓ VIZSGÁLATA: ÁTFOLYÁSOS HALTESZT

1. MÓDSZER

Ez a biokoncentrációt vizsgáló módszer az OECD TG 305 (1996) másolata.

1.1. Bevezetés

Ezzel a módszerrel a különböző anyagok halakban történő biokoncentrációs potenciálját vizsgáljuk átfolyásos körülmények között. Bár az átfolyásos tesztet előnyben kell részesíteni, statikus rendszerek is megengedhetők, feltéve, hogy a validitási kritériumok teljesülnek.

A módszer elegendő részlettel szolgál a teszt kivitelezéséhez, de kellő szabadságot enged ahhoz, hogy kísérletünket az egyes laboratóriumok körülményeihez és a tesztanyagok változó jellemzőihez igazítsuk. A módszer leginkább az olyan stabil szerves vegyi anyagokra alkalmazható, melyek n -oktanol/víz megoszlási hányadosának logaritmusa az 1,5–6,0 tartományba esik (1), de még alkalmazható erőteljesen lipofil anyagokra (az n -oktanol/víz megoszlási hányadosuk logaritmusa nagyobb, mint 6,0) is. Az előre becsülhető biokoncentrációs tényező (BCF), amit néha K_B -ként is jelölnek, az erősen lipofil anyagokra feltehetően nagyobb lesz, mint a laboratóriumi kísérletekből várt stacionárius biokoncentrációs tényező (BCF_{SS}) értéke. Az olyan szerves vegyi anyagok, melyek kb. n -oktanol/víz megoszlási hányadosának logaritmusa 9,0-ig terjed, az előre becsülhető biokoncentrációs tényezőjét Bintein és mtsai egyenletével kaphatjuk meg (2). A biokoncentrációs potenciált jellemző paraméterekhez tartozik a felvételi sebességi állandó (k_1), a kiürülési sebességi állandó (k_2) és a BCF_{SS} .

A radioaktívan jelzett tesztanyagok megkönnyíthetik a víz- és halminták vizsgálatát, és segítségükkel eldönthetjük, hogy kell-e bomlástermék-azonosítást és mennyiségi meghatározást végezni. Ha az összes radioaktív maradékot mérjük (például étetéssel vagy szövetfeloldással), a BCF számítása mind a kiindulási vegyületen, illetve bármely visszatartott metaboliton és az asszimilált szénen is alapul. Az összes radioaktív maradékon alapuló BCF-okat ezért nem lehet közvetlenül összehasonlítani, csak a kiindulási vegyület specifikus kémiai analíziséből nyert BCF-tal.

Radioaktív jelzési vizsgálatoknál a kiindulási vegyület biokoncentrációs tényezőjének meghatározásához egy kiürülési fázist iktathatunk be, és ha szükséges, a fő metabolitok is meghatározhatók. A biokoncentrációs vizsgálatot kombinálni is lehet az anyag metabolizmusának vizsgálatával a szövetekben levő maradékok azonosítása és analízise révén.

1.2. Definíciók és mértékegységek

A *bioakkumuláció/biokoncentráció* a tesztanyag koncentrációjának növekedése egy szervezetben/en (meghatározott szöveteiben/n) a tesztanyag környező közegben található koncentrációjához viszonyítva.

A *biokoncentrációs tényező (BCF vagy K_B)*: a teszt alatt a tesztanyag koncentrációjának (a halban/-on, vagy meghatározott szöveteiben/-n; C_h , $\mu\text{g/g}$ (ppm)) és a vegyszer koncentrációjának (a környező közegben; C_v , $\mu\text{g/ml}$ (ppm)) hányadosa.

A BCF-ot *stacionárius biokoncentrációs tényezőnek* (BCF_{SS} , vagy K_B) nevezzük, ha egy hosszabb időtartam során nem változik jelentősen, azaz a környező közegben a tesztanyag koncentrációja állandó.

Plató vagy *stacionárius állapot* akkor tapasztalható, ha a halban mért tesztanyagot (C_h) az idő függvényében ábrázolva, a görbe párhuzamos az időtengellyel, és C_h három egymást követő, legalább két nap különbséggel vett mintában $\pm 20\%$ -on belül van egymáshoz képest, és nincs számottevő különbség a három mintavételi periódus eredményei között. Egyesített minták esetében legalább négy egymást követő vizsgálat szükséges. Olyan tesztanyagoknál, amelyek felvétele lassú, sokkal megfélelőbbek a hét napos mérési időközök.

Azokat a biokoncentrációs tényezőket, melyeket közvetlenül a kinetikai sebességállandókból (k_1/k_2) számolunk, *kinetikus koncentrációs tényezőnek* (BCF_k) nevezzük.

Az *n -oktanol-víz megoszlási hányados* a vegyi anyag n -oktanolban és vízben, egyensúlyi állapotban mért oldhatóságának aránya (A.8 módszer). A vegyi anyag biokoncentrációs potenciálja jellemzésére – vízi szervezetekben – az n -oktanol-víz megoszlási hányados logaritmusát használjuk.

Az *expozíciós idő* vagy *felvételi fázis* az az időtartam, amíg a hal érintkezik a tesztelt vegyi anyaggal.

A *felvételi sebességi állandó* (k_1) a tesztanyag-koncentráció számszerű növekedési sebességét fejezi ki a tesztalban/-on (vagy meghatározott szöveteiben/-n), az expozíciós idő alatt (a k_1 -et 1/nap-ban fejezzük ki).

A *kiürülési fázis*: az tesztanyag a tesztalból (vagy meghatározott szövetéből) történő kiürülésének időtartama a tesztanyagot tartalmazó közegből az anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően.

A kiürülési sebességi állandó (k_2): a tesztanyag-koncentráció számszerű csökkenési sebességét fejezi ki a tesztalban/-on (vagy meghatározott szöveteiben/-n), a halnak a tesztanyagot tartalmazó közegből az anyagot nem tartalmazó közegbe való áthelyezését követően (a k_2 -t 1/nap-ban fejezzük ki).

1.3. A módszer elve

A teszt két fázisból áll: az felvételi és a kiürülési fázisból. A felvételi fázis alatt az egy fajba tartozó halak különálló csoportjai a tesztanyag legalább két koncentrációjával érintkeznek. Ezután átkerülnek a tesztanyagot nem tartalmazó közegbe (innenről kezdve kiürülési fázisról beszélünk). Kiürülési fázisra mindig szükség van, kivéve, ha az anyag felvétele a felvételi fázis alatt elhanyagolható volt (pl. a BCF kisebb 10-nél). A tesztanyag koncentrációját a halban/-on (vagy meghatározott szöveteiben/-n) a teszt mindkét fázisában követjük. A két tesztkoncentráción kívül a halak egy (kontroll) csoportját tesztanyag nélkül, de minden más szempontból azonos körülmények között tartjuk. A biokoncentráció által okozott ártalmas hatásokat a párhuzamosan beállított kontrollcsoporthoz viszonyítjuk. Így meghatározhatjuk a tesztanyag háttérkoncentrációját is.

A felvételi fázis 28 napig tart, hacsak az egyensúly bizonyítottan már korábban be nem áll. A 3. melléklet egyenletével becsülhető a felvételi fázis hossza és a stacionárius állapot eléréséhez szükséges idő. A kiürülési periódus ezután a hal egy másik tiszta, ugyanolyan közegbe, de tesztanyagot nem tartalmazó edénybe való átrakásával kezdődik. Ahol lehetséges, a stacionárius biokoncentrációs tényezőt (BCF_{SS}), a halban (C_h) és a vízben mért (C_v) koncentráció arányából, a kinetikus biokoncentrációs tényezőt (BCF_k) a felvételi (k_1) és kiürülési (k_2) sebességi állandó arányából – elsőrendű kinetikát feltételezve – számítsuk ki. Ha kinetika szemmel láthatóan nem elsőrendű, összetettebb modelleket kell alkalmazni (5. melléklet).

Ha 28 nap alatt nem áll be a stacionárius állapot, a felvételi fázist meg kell hosszabbítani a stacionárius állapot eléréséig, illetve maximum 60 napig; ezután kezdődik a kiürülési fázis.

A felvételi sebességi állandót, a kiürülési sebességi állandót (vagy állandókat, ha összetettebb modellt alkalmaztunk), a biokoncentrációs tényezőt, és ahol lehetséges, e paraméterek mindegyikének konfidenciahatárait, a halban és vízben mért tesztanyag-koncentrációt legjobban leíró modell szerint kell számítani.

A BCF értékét a hal teljes nedves tömegének függvényeként ábrázoljuk/fejezzük ki. Különleges esetben azonban meghatározott szövetek és szervek (pl. izom, máj) is használhatók, ha a hal elég nagy, vagy ha a hal ehető (filé) és nem ehető (zsigeri) részekre osztható. Mivel sok szerves anyag esetében jelentős kapcsolat van a biokoncentrációs potenciál és a lipofilitás között, ezért ugyanilyen kapcsolat figyelhető meg a tesztal lipidtartalma és az ilyen anyagok biokoncentrációja között is. Ezért a nagy lipofilitású (vagyis a n-oktanol/víz megoszlási hányados logaritmus >3) anyagokra a biokoncentrációt a teljes testtömegén kívül a lipidtartalom vonatkozásában is ki kell fejezni.

Ha lehetséges, a lipidtartalmat ugyabból a biológiai anyagból kell meghatározni, mint amiből a tesztanyag koncentrációját is meghatároztuk.

1.4. A tesztanyagra vonatkozó információk

A biokoncentrációs teszt elvégzése előtt a tesztanyagról a következő információkra van szükségünk:

- oldhatóság vízben;
- n-oktanol/víz megoszlási hányados (az A.8-ban megadott HPLC-módszerrel meghatározva);
- hidrolízis;
- szfómáció vízben (napsugárzás vagy mesterséges megvilágítás hatására), illetve a biokoncentrációs tesztben alkalmazott sugárzási feltételek mellett;
- felületi feszültség (olyan anyagok fototraesetében, ahol n-oktanol/víz megoszlási hányadost nem lehet meghatározni);
- gőznyomás;
- gyors biológiai lebonthatóság (ha indokolt).

Továbbá határozzuk meg a tesztben használt halfajokra vonatkozó időfüggetlen (aszimptotikus) LC_{50} -értéket. Legyen ismert pontosságú és érzékenységgel analitikai módszer a tesztanyag mennyiségének meghatározására a tesztoldatokban és a biológiai anyagban, és a módszernek tartalmaznia kell a mintaelőkészítés és -tárolás leírását is. Ismernünk kell a tesztanyag kimutatási határát vízben és a halszövetekben egyaránt. Ha ^{14}C -gyel jelzett tesztanyagot használunk, a szennyezők százalékos radioaktivitását is ismernünk kell.

1.5. A teszt érvényessége

A teszt a következő feltételek teljesülése esetén érvényes:

- a hőmérsékletingadozás nem lehet több ± 2 °C-nál,
- az oldott oxigén koncentrációja nem eshet 60%-os telítettség alá,
- a tesztedényekben a tesztanyag koncentrációját a felvételi fázisban mért értékek átlaga $\pm 20\%$ -án belül kell tartani,
- a teszt végén a kontroll és a kezelt halak mortalitása és egyéb hatások/betegségek maximálisan a halak 10%-át érinthetik. Ha a teszt több hétig vagy hónapig tart, a pusztulás vagy más ártalmas hatás egyik halcsoportban sem lehet nagyobb havi 5%-nál, és nem haladhatja meg a 30%-ot összesen.

1.6. Referenciaanyagok

A kísérleti eljárás ellenőrzésére hasznos lehet ismert biokoncentrációs potenciálú referenciavegyületek használata, bár konkrét anyagot még nem javasoltak.

1.7. A módszer leírása

1.7.1. Eszközök

A tesztben kerülni kell minden olyan eszköz használatát, amely olyan anyagokat tartalmaz, amelyek kioldódhatnak, szorbeálódhatnak vagy kimosódhatnak az eszközökből, és ártalmasak lehetnek a halakra. Szabványos, kémiaileg ellenálló anyagból készült, a töltési sebességnek megfelelő kapacitású, négyzetes vagy hengeres tartályokat használunk. A lágyműanyag-csövek használatát minimalizálni kell. Teflon (R), rozsdamentes acél és/vagy üvegcsövek használata ajánlott. A tapasztalat szerint szükséges lehet nagy abszorpciós együtthatójú anyagok – mint pl. szintetikus piretroidok – vizsgálatok szilanizált üvegeszközöket használni. Ilyen esetben a felszerelést használat után el kell dobni.

1.7.2. Hígítóvíz

A kísérletekhez szennyeződésektől mentes, állandó minőségű (lehetőleg) természetes vizet használjunk. A hígításra használt víz minőségének olyannak kell lennie, hogy lehetővé tegye a választott halfajok túlélését az akklimatizációs és a tesztidőszakok alatt anélkül, hogy bármilyen abnormalis külső megjelenés vagy viselkedés jelentkezne. Bizonyítsuk, hogy a felhasznált fajok képesek túlélni, fejlődni és szaporodni a hígítóvízben (pl. laboratóriumi tenyészetben, vagy életciklusra vonatkozó toxicitásteszttel). A hígítóvízről adjuk meg a következő paramétereket: pH, keménység, összes szilárd anyag, összes szerves szén, (lehetőleg) ammónium- és nitrítartalom, lúgosság és tengeri fajoknál sótartalom. A halak tartásának optimális körülményei ismertek, az 1. melléklet számos paraméterre vonatkozóan megadja az ajánlott maximális koncentrációt a teszthez használandó édes- és tengervízre egyaránt.

A tesztidőszak alatt a víz minősége állandó kell, hogy legyen. A pH értékének 6,0 és 8,5 között kell lennie, és egy adott teszt során nem változhat $\pm 0,5$ pH-egységnél nagyobb mértékben. Időközönként a vízből analízisre mintát veszünk, hogy a hígítóvíz ne befolyásolhassa hátrányosan a teszteredményeket (például a tesztanyag komplexálásával), vagy ne lehessen káros hatással a halállomány állapotára. Nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), fő anionok és kationok (pl. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), peszticidek (pl. összes szerves foszforvegyület és összes szerves klórvegyület), összes szerves szén és szuszpendált szilárd anyag meghatározását el kell végezni, például háromhavonként, ott, ahol a hígítóvíz bizonyítottan viszonylag állandó minőségű. Ha legalább egy éven keresztül állandónak bizonyul a vízminőség, hosszabb időközönkénti vizsgálat is elegendő lehet (pl. minden hat hónapban).

A hígítóvíz természetes részecske- és teljes szerves szén-tartalma (TOC) is a lehető legalacsonyabb legyen, hogy a tesztanyag ne abszorbeálódjon a szerves anyagon, ami csökkenthetné a tesztanyag biológiai elérhetőségét (4). A maximális elfogadható szárazanyag-koncentráció 5 mg/l (0,45 μm -es szűrőn szűrve), a maximális TOC-érték pedig 2 mg/l (lásd 1. melléklet). A vizet, ha szükséges, felhasználás előtt leszűrjük. A teszthalaktól (ürülék) és a táplálék maradékából származó szerves széntartalom a lehető legkisebb legyen a vízben. A teszt egész időtartama alatt a szerves szén koncentrációja a tesztedényben nem haladhatja meg 10 mg/l-nél ($\pm 20\%$) többel a tesztanyagból származó szerves szén és a szolubilizálószer (ha használtunk ilyet) együttes koncentrációját.

1.7.3. Tesztoldatok

A tesztanyagból hígítóvízzel megfelelő koncentrációjú törzsoldatot készítünk. A törzsoldatot legegyszerűbben úgy készíthetjük, hogy a tesztanyagot a hígítóvízben feloldjuk, vagy ha nem oldódik, folyamatosan kevertetjük. Általában nem ajánlatos oldószereket vagy diszpergálószereket használni; de bizonyos esetekben a megfelelően tömény törzsoldat

készítéséhez alkalmazhatjuk őket. A felhasználható oldószerek: etanol, metanol, etilén-glikol-metil-éter, etilén-glikol-dimetil-éter, dimetil-formamid és trietilén-glikol. A felhasználható diszpergálószer: Cremophor RH40, Tween 80, metilcellulóz 0,01% és HCO-40. Biológiai könnyen lebontható szerek használata esetén gondosan kell eljárni, mivel ezek a szerek a baktériumnövekedés serkentése által problémát okozhatnak az átfolyásos tesztekben. A tesztanyag radioaktívan is jelölhető. A tesztanyagnak a lehető legnagyobb (pl. 98%-nál nagyobb) tisztaságúnak kell lennie.

Az átfolyásos tesztek kivitelezéséhez szükség van a tesztanyag törzsoldatát folyamatosan adagoló és hígító rendszerre (pl. állandó áramlási sebességet biztosító pumpa, szabályozható hígítórendszer, telítőrendszer) a megfelelő koncentrációk biztosítására a tesztedényekben. Az áramlási sebességet úgy állítsuk be, hogy az egyes tesztedényekben naponta legalább öt teljes térfogatcsere végbemenjen. Az átfolyásos módszer javasolt, de ahol ez nem lehetséges (pl. ha a tesztorganizmokra károsan hat), fél-statisztikus módszer is alkalmazható, feltéve, hogy teljesülnek az érvényességi kritériumok. A törzsoldatok és a hígítónvíz áramlási sebességét a teszt előtt és után 48 órával, és a teszt közben legalább naponta ellenőrizni kell. Az ellenőrzés során határozzuk meg az áramlási sebességet az egyes tesztedényekben, és biztosítsuk, hogy az ne változzon 20%-nál nagyobb mértékben sem az egyes tesztedényekben, sem azok között.

1.7.4. A fajok megválasztása

A fajok megválasztásánál fontos kritérium, hogy megfelelő méretben könnyen beszerezhetők legyenek, és a laboratóriumban könnyen tarthatók legyenek. A halfajok megválasztásának egyéb kritériumai közé tartozik a rekreációs, kereskedelmi, ökológiai fontosság éppúgy, mint az összehasonlítható érzékenység, múltbeli sikeres használat stb.

Az ajánlott tesztfajok a 2. mellékletben találhatók. Más fajok is használhatók, de a tesztmódszert esetleg át kell dolgozni a megfelelő tesztkörülmények biztosításához. A fajok és a kísérleti módszer megválasztásának indoklását jegyzőkönyvezni kell.

1.7.5. A halak tartása

A tesztelésre szánt populációt legalább két hétig a teszt körülményeinek megfelelő hőmérsékletű hígítónvízben akklimatizáljuk, és a teszt alatt használttal megegyező típusú étrenden tartjuk őket.

48 órás betelepítési időszak után a pusztulást jegyzőkönyvezni kell, és a következő kritériumokat kell alkalmazni:

- ha a mortalitás hét nap alatt meghaladja a populáció 10%-át, az állomány nem használható tesztelésre,
- ha hét nap alatt a halak 5–10%-a pusztul el: további hét napig tartjuk őket,
- ha a mortalitás hét nap alatt kisebb, mint 5%: a halakat további hét napig tartjuk. Ha ebben az időszakban a mortalitás meghaladja a 5%-ot, az állomány tesztelésre nem használható.

Beteg és torzfejlődéses halakat tesztelésre ne használjunk. A beteg halakat el kell távolítani a tesztelésre szánt állományból. A tesztet megelőző két hétben és a teszt alatt a halak nem kaphatnak semmilyen betegség elleni kezelést.

1.8. A teszt kivitelezése

1.8.1. Előteszt

A tesztkörülmények optimalizálására előteszteket is lehet végezni, például a tesztanyag-koncentráció(k), a felvételi és kiürülési fázisok megválasztására.

1.8.2. Az expozíció körülményei

1.8.2.1. A felvételi fázis időtartama

A felvételi fázis időtartamának meghatározása előzetes tapasztalatok (pl. várhatóan hasonló viselkedésű anyagok előzetes akkumulációs vizsgálata), a tesztanyag vízben való oldhatósága, vagy n-oktanol/víz megoszlási hányadosa alapján történik (lásd 3. melléklet).

A felvételi fázis 28 napig tart, kivéve ha igazolható, hogy az egyensúly korábban beáll. Ha a stacionárius állapot nem áll be 28 nap alatt, a felvételi fázist meg kell hosszabbítani az egyensúly beálltáig, de legfeljebb 60 napig.

1.8.2.2. A kiürülési fázis időtartama

A felvételi fázis hosszának a fele rendszerint elég a felvett anyag megfelelő (pl. 95%-os) kiürüléséhez (lásd 3. mellékletet a becslés magyarázatához). Ha a 95%-os kiürüléshez szükséges idő túl hosszú, például meghaladja a felvételi fázis hosszának kétszeresét (azaz több, mint 56 nap), rövidebb időtartam is elegendő (azaz amíg a tesztanyag koncentrációja kisebb lesz a felvételi fázis végén kialakuló koncentráció 10%-ánál). Az elsőrendű kinetikájú egyrekeszes hal-modellnél összetettebb felvételi és

kiürülési mintázattal rendelkező anyagok esetében a kiürülési sebességi állandó meghatározására hosszabb kiürülési fázis is megengedett. A kiürülési fázis addig tart, amíg a halban a tesztanyag koncentrációja az analitikai detektálási határ fölött marad.

1.8.2.3. A teszthalak száma

A halak számát koncentrációnként úgy választjuk meg, hogy legalább négy halat kivehessünk mintánként és mintavételként. Ha komolyabb statisztikai számításokat akarunk végezni, mintánként több halra lesz szükség.

Kifejlett halak használata esetén jegyzőkönyvezni kell, hogy a hímeket és nőstényeket milyen arányban alkalmazzunk a kísérletben. Ha mindkét nem egyedét használjuk, dokumentálni kell, hogy az expozíció előtt nem állt fenn jelentős különbség a két nem lipidtartalma között. Ha ez teljesül, a hímeket és a nőstényeket együtt kell kezelni.

Hasonló tömegű halakat alkalmazzunk, a legkisebbek ne legyenek kisebbek a legnagyobb hal tömegének kétharmadánál. Megegyező korú és egy helyről származó halakat használjunk. Mivel a halak tömege és kora időnként jelentős hatással lehet a BCF-értékekre (1), ezeket a részleteket pontosan rögzíteni kell. A halak átlagos tömegének becslésére a populációból néhányat a teszt beállítása előtt kiveszünk és lemérünk.

1.8.2.4. Feltöltés

A halak méretéhez viszonyítva nagy mennyiségű tesztoldatot használjunk, hogy minimalizáljuk a teszt kezdetén a halak hozzáadásásával okozott C_v és oldottoxigén-koncentráció csökkenését. Fontos, hogy a feltöltési sebesség a használt teszt faj igényeihez igazodjon. Az ajánlott feltöltési sebesség minden esetben 0,1–1,0 g hal (nedves tömeg)/liter/nap. Nagy töltési sebesség akkor alkalmazható, ha biztosak vagyunk abban, hogy a tesztanyag megkövetelt koncentrációja fenntartható $\pm 20\%$ -os határon belül, és hogy az oldott oxigén koncentrációja nem esik 60%-os telítettség alá.

A megfelelő teszt eredmények kiválasztásakor az alkalmazott halfajok természetes életterét kell figyelembe venni. A fenéken élő halak például ugyanolyan víztérfogatnál nagyobb alapterületű akváriumot igényelnek, mint a nyíltvízi halfajok.

1.8.2.5. A halak táplálása

Az akklimatizációs és tesztperiódusok alatt a halakat elegendő mennyiségű, megfelelő típusú, ismert lipid- és összfehérjetartalmú haleledellel kell táplálni. A halak az akklimatizációs és tesztidőszakban naponta kapnak enni, a testtömegük körülbelül 1-2%-ának megfelelő mennyiséget. Ez a legtöbb halfaj esetén a lipidkoncentrációt viszonylag állandó szinten tartja a teszt alatt. A táplálék mennyiségét hetente egyszer újra kiszámítjuk, hogy a testtömeg és a lipidtartalom állandó legyen. Ehhez a számításához az egyes teszt eredményekben levő halak tömege az abból legutóbb kivett halak tömegéből becsülhető meg. A kamrában maradó halakat ne mérjük le.

A teszt eredményekből a maradék eledelt és az ürüléket az etetés után röviddel (30 perc–1 óra) naponta szívócsővel eltávolítjuk. A teszt alatt az edényeket tartsuk a lehető legtisztábban, hogy a szervesanyag-koncentráció a lehető legkisebb legyen, mivel a szerves szén jelenléte korlátozhatja a tesztanyag biológiai elérhetőségét (1).

Miután sok táplálék hallisztból származik, a táplálék tesztanyag-tartalmát is meg kell vizsgálni. A táplálék peszticid- és nehézfém-analízisét is végezzük el.

1.8.2.6. Fény és hőmérséklet

12–16 órás megvilágítás és a fajnak megfelelő hőmérséklet (± 2 °C) fenntartása szükséges (lásd 2. melléklet). A megvilágítás típusát és jellemzőit feljegyezzük. Vegyük figyelembe, hogy a tesztanyag a vizsgálat megvilágítási körülményei között átalakulhat. Olyan megvilágítást alkalmazzunk, hogy a fény hatására nem természetes bomlástermékek lehetőleg ne keletkezzenek. Néhány esetben megfelelő lehet a 290 nm alatti UV-sugárzást kiszűrő ernyő használata.

1.8.2.7. Tesztkoncentrációk

Átfolyási körülmények között legalább két tesztanyag koncentrációt állítunk be. A nagyobb (vagy legnagyobb) tesztanyag-koncentráció általában az akut aszimptotikus LC_{50} -érték kb. 1%-ánál, illetve az analitikai detektálási határnál legalább tízszer nagyobb.

A legnagyobb tesztkoncentráció a megfelelő akut (96 órás)/krónikus LC_{50} -arányal is meghatározható (néhány vegyi anyagra a megfelelő arány 3–100 lehet). Ha lehetséges, a másik koncentráció(ka)t úgy válasszuk meg, hogy a fenti értéktől egy 10-es faktorialább különbözzön. Ha ez nem lehetséges az 1%-os LC_{50} -kritérium és az analitikai detektálási határ miatt, 10-nél kisebb faktor is használható, vagy fontolóra kell venni ^{14}C -gyel jelzett tesztanyag használatát. A tesztanyag oldhatósági határa fölötti koncentrációt nem szabad alkalmazni.

Ha szolubilizáló anyagot használunk, koncentrációja nem lehet nagyobb 0,1 ml/l-nél, és minden teszt eredményben azonos legyen. Ismernünk kell, hogy mennyivel járul hozzá a tesztvíz teljes szerves szén-tartalmához. Azonban ha lehetséges, ne használjunk ilyen anyagokat.

1.8.2.8. Kontrollok

A tesztsorozaton kívül egy hígítóvízes kontrollt, és ha szükséges, egy szolubilizálószer tartalmazó kontrollt is állítunk be. Ha a szolubilizálószer biztosan nincs hatással a halakra, elég csak a hígítóvízes kontrollt beállítani. Ha viszont ez nem áll fenn, mindkét kontrollra szükség van.

1.8.3. A vízminőségmérések gyakorisága

Az oldott oxigént, a TOC-ot, a pH-t és a hőmérsékletet a teszt során minden edényben mérni kell. Teljes keménységet és sótartalmat a kontrollokban (ha szükséges) és a nagyobb (vagy a legnagyobb) koncentrációjú edények egyikében kell csak mérni. Az oldott oxigént és sótartalmat (ha szükséges) minimum háromszor meg kell mérni – a felvételi periódus elején, közepén és végén – és a kiürülési periódusban hetente egyszer. A TOC-ot a teszt kezdetén (a felvételi fázis előtt 24 és 48 órával) a halak behelyezése előtt, a felvételi és a kiürülési fázis alatt pedig legalább hetente egyszer meg kell határozni. Hőmérsékletet naponta, pH-t a periódusok kezdetén és végén, keménységet tesztenként egyszer kell mérni. A hőmérsékletet ajánlott legalább egy edényben folyamatosan mérni.

1.8.4. Hal- és vízminták vétele és analízise

1.8.4.1. A mintavételek száma és ütemezése

A tesztanyag-koncentráció meghatározásához a tesztedényekből a halak bevitele előtt és a felvételi és kiürülési fázis alatt is kell mintát venni. Követelmény, hogy legalább a halmintával egy időben és etetés előtt is vegyünk vízmintát. A felvételi fázis alatt is meg kell határozni a tesztanyag-koncentrációt annak ellenőrzésére, hogy a minőségi kritériumok teljesültek.

A felvételi fázis alatt legalább ötször, a kiürülési fázis alatt legalább négyszer kell halmintát venni. Mivel egyes esetekben ilyen mintaszámok mellett nehéz a BCF értékére megfelelően pontos becslést adni, különösen, ha a kiürülés nem elsőrendű kinetikájú, tanácsos mindkét periódusban gyakrabban mintát venni (lásd 4. melléklet). A plusz minták tárolására és elemzésére csak akkor kerül sor, ha az elemzés első sorozata alapján a BCF nem számítható kellő pontossággal.

Az elfogadható mintavételi ütemtervet a 4. melléklet tartalmazza. Más ütemtervet is könnyen kialakíthatunk oly módon, hogy az n-oktanol/víz megoszlási hányados alapján kiszámítjuk a 95%-os felvételhez tartozó expozíciós időt.

A mintavételezést a felvételi fázisban a stacionárius állapot beálltáig, legfeljebb 28 napig folytatjuk. Ha a stacionárius állapot nem áll be 28 nap alatt, a mintavételezést a stacionárius állapot beálltáig, de legfeljebb 60 napig folytatjuk. A kiürülési fázis megkezdése előtt a halakat tesztanyagot nem tartalmazó hígítón vízbe rakjuk.

1.8.4.2. Mintavételezés és mintakészítés

A vízmintákat az analízishez például kémiailag ellenálló anyagból készült csövön keresztül a tesztkamra középső pontjából vesszük. Mivel a tesztanyag biológiailag nem elérhető részét a biológiailag elérhetőről nem mindig lehet centrifugálással vagy szűréssel elválasztani, (főleg erősen lipofil anyagok esetén, melyek n-oktanol/víz megoszlási hányados logaritmusuk nagyobb, mint 5) (1) (5), lehetőleg ne szűrjük és ne centrifugáljuk a mintát.

Ehelyett inkább tartsuk minél tisztábban a tartályokat, és a teljes szerves szén-tartalmat a felvételi és kiürülési fázis alatt is kísérjük figyelemmel.

Minden mintavételezéskor megfelelő számú halat (legalább négyet) vegyünk ki a tesztkamrákból. A kivett halakat vízzel gyorsan öblítsük le, a felesleges vizet szűrőpapírral itassuk fel, majd elpusztításuk után mérjük le őket.

A lebomlás vagy egyéb veszteségek elkerülésére a halakat és a vizet lehetőleg rögtön mintavételezés után analizáljuk, és a teszt előrehaladtával kiszámítjuk a közelítő felvételi és kiürülési sebességet. Ha az analízist azonnal elvégezzük, elkerülhetjük, hogy túl későn vegyünk észre a stacionárius állapot kialakulását.

Ha az analízist nem tudjuk azonnal elvégezni, a mintákat megfelelő körülmények között tároljuk. A vizsgálat kezdete előtt tájékozódni kell a tesztanyagok tárolásának körülményeiről – például mélyhűtés, 4 °C-on tartás, eltarthatósági idő, extrakció szükségessége stb.

1.8.4.3. Az analitikai módszer validitása

Mivel az egész teszt eredményét alapvetően a tesztanyagra alkalmazott analitikai módszer pontossága és érzékenysége határozza meg, kísérletileg ellenőrizni kell a kémiai analízis pontosságát és reprodukálhatóságát, valamint a tesztanyag vízből és halakból való visszanyerésének hatékonyságát. Ugyanezzel a módszerrel ellenőrizzük, hogy a hígítón víz valóban nem tartalmaz kimutatható mennyiségű tesztanyagot.

A C_v és a C_h tesztből kapott értékét – szükség esetén – az anyag visszanyerési hatékonyságával és a kontrollok háttérértékével korrigáljuk. A hal- és vízmintákat végig úgy kell kezelni, hogy minimális legyen a szennyezés és a (pl. a mintavevő eszköz adszorpciójából eredő) veszteség.

1.8.4.4. A halminták analízise

Ha a tesztben radioaktívan jelzett anyagokat használunk, mérhetjük az össz-radioaktivitást (vagyis a kiindulási vegyületét és metabolitokét együttesen), illetve megtisztíthatjuk a mintákat úgy, hogy a kiindulási vegyület külön analizálható legyen. A fő metabolitokat stacionárius állapotban vagy a felvételi fázis végén (amelyik előbb bekövetkezik) szintén jellemezhetjük. Ha az összes mért radioaktivitás százalékában kifejezett BCF nagyobb, mint 1000%, illetve ha peszticideket vizsgálunk, ajánlott a stacionárius állapotban a halszövetekben 10%-nál nagyobb mennyiségben jelen levő bomlástermékeket azonosítani és kvantifikálni. Ha ezt a meghatározást elvégeztük a halszövetekből, végezzük el a vízből is.

A tesztanyag koncentrációját rendszerint minden egyes kivett halban meghatározzuk. Ha ez nem lehetséges, az egyes alkalmakkor vett mintákat egyesíthetjük is, de ez szűkíti majd az adatokra alkalmazható statisztikai eljárások körét. Ha a statisztikai eljárás megkívánja, akkor a kívánt egyesítési eljárást és az ehhez szükséges halak számát a tesztmódszerben rögzíteni kell (6) (7).

A BCF-ot a teljes nedves tömeg függvényeként, és az erősen lipofil anyagokra a lipidtartalom függvényeként is ki kell fejezni. A halak lipidtartalmát, ha lehetséges, minden mintavételi alkalommal meg kell határozni. A lipidtartalom meghatározására megfelelő módszereket kell alkalmazni (3. melléklet, 8. és 2. hivatkozás). Szabvány módszerként a kloroform/metanol extrakciós technikát ajánlják (9). A különböző módszerek nem adnak azonos értékeket (10), ezért fontos megadni a használt módszer részletes leírását is. Ha lehetséges, a lipidtartalom meghatározását a tesztanyag analíziséhez készített azonos extraktumon célszerű elvégezni, mert a lipideket gyakran el kell távolítani az extraktumból, mielőtt kromatográfiásan elemezhetők lennének. A hal lipidtartalma (mg/kg nedves tömeg) a kísérlet végén nem térhet el a kezdeti értéktől $\pm 25\%$ -nál nagyobb mértékben. A szövetek százalékos szárazanyag-tartalmát szintén meg kell határozni, hogy a lipidkoncentráció átváltható legyen a nedves alapon mértről a száraz alapra.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

A tesztanyag felvételi görbéjét úgy kapjuk meg, ha a felvételi fázisban a halban/-on (vagy meghatározott szövetben/-en) mért tesztanyag-koncentrációt az idő függvényében, aritmetikus skálán ábrázoljuk. Ha a görbe platót ér el, vagyis nagyjából párhuzamos az időtengellyel, a stacionárius BCF_{SS} a következő képlet alapján számítható ki:

$$\frac{C_h \text{ stacionárius állapotban (átlag)}}{C_v \text{ stacionárius állapotban (átlag)}}$$

Ha a stacionárius állapotot nem értük el, a BCF_S megfelelő pontossággal kiszámolható az egyensúlyi érték 80%-ánál ($1,6/k_2$) vagy 95%-ánál ($3,0/k_2$) is.

A koncentrációs faktort (BCF_k) is meghatározzuk a két elsőrendű kinetikai állandó, a k_1 és a k_2 arányaként. A kiürülési sebességi állandót (k_2) rendszerint a kiürülési görbe (a tesztanyag koncentrációjának csökkenése a halban, az idő függvényében) alapján határozzuk meg. A felvételi sebességi állandó (k_1) ezután kiszámolható az adott k_2 és a C_h egy, a felvételi görbéből levezetett értékéből (lásd az 5. mellékletet). A BCF_k és a k_1 , k_2 sebességi állandók kiszámításának megfelelő módszere a számítógéppel végzett nem lineáris paraméterbecslés (11). A k_1 és a k_2 értékét grafikusán is kiszámíthatjuk. Ha a kiürülési görbe nyilvánvalóan nem elsőrendű, összetettebb modelleket alkalmazunk (lásd a 3. melléklet hivatkozásait), és kérjük ki a biostatistikus tanácsát.

2.2. Az eredmények értékelése

Ha a tesztoldatok koncentrációi a kimutathatóság határához közel állnak, az eredmények értékelésekor körültekintően járjunk el.

Ha a felvételi és kiürülési görbe jól kirajzolódik, az azt jelzi, hogy a biokoncentrációs adatok is megbízhatóak. A két tesztkoncentrációnál a felvételi/kiürülési állandók ingadozásának 20% alatt kell lennie. Ha a két alkalmazott tesztkoncentráció felvételi/kiürülési sebessége között jelentős különbség áll fenn, ezt jegyzőkönyvezni kell, és meg kell adni rá a lehetséges magyarázatokat. A jól megtervezett vizsgálatokból kapott BCF-ok konfidenciahatára általában megközelíti a $\pm 20\%$ -ot.

3. AZ EREDMÉNYEK MEGADÁSA

A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

3.1. Tesztanyag:

- fizikai tulajdonságok, és ahol szükséges, fizikokémiai tulajdonságok,
- kémiai jellemzők (a szerves szén-tartalmat is beleértve, ha szükséges),
- ha az anyag radioaktívan jelzett, a jelzett atom(ok) pontos helyzete és a szennyezőkhöz kapcsolódó radioaktivitás százalékos aránya.

3.2. Tesztfajok:

- tudományos név, törzs, származás, mindenfajta előkezelés, az akklimatizálás körülményei, kor, mérettartomány stb.

3.3. Tesztkörülmények:

- használt teszteljárás (pl. átfolyásos vagy félstatikus),
- a használt megvilágítás típusa, jellemzői és időtartama,
- a teszt végrehajtása (pl. a tesztedények száma és mérete, a teljes víztérfogat kicserélődésének ideje, a párhuzamos minták száma, a halak száma mintánként, a tesztkoncentrációk száma, a felvételi és a kiürülési fázis hossza, hal- és vízminták mintavételi gyakorisága),

- a törzsolatok előállításának módszere és az újrakészítés gyakorisága (ha használtunk szolubilizálószeret, adjuk meg a koncentrációját és azt is, hogy a tesztvíz szerves szén-tartalmához mennyiben járult hozzá),
- a névleges koncentrációk, a tesztedényekben mért koncentrációértékek átlaga, ezek standard deviációja, és a kiszámítás módszere,
- a hígítóvíz eredete, bármilyen előkezelésének leírása, minden olyan eredmény, amely igazolja, hogy a hígítóvíz megfelel a tesztal igényeinek; ezenkívül a hígítóvíz jellemzői: pH, keménység, hőmérséklet, oldottóxigén-koncentráció, maradék klór (ha mértük), összes szerves szén, lebegőanyag, a tesztközeg sótartalma (ha szükséges), és bármilyen egyéb elvégzett mérés,
 - vízminőség a tesztedényekben, pH, keménység, TOC, hőmérséklet és oldottóxigén-koncentráció,
 - részletes információk a halak táplálásáról (például a táplálék típusa, eredete, összetétele – legalább a lipid- és fehérjetartalmát adjuk meg, és ha lehetséges, az etetések számát és az adott eledel mennyiségét is),
 - a hal- és vízminták kezelése, beleértve a mintavételezés részleteit, tárolást, extrakciót és analitikai eljárásokat (és azok pontosságát) a tesztanyagra és a lipidtartalomra (ha mértük) vonatkozóan.

3.4. Eredmények:

- minden elvégzett előzetes vizsgálat eredménye,
- a kontroll halak és az egyes tesztedényben lévő halak mortalitása, és bármely megfigyelt abnormális viselkedés,
 - a halak lipidtartalma (ha meghatároztuk),
 - a halakban a tesztanyag felvételét és kiürülését mutató görbék (minden mért adatot feltüntetve), és a stacionárius állapotig eltelt idő,
 - C_h és C_v (standard deviációval és tartománnyal, ha szükséges) minden mintavételi időpontban (a C_h $\mu\text{g/g}$ a teljes nedves testtömeg vagy meghatározott szövetei, pl. a lipid tömegére vonatkoztatva (ppm), és a C_v $\mu\text{g/ml}$ -ben (ppm). A kontrollsorozat C_v -értékei és a háttérszennyeződés,
 - a stacionárius biokoncentrációs tényező (BCF_{SS}) és/vagy a kinetikus biokoncentrációs tényező (BCF_k), és ha lehetséges, a felvételi és kiürülési sebességi állandók 95%-os konfidenciahatárai (mindezeket az állat teljes tömegére, vagy meghatározott szöveteire, illetve – ha mértük – a teljes lipidtartalomra vonatkoztatva kell megadni), minden használt tesztkoncentrációnál a konfidenciahatárok és standard deviációk (ahogy megfelelőbb), és a számítás/adatelemzés módszerei,
 - hol használtunk radioaktívan jelzett anyagokat, és ha szükséges, bármely kimutatott metabolitjának akkumulációs adatait is meg lehet adni,
 - bármilyen szokatlan dolog a teszttel kapcsolatban, bármilyen eltérés ezektől az eljárásoktól, és bármely más fontos információ.

Előzetes módszerfejlesztéssel, illetve kísérlettervezéssel minimalizáljuk a „detektálási határon belül nem mérhető” eredmények számát, mert azok nem használhatók sebességi állandók számításához.

4. IRODALOMJEGYZÉK

- (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-R-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(1). *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 lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation*. *Envir. Toxicol. Chem.* 10, pp 1431-1436

(11)CEC, *Bioconcentration of chemical substances in fish: the flo-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.

1. melléklet

Egy megfelelő hígítóvíz kémiai jellemzői

	Anyag	Határérték
1	Lebegőanyag	5 mg/l
2	Összes szerves szén	2 mg/l
3	Nem ionizált formájú ammónia	1 µg/l
4	Maradék klór	10 µg/l
5	Szerves foszfortartalmú peszticidek	50 ng/l
6	Szerves klórtartalmú peszticidek + poliklórozott bifenilek	50 ng/l
7	Összes szerves klór	25 ng/l
8	Alumínium	1 µg/l
9	Arzén	1 µg/l
10	Króm	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Réz	1 µg/l
13	Vas	1 µg/l
14	Ólom	1 µg/l
15	Nikkel	1 µg/l
16	Cink	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Higany	100 ng/l
19	Ezüst	100 ng/l

2. melléklet

Tesztelésre javasolt halfajok

	Ajánlott fajok	Ajánlott hőmérséklet-tartomány (°C)	A teszttalatok ajánlott teljes hossza (cm)
1	<i>Danio rerio</i> ¹ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) – Zebradánió	20–25	3,0 ±0,5
2	<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) – Nagyfejű fűrge cselle (amerikai cselle)	20–25	5,0 ±2,0
3	<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) – Közönséges ponty	20–25	5,0 ±3,0
4	<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck és Schlegel) – Japán fogasponty (rizsszemű fogasponty)	20–25	4,0 ±1,0
5	<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) – Guppi	20–25	3,0 ±1,0
6	<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) – Kék naphal (kékkopoltyújú naphal)	20–25	5,0 ±2,0
7	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) – Szivárványos pisztráng	13–17	8,0 ±4,0
8	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) – Háromtüskés pikó	18–20	3,0 ±1,0

¹ Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

Egyes országokban egyéb, torkolati és tengeri fajokat is használnak, például:

<i>Leiostomus xanthurus</i>	(nincs magyar neve)
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Tarka fogasponty
<i>Menidia beryllina</i>	(nincs magyar neve)
<i>Cymatogaster aggregata</i>	Fövényhal
<i>Parophrys vertulus</i>	Angol nyelvhal
<i>Leptocottus armatus</i>	(nincs magyar neve)
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Háromtüskés pikó
<i>Dicentracus labrax</i>	Tengeri süllő
<i>Alburnus alburnus</i>	Szélhajtó küsz

A halak beszerzése

A táblázatban felsorolt édesvízi halak könnyen tenyésztethetők és/vagy könnyen beszerezhetők egész évben, míg a tengeri és torkolati fajok beszerezhetősége adott országokra korlátozódik. A fent felsorolt halfajok halastóban vagy laboratóriumban is (betegségek és paraziták szempontjából ellenőrzött körülmények között) tenyésztethetők. Célszerű tenyészetekből származó tesztalakat alkalmazni, mivel ezek egészségi állapota és származása is ismert, és a világ számos részén könnyen beszerezhetők.

3. melléklet

A felvételi és kiürülési fázis időtartamának meghatározása

1. A felvételi fázis időtartamának meghatározása

A teszt elvégzése előtt a k_2 , és így a stacionárius állapot eléréséhez szükséges idő néhány százalékos hibával megbecsülhető a k_2 és az n -oktanol/víz megoszlási együttható (K_{ow}), vagy a k_2 és a vízben való oldhatóság (s) tapasztalati összefüggéséből.

A k_2 becült értékét (nap^{-1}) megkaphatjuk például a következő tapasztalati összefüggésből (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10} (K_{ov}) + 1,47 \quad (r^2 = 0,95) \quad (1. \text{ egyenlet})$$

Egyéb összefüggéseket lásd a 2. hivatkozásban.

Ha a megoszlási hányados (K_{ow}) nem ismert, az anyag vízben való oldhatóságából (s) is számolhatunk (3):

$$\log_{10} K_{ow} = 0,862 \log_{10} (s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,944) \quad (2. \text{ egyenlet})$$

ahol s = oldhatóság (mol/l-ben): ($n = 36$).

Ezek az összefüggések csak 2 és 6,5 közé eső $\log K_{ow}$ -értékkel rendelkező anyagokra alkalmazhatók (4).

A k_2 -becslés felhasználásával, a felvételt és a kiürülést leíró általános kinetikai egyenletből (elsőrendű kinetika) megkaphatjuk a stacionárius állapot néhány százalékának eléréséhez szükséges időt:

$$\frac{dC_h}{dt} = k_1 C_v - k_2 C_h$$

vagy ha C_v állandó:

$$C_h = \frac{k_1}{k_2} C_v (1 - e^{-k_2 t}) \quad (3. \text{ egyenlet})$$

Ha közeledünk a stacionárius állapothoz ($t \rightarrow \infty$), a 3. egyenlet egyszerűsíthető (5) (6):

$$C_h = \frac{k_1}{k_2} C_v \quad \text{vagy} \quad C_h / C_v = k_1 / k_2 = BCF$$

Ekkor $k_1/k_2 \cdot C_v$ a stacionárius állapotnál a halakban mérhető koncentráció közelítése ($C_{h,s}$).

A 3. egyenlet átírható:

$$C_h = C_{h,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{vagy} \quad \frac{C_h}{C_v} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (4. \text{ egyenlet})$$

A 4. egyenlet alkalmazásával megjósolható a stacionárius állapot néhány százalékának eléréséhez szükséges idő, ha k_2 -t már becültük az 1. vagy 2. egyenlet felhasználásával.

Iránymutatóként: statisztikailag elfogadható adatok (BCF_k) előállításához a felvételi fázis statisztikailag optimális időtartama az a periódus, ami ahhoz szükséges, hogy a halban mérhető tesztanyag-koncentráció logaritmusának görbéje lineáris időskálán felrajzolva elérje a felezőpontját, vagy $1,6/k_2$ -t, vagy a stacionárius állapot 80%-át, de ne legyen nagyobb $3,0/k_2$ -nél, illetve a stacionárius állapot 95%-ánál (7).

A stacionárius állapot 80%-ának eléréséhez szükséges idő (4. egyenlet):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{vagy} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (5. \text{ egyenlet})$$

A 95%-os stacionárius állapot hasonlóan:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (6. \text{ egyenlet})$$

Például $\log K_{ow} = 4$ -es testanyagra a felvételi fázis (ff) időtartama (az 1., 5. és 6. egyenletet használva):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0,414 \cdot (4) + 1,47 & k_2 &= 0,652 \text{ nap}^{-1} \\ \text{ff (80\%)} &= 1,6 / 0,652, \text{ azaz } 2,45 \text{ nap (59 óra)} \\ \text{vagy ff (95\%)} &= 3,0 / 0,652, \text{ azaz } 4,60 \text{ nap (110 óra)} \end{aligned}$$

Hasonlóan, egy $s = 10^{-5}$ mol/l ($\log(s) = 5,0$) testanyagra az ff időtartama (az 1., 2., 5. és 6. egyenletet használva):

$$\begin{aligned} \log_{10}(K_{ow}) &= -0,862(-5,0) + 0,710 = 5,02 \\ \log_{10} k_2 &= -0,414(5,02) + 1,47 \\ k_2 &= 0,246 \text{ nap}^{-1} \\ \text{ff (80\%)} &= 1,6 / 0,246, \text{ azaz } 6,5 \text{ nap (156 óra)} \\ \text{vagy ff (95\%)} &= 3,0 / 0,246, \text{ azaz } 12,2 \text{ nap (293 óra)} \end{aligned}$$

Ezenkívül

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} K_{ow} + 55,31 \text{ (óra)}$$

kifejezés használható az effektív stacionárius állapot eléréséhez szükséges idő kiszámolására (4).

2. Előrejelzés a kiürülési fázis időtartamára

A test anyagterhelésének a kezdeti koncentráció néhány százalékára való csökkenéséhez szükséges idő a felvételi és kiürülési periódust leíró általános egyenlet alapján (elsőrendű kinetika) előrejelezhető (1) (8).

A kiürülési fázisban feltételezzük, hogy a C_v nulla. Az egyenlet egyszerűsíthető:

$$\frac{dC_h}{dt} = -k_2 C_h \quad \text{vagy} \quad C_h = C_{h,0} e^{-k_2 t}$$

ahol $C_{h,0}$ a koncentráció a kiürülési fázis kezdetén. Az 50%-os kiürülést a t_{50} időpontban érjük el:

$$\frac{C_h}{C_{h,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{vagy} \quad t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Hasonlóan, a 95%-os kiürülés elérésének időpontja:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ha 80%-os felvétellel számoltunk a felvételi periódusban ($1,6/k_2$), és 95%-os kiürüléssel a kiürülési fázisban ($3,0/k_2$), akkor a kiürülési fázis körülbelül kétszer hosszabb a felvételi fázisnál.

Fontos megjegyezni azonban, hogy a becslések azon a feltevésen alapulnak, hogy a felvételi és kiürülési mintázat elsőrendű kinetikát követ. Ha a kinetika nyilvánvalóan nem elsőrendű, összetettebb modellt kell alkalmazni [pl. (1) hivatkozás].

IRODALOM (a 3. mellékleté)

- (1) Spacie A. and Hamelink J. L. (1982): *Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish*. Environ. Toxicol. and Chem. 1, pp. 309-320.
- (2) Kristensen P. (1991). *Bioconcentration in fish: comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals*. Danish Water Quality Institute.
- (3) Chiou C. T. and Schmedding D. W. (1982): *Partitioning of organic compounds in octanol-water systems*. Environ. Sci. Technol. 16 (1), pp. 4-10.

(4) Hawker D. W. and Connell D. W. (1988): *Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish*. Wat. Res. 22 (6), pp. 701-707.

(5) Branson D. R., Blau G. E., Alexander H. C. and Neely W. B. (1975): *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), pp. 785-792.

(6) Ernst W. (1985): *Accumulation in Aquatic organisms*. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P. H. Part 4.4, pp. 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.

(7) Reilly P. M., Bajramovic R., Blau G. E., Branson D. R. and Sauerhoff M. W. (1977): *Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models*, Can. J. Chem. Eng. 55, pp. 614-622.

(8) Könemann H. and Van Leuween K. (1980): *Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies*. Chemosphere, 9, pp. 3-19.

4. melléklet

Elméleti példa biokoncentrációs tesztek mintavételezési ütemtervére $\log K_{ow} = 4$ anyagokra

Halminták	Mintavételek		Vízminék száma	Halak száma mintánként
	Minimális mintavételi gyakoriság (nap)	További mintavételek		
Felvételi fázis	-1 0		2* 2	Kiindulási mennyiség: 45-80 db
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Kiürülési fázis				A halakat áttesszük tesztanyagmentes vízbe
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

*A vízmintát minimum három teljes térfogatcsere után kell venni.

A zárójeles értékek a minták (víz, hal) számát jelentik, ha plusz mintákat is vettünk.

Figyelem! A k_2 teszt előtti becslése 4,0-ás $\log K_{ow}$ -re 0,652 nap⁻¹. A kísérlet teljes időtartama $3 \times ff = 3 \times 4,6$ nap, azaz 14 nap. A „ff” becslését lásd. a 3. mellékletben.

5. melléklet

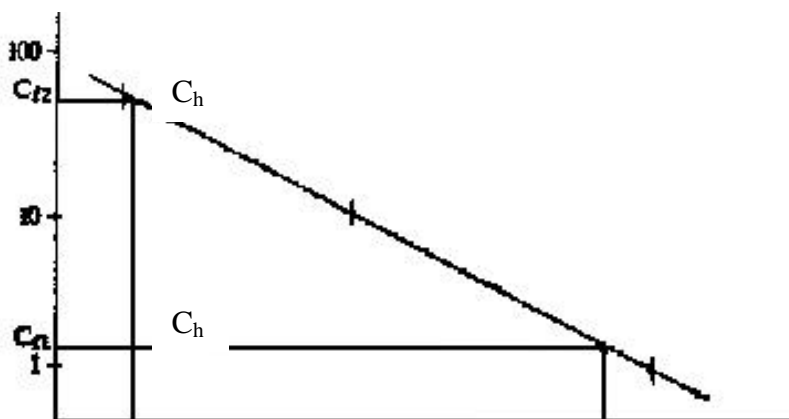
A megfelelő modell kiválasztása

A legtöbb biokoncentrációs adatról feltételezzük, hogy jól leírhatók egy egyszerű, kétváltozós modellel, amely a kiürülési fázisban (féllogaritmusos papíron ábrázolva) a halakban mérhető koncentrációk pontjaira illeszthető egyenest ad. (Ha ezekre a pontokra nem illeszthető egyenes, összetettebb modellt kell alkalmazni, lásd például 3. melléklet, 1. hivatkozás).

Grafikus módszer a k_2 kiürülési sebességi állandó meghatározására

Az egyes halmintákban talált testanyag-koncentrációt a mintavételezési idő függvényében féllogaritmusos papíron ábrázoljuk. Az egyenes meredeksége k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{h_1}/C_{h_2})}{t_2 - t_1}$$



Jegyezzük meg, hogy az egyenestől való eltérések elsőrendű kinetikánál összetettebb kiürülési mintázatot jelezhetnek. Az elsőrendű kinetikától eltérő kiürülési típusok meghatározására grafikus módszert alkalmazunk.

Grafikus módszer a k_1 felvételi sebességi állandó meghatározására

Ha k_2 adott, k_1 -et így számoljuk:

$$k_1 = \frac{C_h k_2}{C_v (1 - e^{-k_2 t})} \quad (1. \text{ egyenlet})$$

A log koncentrációt az idő függvényében (aritmetikus skálán) ábrázolva nyert szabályos felvételi görbe felezőpontjából olvassuk le C_h értékét.

Számítógépes módszer a felvételi és a kiürülési sebességi állandó számítására

A biokoncentrációs tényező és a k_1 és k_2 sebességi állandó kiszámításának kedvelt módszere a nem-lineáris paraméterbecslés számítógép segítségével. Ezek a programok k_1 és k_2 értékét az egymást követő idő/koncentráció adatokból a következő modell alapján számítják ki:

$$C_h = C_v \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (2. \text{ egyenlet})$$

$$C_h = C_v \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \quad (3. \text{ egyenlet})$$

ahol t_c = idő a felvételi fázis végén.

Ez a megközelítés a k_1 és k_2 standard deviációjára ad becslést.

Mivel k_2 legtöbbször viszonylag nagy pontossággal becsülhető a kiürülési görbéből, és mert erős korreláció van k_1 és k_2 paraméter között, ha egyidejűleg becsüljük őket, tanácsos lehet először csak a kiürülési adatokból kiszámolni k_2 -t, és ezt követően nem-lineáris regresszióval a felvételi adatokból kiszámolni a k_1 -et.

C.14. HALIVADÉK-NÖVEKEDÉSI TESZT

1. MÓDSZER

Ez a toxicitási teszt módszer megegyezik az OECD TG 215 (2000) módszerrel.

1.1. Bevezetés

A teszt célja a különböző vegyi anyagoknak hosszú időtartamú expozíció során az ivadékhalak növekedésére gyakorolt hatásának vizsgálata. A módszert az Európai Unió területén dolgozták ki, és alkalmazását körvizsgálattal (1) (3), átfolyásos rendszerben ellenőrizték a kémiai anyagok szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) ivadékhalak növekedésére kifejtett hatásának vizsgálatára. Más jól dokumentált halfajok is használhatók. Végeztek már növekedési tesztet például zebrahalal (*Danio rerio*) (2) (4) (5) és is (6) (7) (8).

Lásd még a C rész Általános bevezetés című fejezetét! medakával (*Oryzias latipes*)

1.2. Definíciók

A legkisebb, megfigyelhető hatást kiváltó koncentráció (LOEC): a tesztanyagnak az a legkisebb vizsgált koncentrációja, amely a tesztorganizmokra a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0,05$ -nél) szignifikáns hatást fejt ki. A LOEC feletti összes tesztkoncentrációnak a LOEC esetében megfigyelhető hatással megegyező, vagy annál erősebb károsító hatást kell kifejtenie.

Hatástalan koncentráció (NOEC): közvetlenül a LOEC alatti tesztkoncentráció.

EC_x: a tesztanyag azon koncentrációja, amely a tesztorganizm növekedési rátáját a kontrollhoz viszonyítva x%-kal megváltoztatja.

Betelepítési arány: a halak nedves tömege a víz térfogatára vonatkoztatva.

Betelepítési sűrűség: a halak száma a víz térfogatára vonatkoztatva.

Egyedi specifikus növekedési ráta: egy egyednek a kezdeti tömegére vonatkoztatott növekedési aránya.

Átlagos specifikus növekedési ráta: az egy tesztanyag-koncentrációnál, egy tartályban levő halak növekedési rátájának átlaga.

Pszudospecifikus növekedési ráta: az egyedi növekedési ráta értéke az egy tartályban levő halak kezdeti átlagos tömegéhez viszonyítva.

1.3. A módszer elve

Az exponenciális növekedés fázisában levő halakat tömegük megmérése után átfolyásos vagy félstatikus körülmények között, a tesztanyag különböző, szubletális koncentrációjú vizes oldatait tartalmazó tesztkamrákban tartjuk. A teszt időtartama 28 nap. A halakat naponta etetjük. A naponta szükséges táp mennyiségét a halak kezdeti tömege alapján határozzuk meg; ez 14 nap után megismételhető. A teszt végén a halak tömegét újra megmérjük. A kifejtett hatás vizsgálatára regressziós modellt használunk, melynek segítségével megbecsülhető, hogy milyen tesztanyag-koncentrációk okoznak x%-os változást (EC_x) a növekedésben. Másik lehetőség az adatoknak a kontroll értékeihez történő viszonyítása, így meghatározható a legkisebb megfigyelhető hatást kiváltó koncentráció (LOEC), illetve a hatástalan koncentráció (NOEC).

1.4. A tesztanyagra vonatkozó információk

A növekedési teszthez kiválasztott halfajjal végzett akut toxicitási teszt (lásd a C.1 módszert) eredményei – lehetőség szerint – rendelkezésre kell hogy álljanak. Ez azt is feltételezi, hogy az anyag vízoldhatóságára, gőznyomására vonatkozó adatok ismertek, és rendelkezésre áll egy olyan, a tesztoldatokból az anyag mennyiségi meghatározására alkalmas, megbízható analitikai módszer, melynek pontossága és a detektálási határa is ismert.

További hasznos információk: az anyag szerkezeti képlete, tisztasága, stabilitási adatai vízben és megvilágítás mellett, pK_a és P_{ow} értékei, illetve egy gyors biológiai lebonthatósági teszt eredményei (lásd a C.4 módszert).

1.5. A teszt érvényessége

A teszt csak abban az esetben érvényes, ha az alábbi feltételek teljesülnek:

- a teszt végén a kontroll(ok) mortalitása nem haladhatja meg a 10%-ot,
- a kontroll halak tömegnövekedésének legalább olyan mértékűnek kell lennie, hogy a növekedésben bekövetkező szignifikánsnak számító változások észlelhetőek legyenek. Egy körvizsgálatban (3) kimutatták, hogy a szivárványos pisztráng esetében a kontroll halak átlagos tömegnövekedése 28 nap alatt el kell, hogy érje a kiindulási tömeg 50%-át; például ha a kiindulási tömeg: 1 g/hal (= 100%), akkor 28 nap után: $\geq 1,5$ g/hal ($\geq 150\%$),
- az oldottoxigén-koncentrációnak az egész teszt folyamán el kell érnie a levegőteltettségi érték 60%-át,
- a tartályok hőmérséklete az egész teszt folyamán nem különbözhet egymástól ± 1 °C-nál nagyobb mértékben, és a halfajnak megfelelő hőmérsékleti tartományban ± 2 °C (lásd az 1. mellékletet) kell lennie.

1.6. A teszt módszer leírása

1.6.1. Eszközök

Általános laboratóriumi eszközök, ezek közül kiemelten a következők:

- a) oxigén- és pH-mérő,
- b) a víz keménységének és lúgosságának meghatározására alkalmas eszközök,
- c) a hőmérséklet ellenőrzésére, lehetőleg folyamatos monitorozására alkalmas berendezés,
- d) a betelepítési aránynak és a betelepítési sűrűségnek megfelelő térfogatú (lásd az 1.8.5. részt és az 1. mellékletet), kémiaiailag inert anyagból készült tartályok,
- e) megfelelő pontosságú ($\pm 0,5\%$) mérleg.

1.6.2. A hígítóvíz

Tesztvízként bármilyen típusú víz használható, amelyben biztosított a teszthalak hosszú távú túlélése és növekedése. A víznek a teszt időtartama alatt állandó minőségűnek kell lennie. A víz pH-ja a 6,5–8,5 tartományban legyen, és egy teszten belül $\pm 0,5$ pH egységénél nagyobb mértékben nem változhat. 140 mg/l feletti vízkeménység (CaCO₃-ban kifejezve) javasolt. Annak biztosítása érdekében, hogy a víz összetétele ne befolyásolja hátrányosan a teszt eredményét (például mert komplexet képez a tesztanyaggal), a vízből időközönként kémiai analízisre mintát kell venni. A hígítóvízből a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a főbb anionok és kationok (pl. Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻ és SO₄²⁻), a peszticidek (szerves foszfor- és klórtartalmú peszticidek), az összes szerves szén és a lebegőanyag mennyiségének meghatározását – ha a víz minősége ismertén viszonylag állandó – például háromhavonta kell elvégezni. Ha a víz minősége legalább egy éven keresztül bizonyítottan állandó, a meghatározásokat nagyobb időközönként is lehet végezni, például félévenként. Egy megfelelő hígítóvíz néhány kémiai tulajdonságát foglalja össze a 2. melléklet.

1.6.3. A tesztoldatok

A kiválasztott koncentrációjú tesztoldatokat törzsoldatból, hígítással készítjük.

A törzsoldatot lehetőleg úgy készítjük, hogy a tesztanyagot mechanikai úton (pl. keveréssel vagy ultrahangos kezeléssel) a hígítóvízben eloszlatjuk. Telítési oszlopokat (oldási oszlop) is lehet használni a megfelelő töménységű törzsoldat készítéséhez.

A megfelelő töménységű törzsoldat készítéséhez bizonyos esetekben szükség lehet oldószerekre, oldást segítő vagy diszpergálószerekre is. Megfelelő oldószer például az acetone, az etanol, a metanol, a dimetil-szulfoxid, a dimetil-formamid és a trietilén-glikol. Megfelelő diszpergálószerek a Cremophor RH40, a Tween 80, a 0,01%-os metilcellulóz-oldat és a HCO-40. Biológiaiilag gyorsan lebomló, illetve erősen illékony anyagok (pl. acetone) alkalmazása esetén körültekintően kell eljárni, mivel ezek az anyagok a baktériumok elszaporodása miatt átfolyós rendszerben problémát okozhatnak. Ha oldást segítő anyagokat használunk, egy, csak az oldószert tartalmazó kontroll segítségével ellenőrizni kell, hogy az alkalmazott anyag a halak életére és növekedésére észlelhető káros hatást nem fejt ki.

Az átfolyós tesztek kivitelezéséhez szükség van egy olyan rendszerre, amely folyamatosan hígítja és a tartályokba adagolja a megfelelő koncentrációjú tesztoldatokat (pl. mérőpumpa, proporcionális hígító, telítő rendszer). A törzsoldat és a hígítóvíz áramlási sebességét időközönként ellenőrizni kell, lehetőleg naponta, és értéke nem változhat 10%-nál nagyobb mértékben a teszt során. Egy körvizsgálatban (3) kimutatták, hogy szivárványos pisztráng esetében a megfelelő vízcserélődési sebesség 6 liter/g hal/nap (lásd az 1.8.2.2. részt).

A félstatikus tesztek esetében a médium cserélődésének sebessége a tesztanyag stabilitásától függ, de javasolt naponta a teljes vízmennyiséget lecserélni. Ha – az előzetes stabilitási tesztek alapján – a tesztanyag stabilitása a vízcserék között eltelt időszak során nem állandó (pl. a tesztanyag koncentrációja a névleges koncentráció $\pm 20\%$ tartományon kívüli, illetve a kezdeti mért koncentráció 80%-a alá esik) a tesztelést célszerű inkább átfolyós rendszerben végezni.

1.6.4. A halfajok kiválasztása

A teszthez javasolt halfaj a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*), mivel a legtöbb tapasztalat – a körvizsgálat alapján – erről a fajról áll rendelkezésre (1) (3). Más, jól dokumentált fajok is alkalmazhatók, de a teszt körülményeit a faj igényeihez kell igazítani. Például zebrahallal (*Danio rerio*) (4) (5) és medakával (*Oryzias latipes*) is végeztek már ilyen tesztek (6) (7) (8). A faj és a kísérleti módszer kiválasztásának indoklását a jegyzőkönyvbe bele kell foglalni.

1.6.5. A halak tartása

A teszthalakat egyetlen tenyészet lehetőleg azonos ívásból származó egyedeiből kell kiválasztani. A halakat a tesztet megelőzően legalább két héttel a teszt körülményeivel azonos minőségű vízben és megvilágítás mellett kell tartani. Általában naponta a testtömegük 2%-ának megfelelő mennyiségű táppal kell etetni őket, de a kétételes tartási periódus és a teszt időtartama alatt naponta a testtömeg 4%-ának megfelelő mennyiségű táplálékot kell adni.

A halak behozatala utáni első 48 óra elteltével az elpusztult egyedek számát feljegyezzük, és a következő kritériumokat alkalmazzuk:

- ha a mortalitás hét nap alatt meghaladja a 10%-ot: az állomány tesztelésre nem használható,
- ha a populáció 5–10%-a pusztul el: a halakat további hét napig a laboratóriumban tartjuk; ha a mortalitás a második hét során meghaladja az 5%-ot: az állomány tesztelésre nem használható,
- ha a populáció egyedeinek kevesebb, mint 5%-a pusztul el: az állomány felhasználható.

A halak nem kaphatnak betegség elleni kezelést a tesztet megelőző két hétben, illetve a teszt során.

1.7. A teszt tervezése

A „teszt tervezése” a koncentrációk számának és távolságának megválasztását, az egy koncentrációhoz tartozó tartályok számának és a halak tartályonkénti számának meghatározását jelenti. A tesztet az alábbiak figyelembevételével kell megtervezni:

- a teszt célja,
- az alkalmazandó statisztikai módszer,
- a teszthez szükséges anyagok beszerezhetősége és ára.

A cél meghatározásának magában kell foglalnia, hogy az alkalmazandó statisztikai módszernek megfelelően milyen nagyságrendű különbség (pl. a növekedési rátában) észlelésére van szükség, illetve (másik lehetőségként) azt, hogy milyen pontossággal kívánjuk az EC_x értékét (pl. $x = 10, 20$ vagy 30 , de lehetőleg nem kisebb, mint 10) meghatározni. Enélkül a teszt mérete nem szabható meg előre.

Fontos figyelembe venni azt, hogy az a tervezési mód, amely egy adott statisztikai módszer alkalmazása esetén optimális (azaz lehetővé teszi a források hatékony felhasználását), nem feltétlenül optimális egy másik módszer alkalmazása esetén. Ebből következik, hogy a LOEC/NOEC becsléséhez és a regressziós módszerhez is másféle tervet célszerű alkalmazni.

A legtöbb esetben a regressziós analízist előnyben részesítik a varianciaanalízissel szemben, melynek okait Stephan és Rogers tárgyalja (9). Abban az esetben, ha nincs megfelelő regressziós modell ($r^2 < 0,9$), akkor a NOEC/LOEC-becslési módszert kell alkalmazni.

1.7.1. A teszt tervezése regressziós analízis esetében

A teszt tervezésével kapcsolatos főbb megfontolások:

a) A választott teszt koncentrációknak le kell fedniük az effektív koncentráció tartományt (pl. $EC_{10, 20, 30}$), illetve azt a tartományt, amelyben a tesztanyag hatását értékelni szükséges. A lehető legpontosabb becslést úgy adhatjuk, ha a hatásos koncentrációk a választott koncentráció tartomány közepére esnek.

b) A megfelelő statisztikai modellezéshez szükség van legalább egy kontroll tartályra és ezen kívül öt, különböző koncentrációjú tesztoldatot tartalmazó tartályra. Ha a tesztanyag oldását segítő anyagot is alkalmaztunk, a tesztoldatokkal párhuzamosan egy olyan kontrollt is be kell állítani, amely ezt az anyagot a legnagyobb vizsgált koncentrációban tartalmazza (lásd az 1.8.3. és az 1.8.4. részt).

c) Megfelelő mértani vagy logaritmikus sorozatot (10) (lásd a 3. mellékletet) alkotó koncentrációkat válasszunk. A logaritmikus sorozat alkalmazása célszerűbb.

d) Ha több mint hat tartály áll rendelkezésünkre, a plusz tartályokat felhasználhatjuk akár párhuzamos tesztek beállítására, akár a koncentráció tartomány kisebb közönkénti lefedésére. Mindkettő egyformán ajánlott.

1.7.2. A teszt tervezése varianciaanalízissel (ANOVA) végzett NOEC/LOEC-becslés esetén

Lehetőleg minden teszt koncentrációt több párhuzamosban állítunk be, és a statisztikai analízist tartályszinten végezzük (11). Párhuzamos tartályok nélkül a tartályok közti variancia a halak tömegének egyedi eltérésén túl nem elemezhető. Azt azonban tapasztalatok igazolják (12), hogy a tartályok közti variancia a tartályon belüli (egyedek közti) varianciához viszonyítva a vizsgált esetben nagyon kicsi volt. Így relatíve elfogadható alternatíva a statisztikai analízist az egyedek szintjén végezni.

Hagyományosan legalább öt, olyan mértani sorozatot alkotó teszt koncentrációt választunk ki, melynek szorzótényezője nem nagyobb, mint 3,2.

Általában, ha a tesztet párhuzamos tartályokkal végezzük, a kontroll tartályok száma (így a halak száma is) az egy koncentrációhoz tartozó tesztartályok számának (melyek azonos méretűek) kétszerese. Viszont párhuzamos tartályok hiányában a kontroll halak számának meg kell egyeznie az egyes tesztoldatokban levő halak számával.

Ha a varianciaanalízist tartályok, és nem egyedek szintjén végezzük (amelynek velejárója lenne a halak egyedi megjelölése vagy a pszeudospecifikus növekedési ráták használata (lásd 2.1.2.)), megfelelő számú párhuzamos tartályra van szükség, hogy a tartályok közti standard eltérés meghatározható legyen. Ez azt jelenti, hogy a hiba szabadságfokainak száma a varianciaanalízisben legalább 5 kell, hogy legyen (11). Ha csak a kontrollból vannak párhuzamos tartályaink, fennáll annak a veszélye, hogy a hiba variabilitása tendenciaszerűen megváltozik, mert értéke együtt növekedhet a kérdéses növekedési ráta átlagával. Mivel a növekedési ráta a koncentráció növekedésével valószínűleg csökken, ez a variancia túlbecslését okozhatja.

1.8. A teszt kivitelezése

1.8.1. A teszthalak kiválasztása és tömegük meghatározása

Fontos, hogy a halak testtömegének különbsége a teszt kezdetén a lehető legkisebb legyen. A különböző fajok megfelelő mérettartományait az 1. melléklet tartalmazza. A teszt kezdetén lehetőleg az egész állomány egyedeinek tömege az átlagos testtömeg $\pm 10\%$ tartományban legyen. Az eltérés semmilyen esetben nem haladhatja meg a 25%-ot. A teszt előtt – az átlagos testtömeg megállapítására – mérjük meg néhány kivett hal tömegét.

A teszt kezdete előtt 24 órával a törzsállomány etetését abbahagyjuk. A teszthez a halakat véletlenszerűen választjuk ki. A halakat általános altatószerrel (pl. 100 mg/l töménységű vizes trikain-metán-szulfonát (MS 222) oldattal, melyet szódabikarbóna hozzáadásával semlegesítünk úgy, hogy egy rész MS 222-höz két rész szódabikarbónát számítunk) elkábítjuk, majd (a felesleges víz felitítása után) a tömegüket – a megadott pontossággal (lásd az 1. mellékletet) – megmérjük. Azokat a halakat, amelyek a megfelelő mérettartományba esnek, véletlenszerűen elosztjuk a tesztedények között. A halak altatása és megfogása (beleértve a víz leitatását és a tömegmérést) stresszt és az ivadékhalak sérülését okozhatja, különösen a kis méretű fajok esetében. Ezért az ivadékok kezelését a lehető legnagyobb óvatossággal kell végezni.

A teszt 28. napján a halak tömegét újra megmérjük (lásd az 1.8.6. részt). Ha valamilyen okból szükség van a táplálékmenyiség újraszámítására, a halakat a teszt 14. napján is megmérhetjük (lásd az 1.8.2.3. részt). Egy másik lehetséges módszer, hogy a halak méretében bekövetkezett változást fényképezéssel követjük, és ennek alapján számítjuk ki a táplálékmenyiséget.

1.8.2. A teszt körülményei

1.8.2.1. A teszt időtartama

A teszt időtartama ≥ 28 nap.

1.8.2.2. A betelepítési arány és a betelepítési sűrűség

Fontos, hogy a betelepítési arány és a betelepítési sűrűség megfeleljen az adott faj igényeinek (lásd az 1. mellékletet). Ha a betelepítési sűrűség túl nagy, a túlszűfoeltség stresszt okozhat, mely a halak növekedésének visszamaradásához és megbetegedéshez is vezethet. Ha viszont a betelepítési sűrűség túl kicsi, az territoriális viselkedés kialakulását okozhatja, ami szintén befolyásolhatja a növekedést. A betelepítési sűrűségnek minden esetben elég alacsonynak kell lennie ahhoz, hogy a levegőteltettségi érték 60%-ának megfelelő oldottoxigén-koncentráció levegőtetés nélkül is fenntartható legyen. Egy körvizsgálat szerint (3), szivárványos pisztráng esetében megfelelőnek bizonyult, ha 16 db 3–5 g-os halat telepítettek 40 l vízbe. Ajánlott vízcseré: 6 liter/g hal/nap.

1.8.2.3. A halak etetése

A halakat olyan mennyiségű, a fajnak megfelelő táppal kell etetni (1. melléklet), amely biztosítja a megfelelő növekedést. Gondot kell fordítani a mikrobák elszaporodásának és a víz zavarosodásának megakadályozására. Szivárványos pisztráng esetében naponta a testtömeg 4%-ának megfelelő mennyiségű táp adása kielégíti ezeket az igényeket (3) (16) (17) (18). A halaknak a napi mennyiséget lehet két egyenlő adagban, legalább 5 óra különbséggel adni. A táplálék mennyiségét minden egyes tesztedényben a halak kiindulási tömege alapján határozzuk meg. Ha a halak tömegét a 14. napon is megmérjük, a táplálék mennyiségét is újra kiszámítjuk. A tömegmérés előtt az állatokat 24 órán át nem etetjük.

Minden nap az el nem fogyasztott tápot és az ürüléket a tesztedények aljáról leszívással gondosan eltávolítjuk.

1.8.2.4. Hőmérséklet- és fényviszonyok

A megvilágítás és a víz hőmérséklete az adott faj igényeinek megfelelő kell, hogy legyen (lásd az 1. mellékletet).

1.8.3. Tesztkoncentrációk

Általában a tesztanyag öt különböző koncentrációjú oldatát használjuk, a teszt tervezési módjától függetlenül (lásd az 1.7.2. részt). A tesztanyag toxicitására vonatkozó előzetes ismeretek (pl. egy akut toxicitási teszt eredményei vagy egy elővizsgálat eredményei) segítséget nyújtanak a megfelelő tesztkoncentrációk kiválasztásában. Ha kevesebb, mint 5 különböző koncentráció beállítására kerül sor, azt indokolni kell. A legmagasabb tesztkoncentráció nem haladhatja meg a tesztanyag vízoldhatósági határát.

Abban az esetben, ha a törzsoldat készítéséhez az oldást segítő anyagot is használtunk, annak végső koncentrációja nem haladhatja meg a 0,1 mg/l-t, és lehetőleg minden tesztedényben azonosnak kell lennie (lásd 1.6.3.). Ha lehetséges, ezeknek az anyagoknak a használatát kerülni kell.

1.8.4. Kontrollok

A hígítóvízes kontrollok száma a teszt tervezési módjának függvénye (lásd az 1.7–1.7.2. részeket). Ha oldást segítő anyagot is használtunk, a hígítóvízes kontrollok számával megegyező számú oldószeres kontrollt is be kell állítani.

1.8.5. Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

A vizsgálat során a tesztanyag koncentrációját szabályos időközönként meghatározzuk (lásd az alábbiakban).

Átfolyásos tesztek esetében a tesztoldatok és a hígítóvíz áramlási sebességét rendszeresen – lehetőleg naponta – ellenőrizzük. A teszt folyamán a kiindulási értéktől nem térhetnek el 10%-nál nagyobb mértékben. Amennyiben várható, hogy a tesztanyag koncentrációja a névleges érték $\pm 20\%$ tartományban (tehát 80–120% között, lásd az 1.6.2. és az 1.6.3. részt) marad a teszt során, javasolt legalább a legkisebb és a legnagyobb koncentrációjú tesztoldatban a teszt elején, azután pedig hetente meghatározni a tesztanyag-koncentrációt. Ha a tesztanyag koncentrációja (a tesztanyag stabilitási adatai alapján) várhatóan nem marad a névleges érték $\pm 20\%$ tartományban, hasonló időpontokban minden tesztkoncentrációban el kell végezni a méréseket.

Félstatikus tesztek esetében, ahol a tesztanyag koncentrációja várhatóan a névleges érték $\pm 20\%$ tartományban marad a teszt során, javasolt legalább a legkisebb és a legnagyobb koncentrációjú tesztoldatokban elkészítésük után azonnal, majd közvetlenül az első vízcseré előtt meghatározni a tesztanyag-koncentrációt, azután pedig hetente megismételni a meghatározást. Ha a tesztanyag koncentrációja várhatóan nem marad a névleges érték $\pm 20\%$ tartományban, a stabilabb anyagokéhoz hasonló módon minden tesztkoncentrációban el kell végezni a méréseket.

Az eredmények lehetőleg mért koncentrációértékeken alapuljanak. Abban az esetben, ha bizonyíték áll rendelkezésre arról, hogy a tesztanyag koncentrációja a névleges érték $\pm 20\%$, illetve a mért érték $\pm 20\%$ tartományban maradt az egész teszt során, az eredményeket a névleges és a mért koncentrációk alapján is meg lehet adni.

A mintákat bizonyos esetekben szűrni (pl. 0,45 μm pórusméretű szűrővel) vagy centrifugálni kell. Ajánlatos inkább a centrifugálást alkalmazni. Amennyiben a tesztanyag nem adszorbeálódik a filter felszínén, a szűrés is elfogadható módszer.

A teszt folyamán az oldottoxigén-koncentrációt, a pH-t és a hőmérsékletet minden edényben mérni kell. A vízkeménységet, a lúgosságot és a sótartalmat (amennyiben releváns) csak a kontrollokban és egy, a legmagasabb tesztanyag-koncentrációt tartalmazó edényben kell meghatározni. Az oldottoxigén-koncentrációt és a sótartalmat (amennyiben releváns) a teszt során legalább háromszor (az elején, a közepén és a végén) kell mérni. Félstatikus tesztek esetében ajánlott az oldott oxigén-méréseket nagyobb gyakorisággal végezni, lehetőleg minden vízcseré előtt és után, de minimum hetente egyszer. A félstatikus tesztekben a pH-t minden vízcseré elején és végén, átfolyásos tesztekben pedig legalább hetente egyszer kell meghatározni. A vízkeménységet és a lúgosságot elég a teszt során egyszer megmérni. A hőmérsékletet célszerű legalább egy tesztedényben folyamatosan monitorozni.

1.8.6. Megfigyelések

Tömegmérés: a teszt végén (a felesleges víz felitása után) meghatározzuk az életben maradt halak nedves tömegét tesztedényenként, csoportokban vagy egyedenként. A tesztedényenkénti mérés célszerűbb az egyedi tömegmérésnél, mivel ez utóbbi a halak egyedi megjelölését igényli. Ha az egyenkénti tömegmérést alkalmazzuk az egyedi növekedési ráta meghatározására, a halak megjelölését úgy kell elvégezni, hogy az ne stresszelje az állatokat (pl. színes horgászszinórral).

A teszt időtartama alatt a halakat naponta megvizsgáljuk, és a megfigyelhető rendellenességeket (pl. bevérzés, elszíneződés), illetve az abnormális viselkedést feljegyezzük. Az elpusztult egyedek számát rögzítjük. Az elpusztult halakat, amilyen hamar csak lehet, el kell távolítani a vízből. Az elhullott állatokat nem pótoljuk, mivel a telepítési tömeget és sűrűséget eleve úgy határoztuk meg, hogy megfelelően kivédhető legyen a halak számának változásából adódó hatás. A táplálék mennyiségén viszont változtatni kell.

2. AZ ADATOK ÉS A VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

2.1. Az eredmények kezelése

A teszt tervezéséhez és értékeléséhez ajánlott egy statisztikus munkáját is igénybe venni, mivel ez a teszt módszer sokféle elrendezést megenged (pl. a tesztkamrák számát, a tesztkoncentrációk számát, a halak számát stb. illetően). Tekintettel arra, hogy sokféle elrendezés lehetséges, a különböző elrendezésekre vonatkozó statisztikai módszereket itt nem ismertetjük.

Nem számítjuk ki a növekedési rátát azokban a tesztedényekben, ahol a mortalitás meghaladja a 10%-ot. Minden tesztkoncentrációnál feltüntetjük az elpusztult halak arányát.

Bármelyik módszert alkalmazzuk az adatok értékelésére, a cél a specifikus növekedési ráta (r) meghatározása, t_1 és t_2 időpont között. Ez többféleképpen is elvégezhető annak függvényében, hogy a halakat egyedileg megjelöltük-e vagy sem, illetve, hogy az átlagos növekedési ráta kiszámítására van-e szükség.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e w_2} - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \overline{\log_e w_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

ahol

r_1 = egyedi specifikus növekedési ráta,

r_2 = átlagos specifikus növekedési ráta,

r_3 = pszeudospecifikus növekedési ráta,

w_1, w_2 = egy meghatározott egyed tömege t_1 , illetve t_2 időpontban,

$\log_e w_1$ = egy egyed tömegének logaritmususa a teszt kezdetén,

$\log_e w_2$ = egy egyed tömegének logaritmususa a teszt végén,

$\overline{\log_e w_1}$ = a w_1 értékek logaritmusának átlaga egy tesztkamrában a teszt kezdetén,

$\overline{\log_e w_2}$ = a w_2 értékek logaritmusának átlaga egy tesztkamrában a teszt végén,

t_1, t_2 = idő (napok) a teszt elején és végén.

Az r_1 , r_2 és r_3 értékeket kiszámíthatjuk a 0–28. napig tartó periódusra, illetve – ha végeztünk méréseket a 14. napon – a 0–14. és a 14–28. napig tartó időszakokra is.

2.1.1. Az eredmények értékelése regresszióval (koncentráció–válasz modell)

Ezzel a módszerrel felállítható a specifikus növekedési ráta és a koncentráció közti matematikai összefüggés, amely bármelyik „EC_x”-érték becslését lehetővé teszi. Ehhez nem szükséges az egyedi növekedési ráták (r_1) meghatározása, végezhetjük az analízist az átlagos növekedési ráták (r_2) alapján. Ez utóbbi módszer javasolt, és a kis halfajok esetében is megfelelőbb.

Az átlagos specifikus növekedési rátákat (r_2) a koncentráció függvényében ábrázoljuk, hogy megvizsgálhassuk a koncentráció–válasz összefüggést.

Az r_2 és a koncentráció közti összefüggés kifejezésére alkalmas modellt kell választani, és a választást megfelelő módon indokolni kell.

Ha az életben maradt halak száma a tesztedényekben nem azonos, akkor a modell illesztését (akár egyszerű, akár nem lineáris módon), a halak csoportlétszáma szerint súlyozni kell.

Az illesztett modell segítségével becsülhető kell, hogy legyen pl. az EC₂₀ és a középértéktől való eltérés (akár a standard hiba, akár a konfidenciatartomány). Az illesztett modell grafikonját úgy kell elkészíteni, hogy az ábrán az adatok is láthatók legyenek, hogy a modell megfelelőségét meg lehessen állapítani (9) (19) (20) (21).

2.1.2. Az eredmények értékelése a LOEC értékének becsléséhez

Ha a tesztet minden koncentrációban párhuzamos tartályokban végeztük, a LOEC becslése az átlagos specifikus növekedési ráták varianciaanalízisén (ANOVA) alapul (lásd a 2.1. részt), melyet egy olyan, megfelelő módszer [pl. Dunnett- vagy Williams-próba (13) (14) (15) (22)] követ, melynek segítségével összehasonlíthatók a tesztkoncentrációk r értékei a kontroll r értékekkel. Így azonosítható az a legalacsonyabb tesztkoncentráció, amelyben 0,05-ös valószínűségi szinten szignifikáns a változás. Ha a paraméteres módszerek alkalmazásához szükséges feltételek nem teljesülnek – nem normál eloszlás (pl. Shapiro–Wilks-próba) vagy heterogén variancia (Bartlett-próba) esetén, az ANOVA előtt az adatokat célszerű egységesíteni, vagy súlyozott varianciaanalízist végezni.

Ha nem tartoztak minden tesztkoncentrációhoz párhuzamos tartályok, a tartály szintű varianciaanalízis vagy nem végezhető el, vagy érzékenysége nem kielégítő. Ebben az esetben elfogadható kompromisszumot jelent a varianciaanalízist az egyedek pszeudospecifikus növekedési rátái (r_3) alapján elvégezni.

Ezután az egyes tesztkoncentrációkra vonatkozó átlag r_3 értékek összehasonlíthatók a kontrollok átlag r_3 értékeivel. A LOEC azonosítása a fentiekkel azonos módon történik. Figyelembe kell venni, hogy ez a módszer nem veszi számításba, sem nem védi ki a tartályok közti eltéréseket, amely a halak egyedi különbségein kívül jelentkezik. Azt azonban tapasztalatok igazolják (9), hogy a tartályok közti variancia a tartályon belüli (egyedek közti) varianciához viszonyítva nagyon kicsi. Ha az analízishez nem az egyedek adatait használjuk, a kívül eső értékek azonosítására szolgáló módszert és alkalmazásának indoklását is meg kell adni.

2.2. Az eredmények értékelése

Az eredmények értelmezésekor körültekintően kell eljárni, ha a mért testanyag-koncentrációk az alkalmazott analitikai módszer detektálási határa közelében voltak, illetve félstatikus tesztek esetében akkor, ha a testanyag koncentrációja a lecserélés előtt álló tesztoldatban kisebb volt, mint a frissen készített oldatban.

2.3. A vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

2.3.1. A testanyag

– az anyag fizikai és fizikai-kémiai tulajdonságai,

– kémiai azonosítási adatai az anyag tisztaságára vonatkozó adatokkal együtt, és a testanyag mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszer.

2.3.2. A tesztállatok

– lehetőleg a faj tudományos neve,

– a törzs megnevezése, a beszerzés helye, az állatok mérete, az esetlegesen alkalmazott előkezelés stb.

2.3.3. A teszt körülményei

– az alkalmazott tesztmódszer (pl. félstatikus vagy átfolyásos, telepítési tömeg és sűrűség stb.),

– a teszt elrendezése (pl. a tesztedények száma, a tesztkoncentrációk és a párhuzamosok száma, a halak száma tartályonként),

– a tesztoldat készítésének módja és a vízcseré gyakorisága (az esetlegesen alkalmazott oldást segítő anyag nevét és koncentrációját is meg kell adni),

– a névleges tesztkoncentrációk, a tesztoldatokban mért értékek átlaga és szórása, az alkalmazott mérési módszer, valamint annak bizonyítékai, hogy a mért értékek a testanyag valódi oldatainak koncentrációját jelentik,

– a hígítóvíz jellemzői: pH, keménység, lúgosság, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradék klór (ha mértük), összes szerves szén, lebegőanyag, sótartalom (ha mértük) és bármely más elvégzett mérés eredményei,

– a víz minősége a tesztedényekben: pH, keménység, hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció,

– a halak táplálására vonatkozó részletes információk (pl. a táp típusa, az adagolt mennyiség és az etetés gyakorisága).

2.3.4. Az eredmények

– annak bizonyítéka, hogy a kontrollok megfeleltek a teszt érvényességi kritériumainak, továbbá az összes tesztkoncentrációra vonatkozó mortalitási adatok,

– az alkalmazott statisztikai módszer, és hogy a statisztika párhuzamos vizsgálatok eredményein vagy az egyedekre vonatkozó adatokon alapul-e, az adatok kezelése, valamint a módszer kiválasztásának indoklása,

– a halak tömege és a tömegek átlaga táblázatos formában a 0., a 14. (ha mértük) és a 28. napon, a 0–28. napig tartó periódusra, illetve a 0–14. és a 14–28. napig tartó időszakokra vonatkozó átlagos specifikus növekedési ráta, vagy a pszeudospecifikus növekedési ráta (amelyik megfelelő),

– a statisztikai analízis eredményei (regresszió vagy ANOVA) lehetőleg táblázatos és grafikus formában, a LOEC ($p = 0,05$) és a NOEC vagy EC_x értékei, ha lehetséges, a szórásukkal együtt,

– bármely, a testanyag által a halakban kiváltott szokatlan reakció vagy látható elváltozás.

3. IRODALOM

- (1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.
- (2) Meyer. A. Bierman, C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, pp. 231-236.
- (3) 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.
- (4) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp. 1855-1870.
- (5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety. 21, pp. 157-164.
- (6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- (7) Holcombe G. W., Benoit D. A., Hammermeister D. E., Leonard, E. N. and Johnson R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28. pp. 287-297.
- (8) 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.
- (9) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium. ASTM STP 891. R. C. Bahner and D. J. Hansen eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 338-338.
- (10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservaion and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.
- (11) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- (12) 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.
- (13) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, pp. 1096-1121.
- (14) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20. pp. 482-491.
- (15) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27. pp. 103-117.
- (16) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, pp. 123-133.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environ. Toxicol. Chem. 11. pp. 1485-1494.
- (20) 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.
- (21) 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 pp.
- (22) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp. 510-531.

1. melléklet

A tesztelésre ajánlott halfajok és a megfelelő tesztkörülmények

Fajok	Javasolt teszt-hőmérséklet (°C)	Megvilágítás (órák)	A halak javasolt kiindulási tömege (g)	A tömegmérés pontossága	Betelepítési tömeg (g/l)	Betelepítési sűrűség (db/l)	Táplálék	A teszt időtartama (napok)
Javasolt faj: <i>Oncorhynchus mykiss</i> Szivárványos pisztráng	12,5–16,0	12–16	1–5	a legközelebbi 100 mg-ra kerekítve	1,2–2,0	4	védjeggyel ellátott, szárított táp pisztráng-ivadékok számára	≥ 28
Egyéb jól dokumentált fajok: <i>Danio rerio</i> Zebrahal	21–25	12–16	0,050–0,100	a legközelebbi egész mg-ra kerekítve	0,2–1,0	5–10	élő (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	21–25	12–16	0,050–0,100	a legközelebbi egész mg-ra kerekítve	0,2–1,0	5–20	élő (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)	≥ 28

2. melléklet

Egy megfelelő hígítóvíz néhány kémiai tulajdonsága

Anyag	Koncentráció
Levegőanyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Nem ionizált formájú ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Szerves foszfortartalmú peszticidok	< 50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidok és poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

3. melléklet

Logaritmikus koncentrációsorok toxicitási tesztekhez (9)

A koncentrációk száma 100 és 10, illetve 10 és 1 között ⁽¹⁾						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

⁽¹⁾ Egy oszlopból öt (vagy több) egymást követő koncentrációt választunk ki. Az (x) oszlop koncentrációi közé eső koncentrációkat a (2x+1) oszlop tartalmazza. A megadott értékek jelenthetnek térfogat-százalékos, illetve mg/l vagy µg/l koncentrációkat is. Az értékek 10 bármely hatványával szorozhatók és oszthatók. Ha a toxicitás szintje bizonytalan, az 1. oszlop koncentrációit célszerű alkalmazni.

C.15. AKUT TOXICITÁSI TESZT HALEMBRIÓKKAL ÉS HALLÁRVÁKKAL

1. MÓDSZER

Ez az akut toxicitási teszt módszer megegyezik az OECD TG 212 (1998) módszerrel.

1.1. Bevezetés

Az akut toxicitási teszt során a halak egyedfejlődésének kezdeti szakaszában lévő egyedeket a frissen megtermékenyített ikra stádiumtól a szikzacskós lárvastádium végéig tartó időszakban a tesztanyag rövid távú hatásának tesszük ki. Az embrió- és a lárvateszt során az állatokat nem etetjük, és a tesztelést még az előtt befejezzük, hogy a lárvák áttérnének az önálló táplálkozásra.

A teszt célja a tesztanyag letális és (korlátozott mértékben) szubletális hatásainak vizsgálata a választott faj egyedfejlődésének meghatározott stádiumaiban. Ez a teszt abból a szempontból is hasznos információt szolgáltat, hogy egyrészt hidat képez a letális és szubletális tesztek között, másrészt elővizsgálatként alkalmazható az összes korai fejlődési stádiumot vizsgáló, illetve a krónikus toxicitási tesztekhez, harmadrészt alkalmazható olyan fajok esetében is, ahol a tartási technikák jelenlegi fejlettsége mellett még nem lehet lefedni azt a teljes időszakot, amely alatt a lárvák az endogén táplálkozásról áttérnek az exogén táplálkozásra.

Figyelembe kell venni azt a tényt, hogy általánosságban csak azok a tesztek tudnak megbízható becslést adni a kémiai anyagok halakra gyakorolt krónikus toxikus hatásáról, amelyek a halak egyedfejlődésének összes stádiumát magukban foglalják. Az expozíció bármilyen – például fejlődési stádiumokra történő – korlátozása csökkenti a teszt érzékenységét, és a krónikus hatás alulbecsléséhez vezethet. Ezért várható, hogy az embrió- és lárvateszt érzékenysége alacsonyabb lesz, mint az összes korai fejlődési stádiumot magában foglaló teszté, különösen az erősen lipofil ($\log P_{ow} > 4$) anyagok, illetve a specifikus hatásmechanizmusú anyagok esetében. Kisebb különbség várható a két teszt érzékenysége között a nem specifikus hatású, narkotikus hatásmechanizmusú anyagok esetében (1).

A teszt módszer kiadása előtt a legtöbb, az embrió- és lárvatesztre vonatkozó tapasztalat az édesvízi *Danio rerio* Hamilton–Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – zebrahal) fajjal történt vizsgálatokból származott. A zebrahallal végezhető teszt részletes leírása az 1. mellékletben található. Ez nem zárja ki más olyan fajok alkalmazását, amelyekről kísérleti tapasztalat áll rendelkezésre (lásd az 1A és az 1B táblázatot).

1.2. Definíciók

A legkisebb, megfigyelhető hatást kiváltó koncentráció (LOEC): a tesztanyagnak az a legkisebb tesztelt koncentrációja, amely a teszt szervezetre a kontrollhoz viszonyítva ($p < 0,05$) szignifikáns hatást fejt ki. A LOEC feletti összes teszt koncentrációnak a LOEC esetében megfigyelhető hatással megegyező, vagy annál erősebb károsító hatást kell kifejtenie.

Hatástalan koncentráció (NOEC): közvetlenül a LOEC alatti teszt koncentráció.

1.3. A módszer elve

A halembriókat és hallárvákat a tesztanyag különböző koncentrációjú vizes oldatainak hatásának tesszük ki. A teszt kivitelezésekor két lehetőség közül választhatunk: végezhetjük félstatikus, illetve átfolyásos körülmények között. A választás a tesztanyag természetétől függ. A teszt kezdetén frissen megtermékenyített ikrákat helyezünk a tesztoldatokba. A tesztelést még azelőtt befejezzük, hogy bármelyik teszt edényben a lárvák szikzacskója teljesen felszívódna, illetve megkezdődne a kontrollban az éhezés miatti pusztulás. A letális és szubletális hatásokat megvizsgáljuk, a kontroll értékeihez viszonyítjuk, és meghatározzuk a legkisebb megfigyelhető hatást kiváltó koncentrációt és a hatástalan koncentrációt. Másik lehetőség az eredmények regressziós analízise, melynek segítségével meghatározhatók bizonyos, százalékban kifejezett hatást kiváltó koncentrációk (LC_x vagy EC_x , ahol x a százalékban kifejezett hatást jelenti).

1.4. A tesztanyagra vonatkozó információk

Egy lehetőleg azonos halfajjal végzett akut toxicitási teszt (lásd a C.1 módszert) eredményei rendelkezésre kell, hogy álljanak. Az eredmények hasznosak lehetnek a megfelelő koncentrációtartomány kiválasztásához az egyedfejlődés korai stádiumait vizsgáló tesztben. Az anyag vízoldhatóságára (beleértve a tesztvízben való oldódást is) és gőznyomására vonatkozó adatok ismertek kell, hogy legyenek. Rendelkezésre kell, hogy álljon egy olyan, a tesztoldatokból az anyag mennyiségi meghatározására alkalmas, megbízható analitikai módszer, melynek pontossága és kimutatási határa is ismert.

A teszt körülményeinek helyes megválasztásához további hasznos információk: az anyag szerkezeti képlete, tisztasága, stabilitási adatai vízben és megvilágítás mellett, stabilitása a teszt körülményei között, pK_a és P_{ow} értékei, valamint egy gyors biológiai lebonthatósági teszt eredményei (lásd a C.4. módszert).

1.5. A teszt érvényessége

A teszt abban az esetben érvényes, ha az alábbi feltételek teljesülnek:

– a megtermékenyített ikrák túlélése a kontrollokban, és ahol szükséges, az oldószeres kontrollokban el kell, hogy érje a 2. és a 3. mellékletben meghatározott arányokat,

– az oldottoxigén-koncentrációnak az egész teszt folyamán el kell érnie a levegőtelítettségi érték 60–100%-át,
– a tesztedények közti és az egymást követő napokon mért hőmérsékletkülönbség az egész teszt folyamán nem lehet nagyobb $\pm 1,5$ °C-nál, és a halfajnak megfelelő hőmérsékleti tartományban kell lennie (lásd a 2. és a 3. mellékletet).

1.6. A módszer leírása

1.6.1. Tesztedények

Bármilyen üvegből, vagy más kémiaailag inert anyagból készült edény használható. Az edényeknek elég nagyoknak kell lenniük ahhoz, hogy méretük a betelepítési aránynak megfelelően (lásd az 1.7.1.2. részt). A tesztedényeket ajánlott a tesztelésre kijelölt helyen véletlenszerűen elhelyezni. A teljesen véletlenszerű elrendezésnél célszerűbb a tesztedényeket blokkokban elhelyezni, úgy, hogy minden blokk mindegyik kezelési típusból tartalmazzon edényt, így elkerülhetők a laboratóriumi környezetben jelentkező szisztematikus hatások. Az adatok elemzésekor a blokkok kialakítását is figyelembe kell venni. A tesztedényeket védeni kell a külső zavaró hatásoktól.

1.6.2. A halfajok kiválasztása

A javasolt halfajok listáját az 1A táblázat tartalmazza. Ez nem zárja ki más fajok használatát (példák találhatók az 1B táblázatban), de a módszert az adott faj igényeihez kell igazítani. A faj és a kísérleti módszer kiválasztásának indoklását a jegyzőkönyvbe bele kell foglalni.

1.6.3. A tenyészhalak tartása

Az tenyészhalak számára megfelelő tartási körülményeket az OECD TG 210 ⁽¹⁾ nemzetközi irányelv és a 2., 3., 4., 5. és a 6. hivatkozások tartalmazzák.

1.6.4. A halembriók és a lárvák kezelése

Az expozíciót végezhetjük úgy, hogy az embriókat és hallárvákat kisebb, lyukacsos falú vagy végű tesztedényekben – amelyeken szabadon átáramolhat a tesztoldat –, egy nagyobb tartályban helyezzük el. A víz nem turbulens áramoltatását biztosíthatjuk például úgy, hogy a kis edényeket egy karhoz rögzítjük, amely az edényeket föl-le mozgatja, oly módon, hogy az élőlényeket mindig ellepje a víz. Leszívó-átöblítő rendszert is alkalmazhatunk. A lazacfélék megtermékenyített ikráit helyezhetjük olyan rácsokra vagy hálókra, melyeknek a lyukai elég nagyok ahhoz, hogy a frissen kikelt lárvák átférjenek rajtuk. Félstatikus tesztek esetében a teljes vízcsere előtt az embriók és lárvák kivételére Pasteur-pipettát használunk (lásd az 1.6.6. részt).

Ahol az ikrák nagy edényben tartására ikratartókat, rácsokat vagy hálókat alkalmaztunk, azokat a lárvák kikéltése után el kell távolítani¹. Csak abban az esetben hagyjuk őket a tartályban, ha a lárvák kiűzésének megakadályozása szempontjából ez indokolt. Ha szükség van a lárvák áthelyezésére, azt úgy kell végezni, hogy az állatok a levegővel ne érintkezzenek. A lárvák ikratartóból való kiszédésére nem szabad hálót használni (ezt a kevésbé sérülékeny fajok – mint például a ponty – esetében nem szükséges betartani). Az áthelyezés időzítése a választott fajtól függ, és nem is mindig szükséges. A félstatikus tesztekhez használhatunk főzőpoharakat vagy alacsony falú edényeket, melyekbe (ha szükséges) kevéssel az aljuk fölül egy hálós elválasztót is rakhatunk. Ha az edények térfogata megfelel a betelepítési követelményeknek, nincs szükség az embriók vagy lárvák áthelyezésére.

1.6.5. A hígítóvíz

Tesztvízként olyan víz használható, amely megfelel a hígítóvízzel szemben támasztott kémiai követelményeknek (4. melléklet), és amelyben a kontroll szervezetek túlélése eléri a 2. és a 3. mellékletben megadott értékeket. A víznek a teszt időtartama alatt állandó minőségűnek kell lennie. A víz pH-ja $\pm 0,5$ egységnél nagyobb mértékben nem változhat. Annak biztosítása érdekében, hogy a víz összetétele ne befolyásolja hátrányosan a teszt eredményét (például mert komplexet képez a tesztanyaggal), illetve a törzsállomány teljesítményét, a vízből időközönként kémiai analízisre mintát kell venni. A hígítóvízből a nehézfémek (pl. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd és Ni), a főbb anionok és kationok (pl. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- és SO_4^{2-}), a peszticidek (szerves foszfor- és klórtartalmú peszticidek), az összes szerves szén és a lebegőanyag mennyiségének meghatározását például háromhavonta kell elvégezni, ha a víz minősége ismertén viszonylag állandó. Ha a víz minősége legalább egy éven keresztül bizonyítottan állandó, a meghatározásokat nagyobb időközönként is lehet végezni, például félévente.

1.6.6. A tesztoldatok

A kiválasztott koncentrációjú tesztoldatokat törzsoldatból, hígítással készítjük.

A törzsoldatot lehetőleg úgy készítjük, hogy a tesztanyagot mechanikai úton (pl. keveréssel vagy ultrahangos kezeléssel szonikálással) a hígítóvízben eloszlatjuk. Telítési oszlopokat (oldási oszlop) is használhatunk a megfelelő töménységű törzsoldat készítéséhez. Ha csak lehetséges, a diszpergálószer (vagy az oldást segítő szerek) használatát kerülni kell. Bizonyos esetekben azonban a megfelelő töménységű törzsoldat készítéséhez szükség lehet ilyen anyagokra. Megfelelő oldószer például az aceton, az etanol, a metanol, a dimetil-formamid és a trietilén-glikol. Megfelelő diszpergálószer a Cremophor RH40, a Tween 80, a 0,01%-os metilcellulóz-oldat és a HCO-40. Biológiai gyorsan lebomló, illetve erősen illékony anyagok (pl. aceton) alkalmazása esetén körültekintően kell eljárni, mivel ezek az anyagok a bakteriális szintetikus aktivitás miatt átfolyós rendszerben problémát okozhatnak. Ha oldást segítő anyagokat használunk, azok semmilyen szignifikáns hatást nem fejthetnek ki a tesztállatok túlélésére és fejlődésére. Ezt

¹ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test.

egy, csak az oldószert tartalmazó kontroll segítségével ellenőrizni kell. Mindent meg kell tenni annak érdekében, hogy az ilyen anyagok használatát elkerüljük.

A félstatikus tesztekben a vízcserét kétféleképpen végezhetjük. Az egyik lehetőség az, hogy tiszta edényekben új tesztoldatokat készítünk, és ezekbe az élő ikrákat és lárvákat – kis térfogatú „rég” vízzel együtt – óvatosan áthelyezzük úgy, hogy azok a levegővel ne érintkezzenek. A másik lehetőség, hogy a tesztszervezeteket az edényben hagyjuk, és a tesztoldat egy részét (legalább a háromnegyedét) lecseréljük. A médiumcsere gyakorisága a tesztanyag stabilitásától függ, de javasolt vízcserét naponta végezni. Ha az előzetes stabilitási tesztek alapján a tesztanyag koncentrációja a vízcserék közti időszakokban nem állandó (azaz kívül esik a névleges érték $\pm 20\%$ -os tartományon, illetve a kezdeti mért koncentrációérték 80% -a alá esik), célszerű a tesztelést átfolyásos rendszerben végezni. Bármelyik módon is kivitelezük a vízcserét, ügyelni kell arra, hogy a lárvákat minél kisebb stresszhatásnak tegyük ki.

Az átfolyásos tesztek kivitelezéséhez szükség van egy olyan rendszerre, amely folyamatosan hígítja és a tartályokba adagolja a megfelelő koncentrációjú tesztoldatokat (pl. mérőpumpa, proporcionális hígító, telítő rendszer). A törzsoldat és a hígítóvíz áramlási sebességét időközönként ellenőrizni kell, lehetőleg naponta, és értéke nem változhat 10% -nál nagyobb mértékben a teszt során. Az az áramlási sebesség, amely 24 óra alatt öt teljes térfogatcserét biztosít, megfelelőnek bizonyult (2).

1.7. A teszt kivitelezése

Az embrió és láva toxicitási teszt kivitelezésével kapcsolatosan hasznos információk állnak rendelkezésre az irodalomban, melyek közül néhány megtalálható a hivatkozások között (7) (8) (9).

1.7.1 A teszt körülményei

1.7.1.1 A teszt időtartama

A tesztet lehetőleg az ikrák megtermékenyülése után 30 perccel kell kezdeni. Az embriókat a csírákorong osztódásának kezdete előtt, vagy közvetlenül utána, vagy bármely időpontban, mielőtt a gasztrulastádium kialakulna, a tesztoldatba kell helyezni. Ha az ikrákat kereskedelmi forgalomból szerezzük be, nem minden esetben lehetséges a tesztet közvetlenül a megtermékenyítés után elkezdni. A teszt kezdetének kitolódása erőteljesen befolyásolhatja a teszt érzékenységet, ezért a tesztet az ikrák megtermékenyítése után legkésőbb nyolc órával be kell állítani. Mivel a teszt során a lárvákat nem etetjük, a tesztet még az előtt befejezzük, hogy bármelyik edényben a lárvák szikzacskója teljesen felszívódna, illetve a kontrollban megkezdődne az éhezés miatti pusztulás. A teszt időtartama a választott fajtól függ. Néhány javasolt tesztelési időtartam megtalálható a 2. és a 3. mellékletben.

1.7.1.2. Betelepítés

A tesztet olyan számú megtermékenyített ikra felhasználásával kell beállítani, hogy az megfeleljen a statisztikai követelményeknek. Az ikrákat válogatás nélkül helyezzük a különböző edényekbe. Koncentrációnként legalább három párhuzamos tesztedénybe minimum 30 db megtermékenyített ikrát kell egyenlően elosztani (vagy annyira egyenlően elosztani, amennyire csak lehetséges, mivel bizonyos fajok használata esetén nehéz egyforma csoportokat kialakítani). A betelepítési aránynak (a biomassa tömege térfogat-egységenként) elég alacsonynak kell lennie ahhoz, hogy a vízben a levegőteltettségi érték legalább 60% -ának megfelelő oldottoxigén-koncentráció levegőztetés nélkül is fenntartható legyen. Átfolyásos tesztek esetében javasolt, hogy a betelepítési arány ne haladja meg a $0,5$ g/l értéket 24 óra alatt, és a teszt során se legyen több, mint 5 g/l (2).

1.7.1.3. Hőmérséklet- és fényviszonyok

A megvilágítás és a víz hőmérséklete az adott faj igényeinek megfelelő kell, hogy legyen (lásd a 2. és a 3. mellékletet). A hőmérséklet monitorozására célszerű egy külön tesztedényt használni.

1.7.2 Tesztkoncentrációk

Általános esetben a vizsgálatához öt tesztanyag-koncentráció – melyek közti szorzótényező nem nagyobb mint $3,2$ – szükséges. A koncentrációtartomány kiválasztásakor figyelembe kell venni az LC_{50} /expozíciós idő függvényében történő változását is. Kevesebb, mint öt koncentráció használata – például tűrésteszt esetén –, illetve bizonyos körülmények között kisebb koncentrációtartomány alkalmazása is megfelelő lehet. Ha öt tesztkoncentrációnál kevesebbet alkalmazunk, azt indokolni kell. A 96 órás LC_{50} -értéket meghaladó, vagy 100 mg/l (bármelyik is alacsonyabb) koncentrációjú oldatokat már nem kell tesztelni. A tesztanyagok a vízdoldhatósági határuk feletti koncentrációban nem tesztelhetők.

Abban az esetben, ha a tesztoldatok készítéséhez az oldást segítő anyagot is használtunk, végkoncentrációja a tesztedényekben nem haladhatja meg a $0,1$ mg/l-t, és lehetőleg minden edényben azonosnak kell lennie (lásd 1.6.6.).

1.7.3 Kontrollok

A tesztsorozattal párhuzamosan egy hígítóvízes kontrollt (ha szükséges, párhuzamosban) és ha szükséges, egy oldószeres kontrollt (ha szükséges, párhuzamosban) is be kell állítani.

1.7.4 Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

A vizsgálat során a tesztanyag koncentrációját szabályos időközönként meghatározzuk.

Félstatikus tesztek esetében, ha várható, hogy a tesztanyag koncentrációja a névleges érték $\pm 20\%$ tartományban (tehát 80 – 120% között, lásd az 1.4. és az 1.6.6. részt) marad, javasolt legalább a legkisebb és a legnagyobb koncentrációjú tesztoldatokban – közvetlenül az elkészítésük után és közvetlenül a vízcseré előtt – a teszt során

legalább háromszor, szabályos időközönként meghatározni a tesztanyag-koncentrációt. (Tehát a meghatározást ugyanazokból az oldatokból kell végezni – készítéskor és lecseréléskor).

Ha a tesztanyag koncentrációja (a tesztanyag stabilitási adatai alapján) várhatóan nem marad a névleges érték $\pm 20\%$ tartományban, hasonló módon (tehát a teszt során legalább háromszor, szabályos időközönként) minden tesztkoncentrációban el kell végezni a méréseket. A vízcserre előtt a tesztkoncentrációt elég a párhuzamosok egyikében meghatározni. A meghatározások között legfeljebb hét nap telhet el. Az eredményeket javasolt mért koncentrációértékek alapján megadni. Amennyiben bizonyítást nyert, hogy a tesztanyag koncentrációja a névleges érték $\pm 20\%$, illetve a mért érték $\pm 20\%$ tartományban maradt az egész teszt során, az eredményeket a névleges és a mért koncentrációk alapján is meg lehet adni.

Átfolyásos teszteknel is megfelelő a félstatikus tesztekéhez hasonló mintavételi rend (bár természetesen ebben az esetben nem kell a „régii” oldatokból méréseket végezni). Ha a teszt hét napnál tovább tart, tanácsos az első héten növelni a mintavételek számát (például három méréssorozatot végezni) annak bizonyítására, hogy a tesztanyag koncentrációja stabil marad az oldatokban.

Bizonyos mintákat – szükség esetén – centrifugálni vagy szűrni (pl. 0,45 μm pórusméretű filteren) kell. Azonban egyik módszer sem képes minden esetben elválasztani a tesztanyag biológiailag hozzáférhető frakcióját a biológiai szempontból hozzáférhetetlentől, így nem feltétlenül szükséges a minták ilyen kezelése.

A teszt folyamán az oldottoxigén-koncentrációt, a pH-t és a hőmérsékletet minden edényben mérni kell. A vízkeménységet, a lúgosságot és a sótartalmat (amennyiben releváns) csak a kontrollokban és egy, a legmagasabb tesztanyag-koncentrációt tartalmazó edényben kell meghatározni. Az oldottoxigén-koncentrációt és a sótartalmat (amennyiben releváns) a teszt során legalább háromszor (az elején, a közepén és a végén) kell mérni. Félstatikus tesztek esetében ajánlott az oldott oxigénméréseket nagyobb gyakorisággal végezni, lehetőleg minden vízcserre előtt és után, de minimum hetente egyszer. A félstatikus tesztekben a pH-t minden vízcserre elején és végén, átfolyásos tesztekben pedig legalább hetente egyszer kell meghatározni. A vízkeménységet elég a teszt során egyszer megmérni. A hőmérsékletet naponta mérni kell, de célszerűbb legalább egy tesztedényben, folyamatosan monitorozni.

1.7.5 Megfigyelések

1.7.5.1 Az embriófejlődés időszaka

Az embriófejlődés stádiumának azonosítását (ti. a gasztrulastádiumot) az expozíció kezdetén a lehető legnagyobb pontossággal kell elvégezni. Ebben segítséget nyújthat reprezentatív ikrámintából készült, megfelelően tisztított és tartósított preparátumok használata. Az embrionális fejlődés stádiumainak leírása és illusztrációja az irodalomban is megtalálható (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2 A kelés és túlélés

A kelést és a lárvák túlélését naponta legalább egyszer megfigyeljük, és az eredményeket feljegyezzük. A teszt kezdetén ajánlott nagyobb gyakorisággal (pl. az első három órában 30 percenként) végezni a megfigyeléseket, mivel egyes esetekben a túlélés időtartama több információt hordoz, mint csupán az elpusztult egyedek száma (pl. akut toxikus hatás esetén). Az elpusztult embriókat és lárvákat a vizsgálat után, amilyen hamar csak lehet, el kell távolítani a vízből, mivel gyorsan lebomlanak. Különösen óvatosan kell az elpusztult egyedeket kivenni, nehogy a szomszédos ikrákat és lárvákat meglökjük vagy megsértsük, mivel ezek igen sérülékenyek és érzékenyek. A pusztulást a következő – fejlődési stádiumtól függő – kritériumok alapján állapítjuk meg:

- ikrák esetében: különösen a fejlődés első stádiumaiban, az áttetszőség szembetűnő elvesztése és a színezet megváltozása, mely a fehérjék koagulációja és precipitációja miatt következik be – ettől az ikrák fehérek és átlátszatlanok lesznek;

- embriók esetében: az embrió mozgásának hiánya, és/vagy a szívverés hiánya, és/vagy átlátszatlan elszíneződés olyan fajok esetében, melyek embriói normális esetben áttetszőek;

- lárvák esetében: mozgásképtelenség, és/vagy a légzőmozgások hiánya, és/vagy a szívverés hiánya, és/vagy a központi idegrendszer fehéres, átlátszatlan elszíneződése, és/vagy válaszképtelenség a mechanikai ingerekre.

1.7.5.3 Abnormális külső megjelenés

A rendellenes alakú és/vagy pigmentációjú lárvák számát és a szikzacskó felszívódásának mértékét megfelelő – a teszt időtartamától és a rendellenesség típusától függő – időközönként feljegyezzük. Megjegyzés: abnormális embriók és lárvák természetes körülmények között is megjelenhetnek, és arányuk a kontroll(ok)ban bizonyos fajok esetében több százalék is lehet. Az abnormális egyedeket csak akkor távolítjuk el a tesztanyagokból, ha elpusztultak.

1.7.5.4 Rendellenes viselkedés

Az olyan rendellenességeket – mint például a hiperventilláció, a koordinálatlan úszás és az egyébként nem jellemző nyugalom – a teszt időtartamától függő, megfelelő időközönként rögzíteni kell. Ezek a megfigyelt hatások, bár nehezen kvantifikálhatók, segítséget nyújthatnak a mortalitási adatok értékeléséhez, ti. információt szolgáltatnak a tesztanyag toxikus hatásmechanizmusáról is.

1.7.5.5 A lárvák hossza

A teszt végén ajánlott az állatok standard vagy teljes hosszát egyenként lemérni. Ha a farokúszók rothadása, illetve eróziója bekövetkezett, a standard hosszt kell meghatározni. Általánosságban elmondható, hogy a helyesen kivitelezett tesztek esetében a párhuzamos kontrollok hosszúságai közti szórás 20%.

1.7.5.6 A lárvák tömege

A teszt végén megmérhetjük az egyedek tömegét is. A száraz tömeg (24 óra, 60 °C) meghatározása jobb (a felesleges víz felitását követő) nedvestömeg-meghatározásnál. Helyesen kivitelezett teszt esetében a párhuzamos kontrollok tömegmérései közti szórás 20%.

A megfigyelések eredményeképpen az alábbi adatokhoz jutunk, melyek közül néhány (vagy mind) statisztikailag is elemezhető:

- kumulatív mortalitás,
- az egészséges lárvák száma a teszt végén,
- a kelésig és a kelés befejeződéséig eltelt idő (ti. 90%-os kelés mindegyik párhuzamosban),
- a kikelt lárvák száma napokra lebontva,
- az életben maradt állatok hossza (és tömege) a teszt végén,
- a deformált és abnormális lárvák száma,
- a rendellenesen viselkedő lárvák száma.

2. AZ ADATOK ÉS A VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

2.1 Az eredmények kezelése

A teszt tervezéséhez és értékeléséhez ajánlott egy statisztikus munkáját is igénybe venni, mivel ez a teszt módszer – például a teszt kamrák számát, a teszt koncentrációk számát, a megtermékenyített ikrák kiindulási számát és a mért paramétereket illetően – sokféle elrendezést megenged. Tekintettel a sokféle lehetőségre, a különböző elrendezésekre vonatkozó statisztikai módszereket itt nem ismertetjük.

A LOEC és NOEC értékeinek becsléséhez szükséges a párhuzamos eredmények közti eltérések analízise (ANOVA) vagy a kontingenciatablázatos módszerek alkalmazása. Az egyes koncentrációk és kontrollok eredményeinek sokrétű összehasonlításához hasznos lehet a Dunnett-módszer alkalmazása (12) (13). Más hasznos példák is rendelkezésre állnak (14) (15). Az észlelhető hatás mértékét varianciaanalízissel (ANOVA) vagy más módszerrel (pl. a teszt teljesítőképessége) ki kell számítani, és a jegyzőkönyvben rögzíteni kell. Itt kell megjegyeznünk, hogy az 1.7.5.6. részben található megfigyelések közül statisztikailag nem mind elemezhető varianciaanalízissel. Például a kumulatív mortalitás és az egészséges lárvák száma a teszt végén probit módszerekkel is elemezhető.

Ha az LC_x , illetve az EC_x értékeinek becslését akarjuk megadni, az adatsorhoz olyan megfelelő görbét/görbét illesztünk mint a logisztikus görbe, olyan statisztikai módszerekkel, mint például a legkisebb négyzetek, illetve a nem-lineáris legkisebb négyzetek elve. A görbe/görbék paramétereit úgy kell meghatározni, hogy az LC_x/EC_x és annak standard hibája közvetlenül becsülhető legyen. Ez nagy mértékben megkönnyíti az LC_x/EC_x értékek konfidenciahatárainak kiszámítását. Ha nincs ésszerű megfontolás más konfidenciahatárok alkalmazására, kétoldali 95%-os konfidenciahatárokat kell megszabni. Az illesztést lehetőleg úgy végezzük, hogy az illeszkedés hiányának szignifikanciája megállapítható legyen. Grafikai módszerek is használhatók a görbék illesztéséhez. A regressziós analízis az 1.7.5.6. részben foglalt összes megfigyelési adatra alkalmazható.

2.2 Az eredmények értékelése

Az eredmények értelmezésekor körültekintően kell eljárni, ha a mért tesztanyag-koncentrációk az alkalmazott analitikai módszer detektálási határa közelében voltak. Ez az oldhatósági határ feletti teszt koncentrációk eredményeinek értékelésére is vonatkozik.

2.3 A vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati jegyzőkönyvnek a következő információkat kell tartalmaznia:

2.3.1 A tesztanyag

– Az anyag fizikai és fizikai-kémiai tulajdonságai,
– kémiai azonosítási adatai az anyag tisztaságára vonatkozó adatokkal együtt, és – ahol helyénvaló – a tesztanyag mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszer.

2.3.2 A tesztfajok

– A faj tudományos neve, a törzs megnevezése, az ikrás nőstények száma (azaz hány nőstényből származik a teszthez felhasznált ikramennyiség), a beszerzés helye, a megtermékenyített ikrák begyűjtésének módja és további kezelése.

2.3.3 A teszt körülményei

– az alkalmazott teszt módszer (pl. félstatikus vagy átfolyósos, a megtermékenyítéstől a teszt kezdetéig eltelt idő, betelepítés stb.), a megvilágítás,
– a teszt elrendezése (pl. a teszt edények és a párhuzamosok száma, az embriók száma a párhuzamos edényekben),
– a törzsoldat készítésének módja és a vízcseré gyakorisága (az esetlegesen alkalmazott oldást segítő anyag nevét és koncentrációját is meg kell adni),

- a névleges tesztkoncentrációk, a tesztdatokban mért értékek átlaga és szórása, az alkalmazott mérési módszer; valamint ha a tesztanyag oldhatósági határánál magasabb koncentrációkat is teszteltünk, annak bizonyítékai, hogy a mért értékek a tesztanyag oldatban levő koncentrációját jelentik,
 - a hígítóvíz jellemzői: pH, keménység, hőmérséklet, oldottoxigén-koncentráció, maradék klór (ha mértük), összes szerves szén, lebegőanyag, sótartalom (ha mértük) és bármely más elvégzett mérés eredményei,
 - a víz minősége a tesztedényekben: pH, keménység, hőmérséklet és oldottoxigén-koncentráció.
- 2.3.4 Az eredmények
 - a tesztanyag stabilitására vonatkozó előzetes vizsgálatok eredményei,
 - annak bizonyítéka, hogy a kontrollok megfeleltek a tesztfajra vonatkozó kritériumoknak (lásd a 2. és a 3. mellékletet),
 - az embrió- és lárvaállapotok mortalitási/túlélési adatai, illetve az összesített mortalitási/túlélési adatok,
 - a kelési idő és a kikelt lárvák száma,
 - a hosszadatok (és a tömegadatok),
 - az esetleges morfológiai rendellenességek előfordulása és leírása,
 - az esetleges viselkedésbeli eltérések előfordulása és leírása,
 - az alkalmazott statisztikai módszer és az adatok kezelése,
 - a varianciaanalízissel elemzett tesztek esetében a LOEC ($p = 0,05$) és a NOEC értékei minden vizsgált reakció esetében, az alkalmazott statisztikai módszer leírása és annak feltüntetése, hogy milyen mértékű volt az észlelhető hatás,
 - a regressziós módszerekkel elemzett tesztek esetében az LC_x/EC_x értékei és konfidenciatartománya, a számításához használt, illesztett modell grafikus ábrázolása,
 - az itt leírt tesztmódszertől való bármely eltérés magyarázata.

IRODALOM

- (1) Kristensen P., (1990), 'Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods'. Final report to the Commission of the European Communities. 60 pp. June 1990.
- (2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- (3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). 'Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54. Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011. Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). 'Temperature criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, p. 128., Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H. W. (1977), 'The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research'. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121-173.
- (6) Legault R. (1958), 'A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4. pp. 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryolarval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry 6, pp. 61-71.
- (8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4. pp. 807-821.
- (9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology. 9, pp. 129-145.
- (10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company. North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50. pp. 1096-1121.
- (13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.
- (14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J. G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium. ASTM, Philadelphia.

- (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 I/RM/28, December 1992, 81 pp.
- (17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. of Environmental Contamination and Toxicology* 21, pp. 126-134.
- (18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comparative methods. *Proc. Royal Society of London. Series B*. 252 pp. 231-236.
- (19) Ghillebaert F., Chaillou C., Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects at three pH levels of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, pp. 19-28.
- (20) US EPA (1991). Guidelines for Culturing Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- (21) US EPA (1991) Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991. EPA, Duluth.
- (22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10. pp. 1189-1203.
- (23) Calow P. (1993). *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwells. Oxford. Vol. 1. Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- (24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- (25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development. In: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., *Fish Physiology*, Vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

1A táblázat

Tesztelésre javasolt halfajok

Édesvízi fajok

Oncorhynchus mykiss

Szivárványos pisztráng (9) (16)

Danio rerio

Zebrahal (7) (17) (18)

Cyprinus carpio

Ponty (8) (19)

Oryzias latipes

Medaka (20) (21)

Pimephales promelas

Nagyfejű cselle (8) (22)

1B táblázat

Más, tesztelésre használható, jól dokumentált fajok

Édesvízi fajok	Tengeri fajok
Carassius auratus Ezüstkárász (8)	Menidia peninsulae (nincs magyar neve) (23) (24) (25)
Lepomis macrochirus Nagy naphal (8)	Clupea harengus Hering (24) (25)
	Gadus morhua Tőkehal (24) (25)
	Cyprinodon variegatus Tarka fogasponty (23) (24) (25)

*1. Melléklet**Útmutató a zebrahal (brachydanio rerio) embriókkal és szikzacskós lárvákkal végezhető toxicitási tesztek kivitelezéséhez**Bevezetés*

A zebrahal az indiai Coromandel-partról származik, ahol gyors folyású patakokban él. A potyfélék családjába tartozó zebrahal közönséges akváriumi hal, melynek tartásával és tenyésztésével kapcsolatos információk megtalálhatók a trópusi halakról szóló standard referenciakönyvekben. Biológiáját és felhasználását a halászati kutatásban Laale (1) foglalta össze.

A hal testhossza ritkán haladja meg a 45 mm-t. A hengeres testen 7–9 fémes-sötétkék vízszintes sáv húzódik. A mintázat a farokúszón és a farok alatti úszón folytatódik. A hát sárgászöld színű. A hímek karcsúbbak, mint a nőstények. A nőstények ezüstösebb színűek, és a hasuk – különösen ívás előtt – szélesebb, mint a hímeké.

A kifejlett zebrahalak nagy hő-, pH- és vízkeménység-ingadozásokat is képesek elviselni. Egészséges, jó minőségű ikrát rakó halakat nyereséhez optimális körülményeket kell biztosítani.

Az ívás során a hímek kergetik és fejükkel bökdösik a nőstényeket. Amint az ikrák kiperéselődtek, a hímek rögtön megtermékenyítik azokat. Az átlátszó, nem letapadó ikrák az akvárium aljára hullanak, ahol a felnőtt egyedek felfalhatják őket. Az íváásra a fény is hatással van. Ha megfelelő a reggeli megvilágítás, a halak a napkelte utáni órákban ívnak.

Egy nőstényből, heti időközönként ívatva, alkalmanként több száz ikra is nyerhető.

A tenyészhalak tartásának, szaporításának és a korai fejlődési stádiumokban levő egyedek tartásának feltételei

Válasszunk ki megfelelő számú egészséges halat, és az ívatás előtti két hétben tartsuk őket megfelelő tulajdonságokkal rendelkező vízben (lásd a 4. mellékletet). A halakat engedjük legalább egyszer szaporodni, mielőtt ikráikat a tesztekhez felhasználnánk. Ebben az időszakban a halak egyedsűrűsége nem haladhatja meg az 1 g/l-t. Gyakori vízcserre vagy tisztító berendezések használata esetén nagyobb egyedsűrűség is lehetséges. A tartályban a víz hőmérsékletét a 25 ± 2 °C tartományban kell tartani. A halakat változatos táplálékkal kell etetni. Ez állhat például megfelelő, kereskedelemben kapható száraz eledelből, frissen kikelt, élő sóféregből, árvaszúnyoglárvából, Daphniából és televényférgekből (Enchytraeidae).

Az alábbiakban két olyan eljárást ismertetünk, melyekkel egy teszt beállításához elegendő számú, egészséges, megtermékenyített ikra nyerhető.

(i) Nyolc nőstényt és tizenhat hímeket egy 50 liter hígítóvíz tartalmazó, közvetlen fénysugárzástól védett tartályba helyezünk, és 48 órán át – ha csak lehetséges – nem nyúlunk hozzá. A teszt indítása előtti délután az akvárium aljára ívató tálcát helyezünk. Az ívató tálca egy 5–7 cm magas, megfelelő anyagból (plexiüvegből vagy más erre alkalmas anyagból) készült keretből áll, melyre felül egy durva, 2–5 mm pórusméretű, alul pedig egy finom, 10–30 µm pórusméretű szitaszövetet erősítettünk. Szétbontott nejlonköttelekből készült „ívató fákot” erősítünk a nagyobb pórusméretű háléhoz. Miután a halakat 12 órán át sötétben tartottuk, gyenge fényel megvilágítjuk őket, ez megindítja az ívást. 2–4 órával az ívás után az ívató tálcát kivesszük, és az ikrákat összegyűjtjük. Az ívató tálca használata megvédi az ikrákat attól, hogy a felnőtt állatok elfogyasszák, és megkönnyíti az ikrák összegyűjtését. A halakat legalább egyszer ívatni kell azelőtt, mielőtt ikráikat teszteléshez használjuk.

(ii) 5–10 db hím és nőstény halat legalább két hétig az ívatás előtt egyedenként elkülönítve tartunk. 5–10 nap után a nőstények hasa megduzzad, és az ivarnyílás környéke kidudorodik. A hímeken ez nem látható. Az ívatást a fentiekhez hasonló, ívató tálcás akváriumban végezzük. Az akváriumot hígítóvízzel olyan magasságig töltjük, hogy a víz a hálót 5–10 cm-rel ellepje. A tervezett ívás előtt egy nappal egy nőstényt és két hímeket helyezünk a vízbe. A víz hőmérsékletét fokozatosan 1 °C-kal az akklimatizálási hőmérséklet fölé emeljük. A megvilágítást kikapcsoljuk, és az akváriumot – amennyire csak lehet – nyugodt körülmények között állni hagyjuk. Reggel az akváriumot gyenge fényel megvilágítjuk, melynek hatására megkezdődik az ívás. 2–4 óra után a halakat kivesszük és az ikrákat összegyűjtjük. Ha több ikrára van szükség, mint amennyi egy nőstényből nyerhető, párhuzamosan több ívató medencét is használhatunk. Ha a teszt előtt feljegyezzük az egyes nőstények szaporodási sikerét (az ikrák száma és minősége alapján), az ívatáshoz ki tudjuk választani a legsikeresebb egyedeket.

Az ikrákat a tesztedényekbe legalább 4 mm belső átmérőjű, gumiballonnal ellátott üvegsővel tesszük át. Az ikrákkal átvitt víz mennyisége a lehető legkisebb legyen. Az ikrák sűrűsége nagyobb, mint a vízé, tehát az ikrák lesüllyednek, és így jutnak ki a csőből. Figyelmet kell fordítani arra, hogy az ikrák (lárvák) a levegővel ne érintkezzenek. Minden adag felhasználásra kerülő ikrából mintát kell venni, és mikroszkóppal meg kell vizsgálni, hogy a rendellenességek jelenlétét kizárjuk a korai fejlődési stádiumokban. Az ikrákat fertőtleníteni nem szabad.

Az ikrák pusztulási aránya a megtermékenyítést követő 24 órában a legnagyobb. Az 5–40%-os pusztulás gyakori ebben az időszakban. A meg nem termékenyült, illetve rendellenesen fejlődő ikrák degenerálódnak. Minden adag ikra minősége a nősténytől függ. Egyes nőstényekből stabilan jó minőségű ikrák nyerhetők, míg más egyedekből soha. Az ikrák fejlődési üteme és a kelési eredmény is adagról adagra változik. A sikeresen megtermékenyített ikrák és a belőlük kikelő szikzacskós lárvák túlélési aránya magas, általában 90% feletti. 25 °C-on a lárvák a megtermékenyítés után 3–5 napon belül kikelnek, szikzacskójuk pedig körülbelül a megtermékenyítést követő 13. napra szívódik fel.

Az embrionális fejlődést Hisaoka és Battle részletesen leírta (2). Mivel az ikrák és a frissen kikelt lárvák átlátszóak, a halak fejlődése követhető, és az esetleges torzfejlődés is megfigyelhető. Körülbelül négy órával az ívás után a meg nem termékenyített ikrák már megkülönböztethetők a termékeny ikráktól (3). Ehhez a vizsgálathoz az ikrákat kis térfogatú tesztedényekbe helyezzük, és mikroszkóp alatt tanulmányozzuk.

A korai egyedfejlődési stádiumokra vonatkozó tesztkörülmények a 2. mellékletben találhatóak. A hígítóvíz optimális pH-értéke 7,8, az optimális vízkeménység pedig 250 mg CaCO₃/l.

Számítások és statisztika

Célszerű kétlépéses megközelítést alkalmazni. Az első lépésben a mortalitási adatok, a rendellenes fejlődésre vonatkozó adatok és a kelési idők statisztikai analízisét végezzük el. Ezután azon koncentrációk esetében, ahol az előbb említett adatok egyike sem mutat ki károsító hatást, elvégezzük a testhosszadatok statisztikai értékelését. Tanácsos ezt a megközelítést alkalmazni, mivel a tesztanyag specifikusan elpusztíthatja a kisebb egyedeket, meghosszabbíthatja a kelési időt, illetve torzfejlődést indukálhat, amely így torzított hosszmerési eredményekhez vezet. Továbbá a teszt statisztikájának érvényessége érdekében kezelésként körülbelül azonos számú halat kell lemérni.

Az LC₅₀ és az EC₅₀ meghatározása

Az életben maradt embriók és lárvák százalékos arányát kiszámítjuk, és az Abbott-képlet szerint a kontroll mortalitási értékeivel korrigáljuk (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right),$$

ahol

P = korrigált százalékos túlélés,

P' = megfigyelt százalékos túlélés a teszt koncentrációnál,

C = százalékos túlélés a kontrollban.

Amennyiben lehetséges, az LC₅₀ értékét megfelelő módszerrel becsüljük a teszt végén.

Ha az EC₅₀ statisztikájába a morfológiai rendellenességeket is bele akarjuk számítani, Stephan útmutatását követjük (5).

A NOEC és a LOEC becslése

Ennek a toxicitási tesztnek egyik célja a nullától különböző teszt koncentrációk hatásának összehasonlítása a kontroll értékeivel, azaz a LOEC meghatározása. Ezért ehhez a többszörös összehasonlítási módszereket kell alkalmazni (6) (7) (8) (9) (10).

Irodalom

- (1) Laale H. W., (1977), The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. *J. Fish Biol.* 10, pp. 121-173.
- (2) Hisaoka K. K., and Battle H. I., (1958), The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) *J. Morph.* 102, 311 pp.
- (3) Nagel R. (1986) Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabarbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). *Journal of Applied Ichthyology* 2, pp. 173-181.
- (4) Finney D. J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.
- (5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*. ASTM STP 766. J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop. eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.
- (6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp. 1096-1121.
- (7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics*. 20, pp. 482-491.
- (8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *Biometrics*. 27, pp. 103-117.
- (9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics* 28. pp. 519-531.
- (10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.

2. Melléklet

A javasolt halfajokra vonatkozó tesztelési körülmények, időtartamok és túlélési követelmények

Fajok	Hőmérséklet (°C)	Sótartalom (%)	Megvilágítás (órák)	A fejlődési stádiumok hossza (órák)		A teszt átlagos időtartama	A kontroll túlélése (minimum, %)	
				Embrió	Szikzacskós lárva		Kelési eredmény	A lárvák túlélése
ÉDESVÍZI FAJOK								
Danio rerio Zebrahal	25 ± 1	–	12–16	3–5	8–10	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 5. napig (8–10 nap)	80	90
Oncorhynchus mykiss Szivárványos pisztráng	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ⁽³⁾	30–35	25–30	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 20. napig (50–55 nap)	66	70
Cyprinus carpio Ponty	21–25	–	12–16	5	>4	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 4. napig (8–9 nap)	80	75
Oryzias latipes Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12–16	8–11	4–8	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 5. napig (13–16 nap)	80	80
Pimephales promelas Nagyfejű cselle	25 ± 2	–	16	4–5	5	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 4. napig (8–9 nap)	60	70
⁽¹⁾ Embriókra vonatkozó adat. ⁽²⁾ Lárvákra vonatkozó adat. ⁽³⁾ Az embriókat és kikelésük után a lárvákat – a megfigyelés időtartamát leszámítva – egy hétig sötétben tartjuk. A teszt további időtartama alatt tompa megvilágítást alkalmazunk.								

3. Melléklet

Más, jól dokumentált halfajokra vonatkozó tesztelési körülmények, időtartamok és túlélési követelmények

Fajok	Hőmérséklet (°C)	Sótartalom (%)	Megvilágítás (órák)	A fejlődési stádiumok időtartama (órák)		A teszt időtartama	A kontroll túlélése (minimum, %)	
				Embrió	Szikzacskós lárva		Kelési eredmény	A lárvák túlélése
ÉDESVÍZI FAJOK								
Carassius auratus Ezüstkárász	24 ± 1	–	–	3–4	> 4	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 4. napig (7 nap)	–	80
Lepomis macrochirus Nagy naphal	21 ± 1	–	16	3	> 4	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 4. napig (7 nap)	–	75
TENGERI FAJOK								
Menidia peninsulæ (nincs magyar neve)	22–25	15–22	12	1,5	10	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 5. napig (6–7 nap)	80	60
Clupea harengus Hering	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 3. napig (23–27 nap)	60	80
Gadus morhua Tökehal	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 3. napig (18 nap)	60	80
Cyprinodon variegatus Tarka fogasponty	25 ± 1	15–30	12	–	–	A megtermékenyítés utáni legközelebbi lehetséges időponttól (korai gasztrula stádium) a kelés utáni 4. ill. 7. napig (28 nap)	> 75	80

4. Melléklet

A megfelelő hígítóvíz néhány kémiai tulajdonsága

Anyag	Koncentráció
Lebegőanyag	< 20 mg/l
Összes szerves szén	< 2 mg/l
Nem ionizált formájú ammónia	< 1 µg/l
Maradék klór	< 10 µg/l
Szerves foszfortartalmú peszticidok	< 50 ng/l
Szerves klórtartalmú peszticidok és poliklórozott bifenilek	< 50 ng/l
Összes szerves klór	< 25 ng/l

C.16. HÁZIMÉH AKUT ORÁLIS TOXICITÁSI TESZT

1. MÓDSZER

Ez az akut toxicitási teszt módszer megegyezik az OECD TG 213 (1998) módszerrel.

1.1. Bevezetés

Ez a toxicitási teszt egy olyan laboratóriumi módszer, amelyben kifejlett dolgozó méheken vizsgálható a növényvédő szerek és más vegyi anyagok akut orális toxicitása.

Egyes vegyi anyagok toxikus tulajdonságainak meghatározásakor és értékelésekor szükséges lehet az anyag méhekre kifejlett, akut orális toxikus hatásának vizsgálata is, például olyan esetekben, amikor valószínűsíthető, hogy a méhek az adott anyaggal kontaktusba kerülnek. Az akut orális toxicitási teszt célja a peszticidok és más vegyi anyagok méheken kifejlett inherens toxicitásának meghatározása. A teszt eredményeit annak megállapítására használjuk, hogy van-e szükség további minősítésre. Ez a módszer különösen azokban a többlépcsős programokban használható jól, melyekben a peszticidok méhekre kifejlett hatását először a laboratóriumban, majd részlegesen terepen, végül terepen vizsgálják (1). A peszticidok vizsgálhatók hatóanyagként vagy formulázott terméként is.

A méhek érzékenységének és a vizsgálat megfelelő kivitelezésének megfelelőségét toxikus referenciaanyag használatával kell igazolni.

1.2. Definiciók

Akut orális toxicitás: egyszeri, orálisan adott tesztanyag-dózis maximum 96 órán belül jelentkező, károsító hatása.

Dózis: az elfogyasztott tesztanyag mennyisége. A dózist µg tesztanyag/egyed egységekben fejezzük ki. Az egyes méheknek adott tesztanyag-dózis nem számítható ki pontosan, mivel az állatokat együtt etetjük, de az átlagos dózis becsülhető (összes elfogyasztott tesztanyag/a méhek száma egy dobozban).

Orális LD₅₀ (közepes halálos dózis): statisztikai eljárással kiszámított dózis, amely azt az egy alkalommal, orálisan adott tesztanyag mennyiséget jelenti, amely a tesztállatok 50%-ának pusztulását okozza. Az LD₅₀-et µg tesztanyag/egyed egységekben fejezzük ki. Peszticidok esetében a tesztanyag lehet hatóanyag, de egy vagy több hatóanyagot tartalmazó, formulázott termék is.

Mortalitás: a teljesen mozgásképtelen állatot tekintjük elpusztultnak.

1.3. A módszer elve

A kifejlett háziméh (*Apis mellifera*) dolgozókat a tesztanyag – cukoroldatba kevert – különböző töménységű oldataival etetjük. Ezután a méheket tesztanyagot nem tartalmazó cukoroldattal tápláljuk. A mortalitást legalább 48 óra elteltéig naponta feljegyezzük, és a kontroll értékeihez viszonyítjuk. Ha a pusztulási arány 24 és 48 óra között is növekszik, és a kontroll pusztulási értékei az elfogadható tartományban maradtak (10% alatt), célszerű a teszt időtartamát – legfeljebb 96 óráig – meghosszabbítani. Az adatokat elemezzük, és kiszámítjuk a 24 és 48 órás LD₅₀ értékeket, illetve – ha a teszt időtartamát meghosszabbítottuk – a 72 és 96 órás LD₅₀ értékeket.

1.4. A teszt érvényessége

A teszt akkor érvényes, ha az alábbi feltételek teljesülnek:

- a kontrollok átlagos pusztulási aránya a teszt végén nem haladja meg a 10%-ot,
- a toxikus referenciaanyag LD₅₀-értéke a meghatározott tartományban van.

1.5. A módszer leírása

1.5.1. A méhek begyűjtése

A teszthez azonos eredetű (ti. azonos korú, tápláltsági állapotú stb.), fiatal, kifejlett dolgozó méheket kell használni. A méheket lehetőleg ismert „előéletű” és fiziológiai állapotú, megfelelően táplált, és – amennyire csak lehetséges – betegségektől mentes, királynővel rendelkező kolóniákból kell nyerni. A méheket felhasználásuk napján reggel vagy a teszt kezdete előtti este gyűjtjük be. Az utóbbi esetben az állatokat másnapig a teszt körülményei között tartjuk őket. Az utódokat nem tartalmazó keretekről gyűjtött egyedek megfelelőek. A begyűjtést lehetőleg ne kora tavasszal vagy késő ősszel végezzük, mert ilyenkor a méhek megváltozott fiziológiai állapotban vannak. Ha a tesztet mégis kora tavasszal, illetve késő ősszel kell elvégezni, az állatokat inkubátorba téve elő lehet csalogatni. Ezeket egy hétig lépből gyűjtött pollennel és cukros vízzel kell etetni. A vegyi anyagokkal, például antibiotikummal, méhatka elleni szerekkel stb. kezelt méheket az utolsó kezelés befejezése utáni négy héten belül nem szabad felhasználni.

1.5.2. A méhek elhelyezésének és táplálásának feltételei

Könnyen tisztítható, jól szellőző dobozokat használunk. Ezek bármilyen, a célnak megfelelő anyagból készülhetnek, mint például rozsdamentes acél, drótháló, műanyag, de eldobható, fából készült dobozok is használhatók. Célszerű a dobozokba 10-10 méhet helyezni. A teszt dobozok mérete az állatok számának megfelelő legyen, hogy megfelelő nagyságú tér álljon a rendelkezésükre.

A teszthelyiségben a méheket sötétben, 25 ±2 °C-on tartjuk. A relatív páratartalmat, mely általános esetben 50–70%, az egész teszt folyamán regisztráljuk. A méhek kezelése és vizsgálata végezhető világosban (nappali fény mellett). Az állatokat 500 g/l végkoncentrációjú (50%-os) cukoroldattal etetjük. A meghatározott tesztanyag mennyiségét tartalmazó táplálékot az állatoknak adhatjuk tetszés szerinti módon. Az etetőrendszert úgy kell kialakítani, hogy az elfogyasztott táplálék mennyiségét minden dobozban mérni lehessen (lásd az 1.6.3.1. részt). Erre a célra megfelelő egy körülbelül 50 mm hosszú és 10 mm széles, a nyitott végén 2 mm-re szűkített üvegcső.

1.5.3. A méhek előkészítése

A begyűjtött méheket a dobozokban véletlenszerűen osztjuk el, és a dobozokat a teszthelyiségben szintén véletlenszerűen helyezzük el.

A méhek – legfeljebb 2 órán át – éhezethetők a teszt kezdete előtt. A kezelés előtt a méhek etetését célszerű bizonyos ideig szüneteltetni, hogy a méhek béltartalma megközelítőleg azonos mennyiségű legyen a teszt kezdetén. A haldokló méheket nem használjuk fel, hanem ezeket a teszt kezdete előtt egészséges egyedekkel helyettesítjük.

1.5.4. A dózisok elkészítése

Ha a tesztanyag oldható vízben, közvetlenül belekeverhetjük az 50%-os cukoroldatba. A vízben rosszul oldódó anyagok és ipari termékek esetében a méhekre kevésbé toxikus segédanyagok, például szerves oldószerek, emulgeáló- vagy diszpergálószer (pl. aceton, dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid) használhatók. A segédanyag koncentrációja a tesztanyag oldhatóságától függ, és minden tesztoldatban azonos koncentrációban kell jelen lennie. Általában az 1%-os segédanyag-koncentráció megfelelő, és ezt az értéket nem szabad túllépni.

Megfelelő kontroll oldatokat is készítünk. Ha a tesztoldatok készítéséhez oldószert vagy diszpergálószer is használtunk, kétféle kontrollt alkalmazunk: az egyik vízzel készült cukoroldat, a másik pedig olyan cukoroldat, amely a segédanyagot a tesztoldatokéval azonos koncentrációban tartalmazza.

1.6. A teszt kivitelezése

1.6.1. Teszt- és kontroll csoportok

A dózisok és a párhuzamos vizsgálatok számát úgy kell meghatározni, hogy az megfeleljen az LD₅₀ – 95%-os konfidencia határokkal történő – meghatározásához szükséges statisztikai követelményeknek. A teszthez általában öt, olyan mértani sorozatot alkotó koncentrációt kell kiválasztani, melynek szorzótényezője nem nagyobb, mint 2,2, és amely lefedi az LD₅₀ tartományát. A hígítási tényezőt és a koncentrációk számát a hatásgörbe (pusztulás a dózis függvényében) meredekségével összefüggésben, az eredmények analízisére kiválasztott statisztikai módszer figyelembevételével kell meghatározni. Egy előzetes vizsgálat eredményei segítséget nyújtanak a megfelelő koncentráció tartomány kiválasztásához.

Mind egyik tesztanyag dózissal legalább három párhuzamos, egyenként 10-10 méhet tartalmazó csoportot kezelünk. A teszt sorozattal párhuzamosan legalább három, 10-10 méhet tartalmazó kontroll csoportot is beállítunk. Ha szükséges (lásd az 1.5.4. részt), külön oldószeres/segédanyagos kontrollokat is alkalmazunk.

1.6.2. Toxikus referenciaanyag

A teszt sorozattal párhuzamosan egy, a toxikus referenciaanyagot tartalmazó sorozatot is be kell állítani. A sorozat legalább három olyan koncentrációból álljon, amelyek lefedik a LD₅₀ várható értékét. Minden dózist legalább három, 10-10 méhet tartalmazó párhuzamosban kell vizsgálni. A javasolt toxikus referenciaanyag a dimetoát, melynek 24 órás

orális LD₅₀ értéke a 0,10–0,35 µg hatóanyag/egyed tartományba esik. Más toxikus referenciaanyagok is használhatók, ha megfelelő mennyiségű adat áll rendelkezésre, melyek a várható dózisfüggő hatást igazolják (pl. parathion).

1.6.3. Expozíció

1.6.3.1. A tesztanyag adagolása

Minden csoport méhnek 100–200 µl, a tesztanyagot megfelelő koncentrációban tartalmazó, 50%-os cukoroldatot kell adni. A rosszul oldódó, kevésbé toxikus vagy a formulázásból adódóan alacsony hatóanyag-tartalmú termékek esetén nagyobb mennyiséget kell adni, mivel ezeket nagyobb arányban kell a cukoroldatba keverni. A csoportok által fogyasztott kezelt tápanyag mennyiségét monitorozni kell. Ha elfogyott a kezelt tápanyag (általában 3–4 óra után), az etetőt kivesszük, és egy, csak cukoroldatot tartalmazó etetőt teszünk a helyére. Ezután a cukoroldatot korlátozás nélkül adagoljuk. Bizonyos anyagok esetében a magasabb koncentrációjú tesztoldatokat a méhek visszautasítják, vagy csak nagyon keveset fogyasztanak belőle. Ebben az esetben legkésőbb hat óra múltán a kezelt táplálékot tartalmazó etetőt egy csak cukoroldatot tartalmazó etetőre kell kicserélni. A megmaradt tesztoldat mennyiségét (pl. térfogat- vagy tömegméréssel) meghatározzuk.

1.6.3.2. A teszt időtartama

A teszt a tesztoldat tiszta cukoroldatra cserélése után lehetőleg 48 óráig tart. Ha a mortalitás több mint 10%-kal nő az első 24 óra után, a teszt időtartamát – legfeljebb 96 órára – meg kell hosszabbítani, feltéve, hogy a kontrollban a mortalitás nem haladja meg a 10%-ot.

1.6.4. Megfigyelések

A mortalitást a teszt kezdete (a tesztanyag adása) után a 4., a 24. és a 48. órában feljegyezzük. Amennyiben hosszabb megfigyelési időszakra van szükség, a leolvasást legfeljebb a 96. óráig 24 óránként végezzük, feltéve, hogy a kontrollban a mortalitás nem haladja meg a 10%-ot.

Meg kell becsülni a csoportok által elfogyasztott táplálék mennyiségét. A kezelt és kezeletlen táplálék adott 6 órán belüli fogyása közti különbség információt szolgáltat arról, hogy a kezelt táplálék ízlik-e a méheknek.

Minden viselkedési rendellenességet, amely a teszt időtartama alatt jelentkezik, fel kell jegyezni.

1.6.5. Tűrőteszt

Bizonyos esetekben (pl. mikor a tesztanyag toxicitása várhatóan alacsony) tűrőtesztet is végezhetünk egyetlen, 100 µg hatóanyag/egyed dózis alkalmazásával, annak demonstrálására, hogy az LD₅₀ nagyobb, mint ez az érték. A tesztet a fentiekben ismertetett módon végezzük, beleértve a három párhuzamos, a megfelelő kontrollok és a toxikus referenciaanyag alkalmazását és az elfogyasztott kezelt táplálék mennyiségének meghatározását. Ha pusztulást tapasztalunk, teljes tesztet kell beállítani. Ha szubletális hatások jelentkeznek (lásd az 1.6.4. részt), azokat fel kell jegyezni.

2. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

2.1. Vizsgálati adatok

Az adatokat táblázatos formában összegezni kell. A táblázatban fel kell tüntetni a tesztanyaggal kezelt csoportokban, a kontrollokban és a toxikus referenciaanyaggal kezelt csoportokban felhasznált méhek számát, a megfigyelési időpontokban az elpusztult, illetve a rendellenes viselkedést mutató egyedek számát. A mortalitási adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel elemezzük (pl. probitanalízis, mozgó átlag, binomiális valószínűség) (3) (4). Ábrázoljuk a javasolt megfigyelési időpontokra vonatkozó hatásgörbéket, kiszámítjuk a görbék meredekségét és – 95%-os konfidencia határok mellett – az LD₅₀ értékét. A kontrollok mortalitási adatait figyelembe vevő korrekciót Abbott módszerével végezzük (4) (5). Ha a méhek nem fogyasztották el teljesen a kezelt táplálékot, meg kell határozni a csoportok szervezetébe jutott tesztanyag mennyiségét. Az LD₅₀ értékét µg tesztanyag/egyed egységben fejezzük ki.

2.2. Vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati jegyzőkönyvnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

2.2.1. A tesztanyag

– az anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. stabilitás vízben, gőznyomás),
– kémiai azonosító adatok, beleértve az anyag képletét és a tisztaságára vonatkozó adatokat is (peszticidok esetében a hatóanyag(ok) azonosítását és koncentrációját).

2.2.2. A tesztállatok

– a faj tudományos neve, az állatok származása és hozzátvetőleges kora (hetekben kifejezve), a begyűjtés módja és időpontja,

– a kolóniákra vonatkozó információk, ahonnan a begyűjtött állatok származnak: egészségi állapot, bármilyen kifejtett kori betegség, esetleges előkezelés stb.

2.2.3. A teszt körülményei

– a teszthelyiség hőmérséklete és relatív páratartalma,

– a méhek elhelyezésének módja, beleértve a dobozok típusát, anyagát és méretét is,

- a törzsoldat és a tesztoldatok készítésének módszerei (az alkalmazott oldószer nevét és koncentrációját is meg kell adni),
 - a törzsoldatok készítésének módja és az újrakészítés gyakorisága (az alkalmazott oldószer nevét és koncentrációját is meg kell adni),
 - a teszt elrendezése, pl. a tesztkoncentrációk és a kontrollok száma, a párhuzamosok száma tesztkoncentrációnként és a kontrollban, a méhek száma dobozonként stb.,
 - a teszt időpontja.
- 2.2.4. Az eredmények
- az előkísérlet eredményei, amennyiben végeztünk ilyet,
 - a nyers adatok: az elpusztult egyedek száma minden tesztkoncentrációban és megfigyelési időpontban,
 - a hatásgörbék grafikus ábrázolása a teszt végén,
 - a tesztanyagra és a toxikus referenciaanyagra vonatkozó LD₅₀ értékek 95%-os konfidencia határok mellett, minden javasolt megfigyelési időpontban,
 - az LD₅₀ meghatározásához használt statisztikai módszer,
 - mortalitás a kontrollokban,
 - egyéb mért vagy megfigyelt biológiai hatás a méhekben, pl. rendellenes viselkedés (ideértendő a tesztoldat visszautasítása is), a táplálék fogyasztásának mértéke a kezelt és kezeletlen csoportokban,
 - bármilyen, a fent ismertetett eljárástól való eltérés, és az egyéb, releváns információk.

3. IRODALOM

- (1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.
- (2) Gough, H. J., McIndoe E. C., Lewis, G. B., (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.
- (3) Litchfield J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments.. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.
- (4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- (5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

C.17. HÁZIMÉH AKUT KONTAKT TOXICITÁSI TESZT

1. MÓDSZER

Ez az akut toxicitási teszt módszer megegyezik az OECD TG 214 (1998) módszerrel.

1.1 Bevezetés

Ez a toxicitási teszt egy olyan laboratóriumi módszer, melyben kifejtett dolgozó méheken vizsgálható a növényvédő szerek és más vegyi anyagok akut kontakt toxicitása.

Egyes vegyi anyagok toxikus tulajdonságainak meghatározásakor és értékelésekor szükséges lehet az anyag méhekre kifejtett, akut kontakt toxikus hatásának vizsgálata is, például olyan esetekben, mikor valószínűsíthető, hogy a méhek az adott anyaggal érintkezésbe kerülnek. Az akut kontakt toxicitási teszt célja a peszticidek és más vegyi anyagok méheken kifejtett inherens toxicitásának meghatározása. A teszt eredményeit annak megállapítására használjuk, hogy van-e szükség további minősítésre. Ez a módszer különösen azokban a többlépcsős programokban használható jól, melyekben a peszticidek méhekre kifejtett hatását először a laboratóriumban, majd részlegesen terepen, végül terepen vizsgálják (1). A peszticidek vizsgálhatók hatóanyagként vagy formulázott terméként is.

A méhek megfelelő érzékenységét és a vizsgálat megfelelő kivitelezését toxikus referenciaanyag használatával igazolni kell.

1.2 Definíciók

Acut kontakt toxicitás: egyszeri, helyileg alkalmazott tesztanyag dózis, maximum 96 órán belül jelentkező károsító hatása.

Dózis: az alkalmazott tesztanyag mennyiség. A dózist μg tesztanyag/egyed egységekben fejezzük ki.

Kontakt LD₅₀ (közepes halálos dózis): statisztikai eljárással kiszámított dózis, amely azt az egy alkalommal adott tesztanyag mennyiséget jelenti, amellyel az érintkezés a teszttállatok 50%-ának pusztulását okozza. Az LD₅₀-et μg tesztanyag/egyed egységekben fejezzük ki. Peszticidek esetében a tesztanyag lehet egy hatóanyag, de egy vagy több hatóanyagot tartalmazó, formulázott termék is.

Mortalitás: a teljesen mozgásképtelen állatokat tekintjük elpusztultnak.

1.3 A módszer elve

A kifejlett háziméh (*Apis mellifera*) dolgozók torára megfelelő hordozóanyagban oldott tesztanyag különböző töménységű oldatait kenjük. A teszt időtartama 48 óra. Ha a pusztulási arány 24 és 48 óra között is növekszik, és a kontroll pusztulási értékei az elfogadható tartományban maradtak (10%), célszerű a teszt időtartamát legfeljebb 96 óráig meghosszabbítani. A mortalitást naponta feljegyezzük, és a kontroll értékeihez viszonyítjuk. Az adatokat elemezzük, és kiszámítjuk a 24 és 48 órás LD₅₀ értékeket, illetve – ha a teszt időtartamát meghosszabbítottuk – a 72 és 96 órás LD₅₀ értékeket.

1.3 A teszt érvényessége

A teszt akkor érvényes, ha az alábbi feltételek teljesülnek:

- a kontrollok átlagos pusztulási aránya a teszt végén nem haladja meg a 10%-ot,
- a toxikus referenciaanyag LD₅₀-értéke a meghatározott tartományban van.

1.4 A módszer leírása

1.4.1 A méhek begyűjtése

A teszthez azonos eredetű (ti. azonos korú, tápláltsági állapotú stb.), fiatal, kifejlett dolgozó méheket kell használni. A méheket lehetőleg ismert előéletű és fiziológiai állapotú, megfelelően táplált, és – amennyire csak lehetséges – betegségektől mentes, királynővel rendelkező kolóniákból kell nyerni. A méheket felhasználásuk napján reggel vagy a teszt kezdete előtti este gyűjtjük be. Az utóbbi esetben az állatokat másnapig a teszt körülményei között tartjuk őket. Az ivadékokat nem tartalmazó keretekről gyűjtött egyedek megfelelőek. A begyűjtést lehetőleg ne kora tavasszal vagy késő ősszel végezzük, mert ilyenkor a méhek megváltozott fiziológiai állapotban vannak. Ha a tesztet mégis kora tavasszal, illetve késő ősszel kell elvégezni, az állatokat inkubátorba téve elő lehet csalogatni, melyeket egy hétig lépből gyűjtött pollennel és cukros vízzel kell etetni. A vegyi anyagokkal, például antibiotikummal, méhatka elleni szerekkel stb. kezelt méheket az utolsó kezelés befejezése utáni négy héten belül nem szabad felhasználni.

1.4.2 A méhek elhelyezésének és táplálásának feltételei

Könnyen tisztítható, jól szellőző dobozokat használunk. Ezek bármilyen, a célnak megfelelő anyagból készülhetnek, mint például rozsdamentes acél, drótháló, műanyag, de eldobható, fából készült dobozok is használhatók. A teszt dobozok mérete az állatok számának megfelelő legyen, hogy megfelelő tér álljon a méhek rendelkezésére. Célszerű a dobozokba 10-10 méhet helyezni.

A teszt helyiségben a méheket sötétben, 25 ± 2 °C-on tartjuk. A relatív páratartalmat, mely általános esetben 50–70%, az egész teszt folyamán regisztráljuk. A méhek kezelése és vizsgálata végezhető világosban (nappali fény mellett). Az állatokat 500 g/l végkoncentrációjú (50%-os) cukoroldattal etetjük. A táplálékot a teszt során méhetetővel, korlátozás nélkül adagoljuk. Az etetőrendszert úgy kell kialakítani, hogy az elfogyasztott táplálék mennyiségét minden dobozban mérni lehessen. Erre a célra megfelelő eszköz egy körülbelül 50 mm hosszú és 10 mm széles, a nyitott végén 2 mm-re szűkített üvegcső.

1.4.3 A méhek előkészítése

A begyűjtött méheket széndioxiddal vagy nitrogéngázzal el lehet kábítani a tesztanyaggal való kezelés előtt. A gáz mennyiségét és alkalmazásának időtartamát minimalizálni kell. A haldokló méheket nem használjuk fel, hanem ezeket a teszt kezdete előtt egészséges egyedekkel helyettesítjük.

1.4.4 A dózisok elkészítése

A tesztanyagot megfelelő hordozóanyagban – szerves oldószerben, vagy detergenst tartalmazó vízben – oldva alkalmazzuk. A szerves oldószerek közül lehetőleg acetont használjunk, de más, a méhekre kevésbé toxikus szerves oldószerek (pl. dimetil-formamid, dimetil-szulfoxid) használata is megengedett. A vízben diszpergált formulázott termékek és az erősen poláros szerves anyagok esetében, amelyek nem oldódnak szerves oldószerekben, az oldatok könnyebben kezelhetők, ha egy kereskedelmi forgalomban levő detergens híg oldatában készítjük el őket (pl. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Megfelelő kontroll oldatokat is készíteni kell. Ha a tesztanyag oldásához oldószert vagy diszpergálószer is használunk, kétféle kontroll csoportot alakítunk ki: az egyik csoportot vízzel, a másikat pedig az oldószerezrel/diszpergálószerrel kezeljük.

1.5 A teszt kivitelezése

1.5.1 Teszt- és kontroll csoportok

A dózisos és a párhuzamos vizsgálatok számát úgy kell meghatározni, hogy megfeleljen az LD₅₀ (95%-os konfidencia határokkal történő) meghatározásához szükséges statisztikai követelményeknek. A teszthez általában öt, olyan mértani sorozatot alkotó koncentrációt kell kiválasztani, melynek szorzótényezője nem nagyobb, mint 2,2, és amely lefedi az LD₅₀ tartományát. A hígítási tényezőt és a koncentrációk számát a hatásgörbe (pusztulás a dózis függvényében) meredekségével összefüggésben, az eredmények analízisére kiválasztott statisztikai módszer figyelembevételével kell meghatározni. Egy előkísérlet eredményei segítséget nyújtanak a megfelelő koncentráció-tartomány kiválasztásához.

Mind egyik tesztanyag dózissal legalább három párhuzamos, egyenként 10-10 méhet tartalmazó csoportot kezelünk.

A teszt sorozattal párhuzamosan legalább három, 10-10 méhet tartalmazó kontroll csoportot is beállítunk. Ha szerves oldószert vagy detergenst is használunk, további három oldószerez vagy detergenst tartalmazó kontrollt is alkalmazunk.

1.5.2 Toxikus referenciaanyagok

A teszt sorozattal párhuzamosan egy, a toxikus referenciaanyagot tartalmazó sorozatot is be kell állítani. A sorozat legalább három olyan koncentrációból álljon, amelyek lefedik a LD₅₀ várható értékét. Minden dózist legalább három, 10-10 méhet tartalmazó párhuzamosban kell vizsgálni. A javasolt toxikus referenciaanyag a dimetoát, melynek 24 órás kontakt LD₅₀ értéke a 0,10–0,30 µg hatóanyag/egyed tartományba esik (2). Más toxikus referenciaanyagok is használhatók, ha megfelelő mennyiségű adat áll rendelkezésre, melyek a várható dózisfüggő hatást igazolják (pl. parathion).

1.5.3 Expozíció

1.5.3.1. A tesztanyaggal történő kezelés

Az elkábított méheket a tesztanyaggal egyenként kezeljük. A méheket véletlenszerűen választjuk ki a különböző kezelésekhöz, illetve a kontroll csoportokhoz. A tesztanyagot megfelelő koncentrációban tartalmazó oldatok 1-1 µl-ét mikroapplikátorral a méhek torának háti oldalára cseppentjük. Indokolt esetben más térfogatok is alkalmazhatók. A kezelés után a méheket a teszt dobozokba helyezzük, és cukoroldattal tápláljuk őket.

1.5.3.2. A teszt időtartama

A teszt a tesztoldat tiszta cukoroldatra cserélése után lehetőleg 48 óráig tart. Ha a mortalitás több mint 10%-kal nő az első 24 óra után, a teszt időtartamát – legfeljebb 96 órára – meg kell hosszabbítani, feltéve, hogy a kontrollban a mortalitás nem haladja meg a 10%-ot.

1.5.4 Megfigyelések

A mortalitást a teszt kezdete (a tesztanyag adása) után a 4., a 24. és a 48. órában feljegyezzük. Amennyiben hosszabb megfigyelési időszakra van szükség, a leolvasást legfeljebb a 96. óráig 24 óránként végezzük, feltéve, hogy a kontrollban a mortalitás nem haladja meg a 10%-ot.

Minden viselkedési rendellenességet, amely a teszt időtartama alatt jelentkezik, fel kell jegyezni.

1.5.5 Tűrés teszt

Bizonyos esetekben (pl. mikor a tesztanyag toxicitása várhatóan alacsony) tűrés tesztet is végezhetünk egyetlen, 100 µg hatóanyag/egyed dózis alkalmazásával, annak demonstrálására, hogy az LD₅₀ nagyobb, mint ez az érték. A tesztet a fentiekben ismertetett módon végezzük, beleértve a három párhuzamos, a megfelelő kontrollok és a toxikus referenciaanyag alkalmazását, és az elfogyasztott kezelt táplálék mennyiségének meghatározását is. Ha pusztulást tapasztalunk, teljes tesztet kell beállítani. Ha szubletális hatások jelentkeznek (lásd az 1.6.4. részt), azokat fel kell jegyezni.

2. ADATOK ÉS VIZSGÁLATI JEGYZŐKÖNYV

2.1 Vizsgálati adatok

Az adatokat táblázatos formában összegezni kell. A táblázatban fel kell tüntetni a tesztanyaggal kezelt csoportokban, a kontrollokban és a toxikus referenciaanyaggal kezelt csoportokban használt méhek számát, a megfigyelési időpontokban az elpusztult, illetve a rendellenes viselkedést mutató egyedek számát. A mortalitási adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel elemezzük (pl. probitanalízis, mozgó átlag, binomiális valószínűség) (3) (4). Ábrázoljuk a javasolt megfigyelési időpontokra (24 h, 48 h, illetve 72 h, 96 h) vonatkozó hatásgörbét, kiszámítjuk a görbék meredekségét és (95%-os konfidencia határok mellett) az LD₅₀ értékét. A kontrollok mortalitási adatait figyelembe vevő korrekciót Abbott módszerével végezzük (4) (5). Az LD₅₀ értékét µg tesztanyag/egyed egységben fejezzük ki.

2.2 Vizsgálati jegyzőkönyv

A vizsgálati jegyzőkönyvnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

2.2.1 A tesztanyag

– az anyag fizikai természete és főbb fizikai-kémiai tulajdonságai (pl. stabilitás vízben, gőznyomás),
– kémiai azonosító adatok, beleértve az anyag képletét és a tisztaságára vonatkozó adatokat is (peszticidok esetében a hatóanyag(ok) azonosítását és koncentrációját).

2.2.2. A tesztállatok

– a faj tudományos neve, az állatok származása és hozzátvetőleges kora (hetekben kifejezve), a begyűjtés módja és időpontja,

– a kolóniákra vonatkozó információk, ahonnan a begyűjtött állatok származnak: egészségi állapot, bármilyen betegség, esetleges előkezelés stb.

2.2.3. A teszt körülményei

– a teszthelyiség hőmérséklete és relatív páratartalma,
– a méhek elhelyezésének módja, beleértve a dobozok típusát, anyagát és méretét is,
– a tesztanyaggal történő kezelés módja, pl. a hordozó oldószer megnevezése, a tesztoldat térfogata és az állatok elkábításához használt anyag megnevezése,

– a teszt elrendezése, pl. a teszt dózisok és a kontrollok száma, a párhuzamosok száma teszt koncentrációnként és a kontrollban, a méhek száma dobozonként stb.,

– a teszt időpontja.

2.2.4. Az eredmények

– az előkísérlet eredményei, amennyiben végeztünk ilyet,
– a nyers adatok: az elpusztult egyedek száma minden teszt koncentrációban és megfigyelési időpontban,
– a hatásgörbék grafikus ábrázolása a teszt végén,
– a tesztanyagra és a toxikus referenciaanyagra vonatkozó LD₅₀ értékek 95%-os konfidencia határok mellett, minden javasolt megfigyelési időpontban,

– az LD₅₀ meghatározásához használt statisztikai módszer,

– mortalitás a kontrollokban,

– egyéb mért vagy megfigyelt biológiai hatás a méheken, pl. rendellenes viselkedés (ide értendő a tesztoldat visszautasítása is), a táplálék fogyasztásának mértéke a kezelt és kezeletlen csoportokban,

– bármilyen, a fent ismertetett eljárástól való eltérés, és az egyéb, releváns információk.

3. IRODALOM

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151-165. March 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe E. C., Lewis, G. B., (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981-1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.

(3) Litchfield J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments.. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99-113.

(4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265-267.

C.18. KÉMIAI ANYAGOK TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓJÁNAK/DESZORPCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA EGYENSÚLYI RENDSZERBEN

1. MÓDSZER

Ez a teszt módszer megegyezik az OECD TG 106 (2000), „A talajon történő adszorpció/deszorpció meghatározása egyensúlyi rendszerben” című módszerrel.

1.1. Bevezetés

Ez a teszt módszer egy körvizsgálat eredményein, az adszorpciós teszt kifejlesztéséhez szükséges talajok kiválasztását célzó műhelymunka eredményein (1) (2) (3) (4), valamint a már létező nemzeti irányelveken alapul (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Az adszorpciós/deszorpciós vizsgálatok segítségével nélkülözhetetlen információk nyerhetők a vegyi anyagok mobilitásáról és eloszlásáról a bioszféra talaj, víz és levegő kompartmentjeiben (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). A vizsgálatok olyan tulajdonságok előrejelzésére és becslésére is felhasználhatók, mint például egy anyag hozzáférhetősége a lebontás szempontjából (22) (23), élőlények általi felvétel és átalakítás (24), az anyag mozgása a talajprofilban (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), kipárolgás a talajból (21) (29) (30), illetve az anyag bemosódása a talajból a természetes vizekbe (18) (31) (32). Az adszorpciós adatok összehasonlító és modellezési célokra is felhasználhatók (19) (33) (34) (35).

A talajban egy vegyi anyag szilárd és folyadékfázis közti megoszlása összetett folyamat, amely számos tényezőtől függ. Függ az anyag kémiai természetétől (12) (36) (37) (38) (39) (40), a talaj tulajdonságaitól (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) és az éghajlati tényezőktől (csapadék, hőmérséklet, napsugárzás, szél). Így az a számos jelenség és mechanizmus, amelyek egy vegyi anyag talajadszorpcióját befolyásolják, egyszerűsített laboratóriumi modellekkel (mint ez a módszer is) teljes egészükben nem határozhatók meg. Ez a módszer, még ha nem is számol minden, a környezetben lehetségesen előforduló esettel, értékes információt szolgáltat a vizsgált vegyi anyag adszorpciójának környezeti jelentőségéről.

Lásd még az Általános bevezetés című részt!

1.2. A vizsgálat területei

A módszer célja a különböző vegyi anyagok talajban történő adszorpciós/deszorpciós viselkedésének becslése. Tehát egy olyan szorpciós érték meghatározása, amelynek segítségével különböző környezeti feltételek esetén az anyag megoszlása előre jelezhető. Ennek érdekében többféle talajban, a talajok tulajdonságainak függvényében (pl. szervesszén-tartalom, agyagtartalom, a talaj szerkezete és a pH) meghatározzuk az anyag egyensúlyi adszorpciós együtthatóit. Különböző talajtípusokat kell alkalmazni annak érdekében, hogy az anyag és a természetben előforduló talajok közötti interakciókat a lehető legjobban lefedjék.

Jelen módszer esetében az adszorpció a vegyi anyagoknak a talajszemcsék felületéhez való kötődésének folyamatát jelenti. Nem különbözteti meg az adszorpció különböző folyamatait (fizikai és kémiai adszorpció), de az olyan folyamatokat sem, mint a felületkatalizált lebomlás, a tömeges adszorpció vagy a kémiai reakció. A talaj kolloid méretű szemcséin (<0,2 μm) történő adszorpciót sem veszi számításba.

A talajnak az adszorpció szempontjából legfontosabbnak tartott tulajdonságai: a szervesszén-tartalom (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48), az agyagtartalom és a talaj textúrája (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48), valamint az ionizálható anyagok szempontjából a pH (3) (4) (42). A talaj egyéb tulajdonságai, amelyek egy anyag adszorpcióját/deszorpcióját befolyásolhatják, az effektív kationcserélő kapacitás (ECEC), a talaj amorf vas- és alumínium-oxid-tartalma – különösen vulkanikus és trópusi talajok esetében (4) –, és a talaj fajlagos felülete (49).

A teszt módszert úgy alakították ki, hogy alkalmas legyen különböző vegyi anyagok adszorpciós tulajdonságainak becslésére különböző szervesszén-tartalmú, agyagtartalmú, szerkezetű és pH-jú talajtípusokban. A módszer három szakaszból áll:

1. szakasz: Előzetes vizsgálatok az alábbiak meghatározására:

- talaj/oldat arány,
- az adszorpciós egyensúly beálltáig eltelt idő és a tesztanyag egyensúlyi állapotban adszorbeálódott mennyisége,
- a tesztanyag adszorpciója a tesztanyag felületén és a tesztanyag stabilitása a teszt időtartama alatt.

2. szakasz: „Screening” teszt: az adszorpciót öt különböző talajtípusban vizsgáljuk. Egyetlen koncentráció alkalmazásával vizsgáljuk az adszorpció kinetikáját, és meghatározzuk a K_d és a K_{oc} megoszlási együtthatókat.

3. szakasz: Meghatározzuk a Freundlich-féle adszorpciós izotermákat annak megállapítására, hogy a koncentráció milyen mértékben befolyásolja az anyag talajadszorpcióját.

A deszorpció vizsgálata a deszorpció kinetikájának, illetve a Freundlich-féle deszorpciós izotermák meghatározásával.

1.3. Definíciók és mértékegységek

Jelölés	Definíció	Mértékegység
A_{t_i}	adszorpciós százalék t_i időpontban	%
A_{eq}	adszorpciós százalék az adszorpciós egyensúlyban	%
$m_s^{ads}(t_i)$	a talajon adszorbeált tesztanyag tömege t_i időpontban	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	a talajon adszorbeált tesztanyag tömege Δt_i időintervallumban	μg
$m_s^{ads}(eq)$	a talajon adszorbeált tesztanyag tömege adszorpciós egyensúlyi állapotban	μg
m_0	a tesztanyag tömege a tesztcsőben az adszorpciós teszt előtt	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	a tesztanyag tömege az analízisre kivett térfogatban (V_a^A), t_i időpontban	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	a tesztanyag tömege az oldatban az adszorpciós egyensúlyi állapotban	μg
m_{talaj}	a talaj mennyisége, szárazanyagban kifejezve	g
C_{st}	a tesztanyag koncentrációja a törzsoldatban	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	a tesztanyag koncentrációja a tesztoldatban a teszt kezdetén	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	a tesztanyag koncentrációja a vizes fázisban, az analízis t_i időpontjában	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	a talaj tesztanyagtartalma adszorpciós egyensúlyi állapotban	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	a tesztanyag koncentrációja a vizes fázisban adszorpciós egyensúlyi állapotban	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	a talajjal érintkezésbe lépő vizes fázis térfogata az adszorpciós teszt kezdetén	cm^3
v_a^A	az analízisre kivett minta térfogata	cm^3
K_d	adszorpciós megoszlási együttható	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	szerves szénre vonatkoztatott adszorpciós együttható	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	szerves anyagra vonatkoztatott adszorpciós együttható	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlich-féle adszorpciós együttható	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
1/n	Freundlich-féle kitevő	
D_{t_i}	deszorpciós százalék t_i időpontban	%
$D_{\Delta t_i}$	deszorpciós százalék Δt_i időintervallumban	%
K_{des}	látszólagos deszorpciós együttható	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	Freundlich-féle deszorpciós együttható	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	a tesztanyag talajról deszorbeálódott mennyisége t_i időpontban	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	a tesztanyagnak a Δt_i időintervallumban a talajról deszorbeálódott mennyisége	μg
$m_m^{des}(eq)$	a tesztanyag analitikai módszerrel meghatározott mennyisége a vizes fázisban deszorpciós egyensúlyi állapotban	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	a tesztanyag teljes deszorbeálódott mennyisége deszorpciós egyensúlyi állapotban	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	Δt_i időintervallum után a talajon adszorbeált állapotban maradt tesztanyag mennyisége	μg

Jelölés	Definíció	Mértékegység
m_{aq}^A	a talajban a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt az egyensúlyi állapotból megmaradt tesztanyag mennyisége	μg
$C_s^{des} (eq)$	a talaj adszorbeált állapotban maradt tesztanyagtartalma deszorpció egyensúlyban	$\mu\text{g g}^{-1}$
$C_{aq}^{des} (eq)$	a tesztanyag koncentrációja a vizes fázisban a deszorpció egyensúlyban	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	a talajjal érintkezésbe kerülő vizes fázis összterfogata a „folytatásos” módszerrel végzett deszorpció kinetikai vizsgálatban	cm^3
V_R	az adszorpció egyensúly kialakulása után a csőből kivett vizes fázis mennyisége, amelyet azonos térfogatú, 0,01 M CaCl_2 -oldattal pótolunk	cm^3
V_a^D	az (i) időpontban analitikai célra kivett oldat térfogata a „folytatásos” módszerrel végzett deszorpció kinetikai vizsgálat során	cm^3
V_r^i	az (i) csőből, a tesztanyagméréshez kivett oldat térfogata a párhuzamos módszerrel végzett deszorpció kinetikai vizsgálatban	cm^3
V_r^F	deszorpció egyensúlyban a csőből a tesztanyag méréséhez kivett oldat térfogata	cm^3
MB	tömegegyensúly	%
m_E	a tesztanyagnak a talajból és a tesztedény faláról két lépésben extrahált teljes mennyisége	μg
V_{rec}	az adszorpció egyensúly kialakulása után visszanyert felülúszó térfogata	cm^3
P_{ow}	oktanol/víz megoszlási együttható	
pK_a	disszociációs állandó	
S_w	vízoldhatóság	g l^{-1}

1.4. A tesztmódszer elve

A radioaktívan jelölt vagy nem jelölt tesztanyag ismert térfogatú és koncentrációjú, 0,01 M CaCl_2 -ben készült oldatait 0,01 M CaCl_2 -vel ekvibrált, ismert száraz tömegű talajmintákhoz adjuk. A keveréket megfelelő ideig rázatjuk. A talajszuszpenziókat ezután centrifugáljuk és kivánság szerint szűrjük, majd a vizes fázist analizáljuk. A talajmintában adszorbeálódott tesztanyag mennyiségét az oldatban kezdetben jelen levő tesztanyagmennyiség és a vizsgálat végén megmaradt tesztanyagmennyiség különbségeként adjuk meg (indirekt módszer).

Másik lehetőség, hogy az adszorbeálódott tesztanyag mennyiségét a talaj analízisével közvetlenül határozzuk meg (direkt módszer). Ez a módszer – amelyben megfelelő oldószerrel a talajmintát több lépésben extrahálják – azokban az esetekben javasolt, amikor a tesztanyag koncentrációjának változása az oldatban nem határozható meg pontosan. Erre példa az az eset, amikor a tesztanyag a tesztedények falára adszorbeálódik, vagy a tesztanyag nem stabil a vizsgálat időtartama alatt, vagy a kis mértékű adszorpció miatt az oldat tesztanyag-koncentrációja csak kis mértékben változik, vagy a nagy mértékű adszorpció miatt az oldatban annyira lecsökken a tesztanyag koncentrációja, hogy pontosan már nem határozható meg. Radioaktívan jelölt tesztanyag esetében a talajextrakció elkerülhető, ha a talajmintát hevítjük, és folyadékszintillációs számlálással határozzuk meg a tesztanyag mennyiségét. A folyadékszintillációs számlálás nem specifikus technika, mivel nem tud különbséget tenni a tesztanyag és az átalakulási termékei között. Ezért célszerű ezt a módszert csak abban az esetben alkalmazni, ha a tesztanyag stabil a teszt időtartama alatt.

1.5. A tesztanyagra vonatkozó információk

Analitikai tisztaságú reagenseket kell használni. Javasolt legalább 95%-os tisztaságú, jelöletlen, ismert összetételű tesztanyagot, vagy radioaktívan jelölt, ismert összetételű, radioaktivitás szempontjából is ismert tisztaságú tesztanyagot használni. A rövid felezési idejű jelzők esetében az eredményeket a bomlási értékekkel korrigálni kell.

Az adszorpció/deszorpció teszt kivitelezése előtt a tesztanyagról az alábbi információknak kell rendelkezésre állniuk:

- az anyag vízoldhatósága (A.6),
- az anyag gőznyomása (A.4) és/vagy a Henry-törvény állandója,
- abiotikus lebomlás: hidrolízis a pH függvényében (C.7),
- megoszlási együttható (A.8),

- e) gyors biológiai lebonthatóság (C.4) vagy az anyag aerob és anaerob transzformációja a talajban,
- f) ionizálható anyag esetében a pKa,
- g) direkt fotolízis vízben (UV-VIS abszorpciós spektrum vízben, kvantumhozam), fotodegradáció a talajban.

1.6. A teszt alkalmazhatósága

A teszt olyan anyagok esetében alkalmazható, amelyek mennyiségi meghatározására megfelelő pontosságú analitikai módszerek állnak rendelkezésre. Egy fontos paraméter, amely az eredmények megbízhatóságát befolyásolja – különösen, ha az indirekt módszert alkalmazzuk –, a tesztanyag stabilitása a teszt időtartama alatt. Ezért a teszt előfeltétele a tesztanyag stabilitásának előkísérletben történő ellenőrzése. Ha az előkísérletben a teszt tervezett időtartama alatt az anyag átalakulása észlelhető, javasolt a tesztet úgy végezni, hogy a tesztanyag mennyiségét a talajban és a vizes fázisban is meghatározzuk.

A teszt kivitelezése vízben kis mértékben oldódó ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) vagy erős töltéssel rendelkező anyagok esetében nehézségbe ütközhet amiatt a tény miatt, hogy az ilyen anyagok koncentrációja a vizes fázisban nem határozható meg megfelelő analitikai pontossággal. Ilyenkor további lépések szükségesek. A módszer leírásának főbb részeiben útmutatás található az ilyen problémák kezelésére.

Illékony anyagok tesztelése során törekedni kell a veszteségek elkerülésére.

1.7. A teszt módszer leírása

1.7.1. Eszközök és reagensek

Általános laboratóriumi felszerelések, kiemelten a következők:

- a) Csövek vagy edények a vizsgálatok kivitelezéséhez. Fontos, hogy ezek a csövek
 - a centrifugába pontosan illeszkedjenek, hogy a kezeléssel és az átrakásból származó hibákat a lehető legkisebbre csökkentjük,
 - inert anyagból készüljenek, amivel minimalizáljuk a tesztanyag adszorpcióját a felületen.
- b) Rázókészülék: körforgó rázógépjel vagy ezzel egyenértékű berendezés; a készülék a rázatás során a talajt szuszpenzióban kell, hogy tartsa.
- c) Centrifuga: lehetőleg nagy sebességű (centrifugális erő $> 3000 \text{ g}$), szabályozható hőmérsékletű centrifuga, amely alkalmas a $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ -nél nagyobb átmérőjű szemcsék vizes oldatból történő ülepitésére. A tesztanyagot a rázatás és a centrifugálás során – a párolgás és a vízvesztés elkerülése érdekében – lezárva kell tartani. A tető anyagán történő adszorpció minimalizálása céljából deaktivált felszínű, például teflonbevonatú csavaros tetőt kell használni.
- d) Szabadon választható: szűrőberendezés $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ pórusméretű, steril, egyszer használatos filterekkel. Különös figyelmet kell fordítani a filterek anyagának megválasztására, hogy elkerüljük a filtereken történő tesztanyagvesztést. Rosszul oldódó tesztanyagok esetében a szerves anyagból készült filterek használata nem javasolt.
- e) Analitikai berendezések: a tesztanyag mennyiségi meghatározására alkalmas eszközök.
- f) Laboratóriumi szárítószekrény, amelyben $103\text{--}110 \text{ }^\circ\text{C}$ hőmérséklet biztosítható.

1.7.2. A talajok jellemzése és kiválasztása

A talajokat azon három paraméter szempontjából kell jellemezni, amelyek a talaj adszorptív kapacitását döntően meghatározzák. Ezek: a szervesszén-tartalom, az agyagtartalom, a talaj szerkezete, valamint a pH. Az előzőekben már említettük (lásd A vizsgálat területei című részt), hogy a talaj más fizikai-kémiai tulajdonságai is befolyásolhatják egy-egy anyag adszorpcióját/deszorpcióját, amelyeket az ilyen esetekben figyelembe kell venni.

A talajok jellemzésére használt módszerek megválasztása szignifikáns hatást gyakorolhat az eredményekre. Ezért javasolt a talaj pH-ját $0,01 \text{ M CaCl}_2$ -ben (ez azonos az adszorpció/deszorpció tesztekhez használt oldattal) meghatározni, a vonatkozó ISO-szabvány szerint (ISO-10390-1). Javasolt a talaj más jelentős tulajdonságait is a standard módszerek szerint meghatározni (pl. az ISO „A talajanalízis kézikönyve” alapján). Ez lehetővé teszi azt, hogy a szorpció adatok standardizált paramétereken alapuljanak. A talajanalízis és -jellemezés már létező standard eljárásairól útmutató található az 50–52. hivatkozásban. A talajvizsgálati módszerek kalibrációjához javasolt referenciatalajokat használni.

Az adszorpció/deszorpció vizsgálatokhoz megfelelő talajok kiválasztásához az 1. táblázat nyújt útmutatást. A hét kiválasztott talaj hét, a mérsékelt övben előforduló talajtípusnak felel meg. Ionizálható tesztanyagok esetében a kiválasztott talajoknak széles pH-tartományt kell átfogniuk, hogy az adszorpció az anyag ionizált és nem ionizált formájában is értékelhető legyen. Az arra vonatkozó útmutatás, hogy a teszt különböző stádiumaiban hányféle talajt kell használni, az 1.9. részben (A teszt kivitelezése) található.

Ha más talajtípusokat akarunk használni, azokat ugyanezen paraméterek szempontjából kell jellemezni. A talajoknak az 1. táblázatban foglaltakhoz hasonló változatosságot kell mutatniuk, akkor is, ha nem felelnek meg pontosan a kritériumoknak.

1. táblázat

Útmutató az adszorpciós/deszorpciós vizsgálatokhoz megfelelő talajok kiválasztásához

Talajtípus	pH-tartomány (0,01 M CaCl ₂ -ben)	Szervesszén-tartalom (%)	Agyagtartalom (%)	A talaj textúrája ⁽¹⁾
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	agyagos talaj
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	agyagos vályogtalaj
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	iszapos vályogtalaj
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	vályogtalaj
5	< 4,0–6,0 ⁽²⁾	< 0,5–1,5 ^{(2), (3)}	< 10–15 ⁽²⁾	vályogos homoktalaj
6	> 7,0	< 0,5–1,0 ^{(2), (3)}	40–65	agyagos vályogtalaj/ agyagos talaj
7	< 4,5	> 10	< 10	homoktalaj/vályogos homoktalaj

⁽¹⁾ A FAO és az US-rendszer alapján (85).
⁽²⁾ Az egyes változók lehetőleg a kijelölt tartományban legyenek. Ha ilyen talaj beszerzése nehézségbe ütközik, a megadott minimum alatti értékek is elfogadhatók.
⁽³⁾ A 0,3%-nál kisebb szervesszén-tartalmú talajoknál a szervesanyag-tartalom és az adszorpció közötti összefüggés meghatározása zavart szenvedhet. Ezért javasolt legalább 0,3% szerves szén-tartalmú talajokat használni.

1.7.3. A talajminták begyűjtése és tárolása

1.7.3.1. A talajminták gyűjtése

Nincs javasolt specifikus mintavételi eljárás vagy eszköz; a mintavétel technikáját a vizsgálat célja határozza meg (53) (54) (55) (56) (57) (58).

A mintavétel során az alábbiakat kell figyelembe venni:

a) szükséges a gyűjtési terület „előéletének” részletes ismerete. Ez magában foglalja a terület elhelyezkedését, növényzetét, peszticides kezelést és/vagy trágyázását, biológiai utánpótlását vagy véletlen szennyeződését. A mintavételi hely leírása tekintetében az ISO-szabványnak a talajminták vételére vonatkozó ajánlásait (ISO 10381-6) kell követni.

b) a mintavételi helyet az UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum), illetve geográfiai koordináták segítségével kell megjelölni. Ez lehetővé teszi ugyanazon talajtípus ismételt gyűjtését, és segítséget nyújthat a talaj – különböző országokban használt számos osztályozási rendszer szerinti – besorolásához is. Az A-szintből, maximum 20 cm mélységből kell a talajmintát begyűjteni. Ha a O_n-szint is jelen van, különösen a 7. számú talajtípus esetében, a mintavételbe azt is bele kell foglalni.

A talajmintákat konténerekben kell szállítani, olyan hőmérsékleti feltételek mellett, hogy az ne okozzon szignifikáns változást a talaj tulajdonságaiban.

1.7.3.2. A talajminták tárolása

Lehetőleg a terepről frissen gyűjtött talajokat használjunk. Abban az esetben, ha ez nem lehetséges, a talajt szobahőmérsékleten, levegőn szárított állapotban tároljuk. A talaj tárolhatóságának időtartama nincs korlátozva, de a három évnél hosszabb ideig tárolt talajokat felhasználás előtt szervesszén-tartalom, pH és a CEC szempontjából újból meg kell vizsgálni.

1.7.3.3. A talajminták kezelése és előkészítése a teszthez

A talajmintákat szobahőmérsékleten (lehetőleg 20–25 °C között), levegőn szárítjuk. A talaj fellazítását minimális erőhatás alkalmazásával végezzük, hogy a talaj eredeti textúrája lehető legkevésbé változzon. Ezután a talajt szitáljuk, hogy a szemcsék mérete 2 mm legyen. A szitálás folyamán a talajminták vételére vonatkozó ISO-ajánlások (ISO 10381-6) vonatkozó részeit kell követni. Ajánlott a mintákat gondosan homogenizálni, mert ez növeli az eredmények reprodukálhatóságát. A talajok nedvességtartalmát a talajból vett három mintából határozzuk meg. A három mintát 105 °C-on, tömegállandóságig (körülbelül 12 órán át) szárítjuk. A talaj tömege minden számításnál a száraz tömeget, tehát a nedvességtartalommal korrigált tömeget jelenti.

1.7.4. A tesztanyag előkészítése a teszthez

A tesztanyagot 0,01 M CaCl₂-oldatban, desztillált vagy ionmentes vízben oldjuk. A CaCl₂-oldatot használjuk vizes fázisként, mivel ez segíti a centrifugálást és minimalizálja a kationcserét. A törzsoldat koncentrációja az

alkalmazott analitikai módszer detektálási határánál lehetőleg három nagyságrenddel nagyobb legyen. Ezt a küszöbértéket kifejezetten ehhez a módszerhez, a pontos mérések biztosítása érdekében állapították meg. A törzsoldat koncentrációja nem haladhatja meg az anyag vízdoldhatósági határát.

A törzsoldatot lehetőleg a felhasználás előtt frissen kell elkészíteni, és lezárt üvegben, 4 °C-on, sötétben kell tárolni. A törzsoldat tárolásának időtartama a tesztanyag stabilitásától és az oldat koncentrációjától függ.

A kis oldhatóságú anyagok ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) esetében, mikor az anyag feloldása nehézségbe ütközik, megfelelő oldást segítő anyagok használatára lehet szükség. Az oldást segítő anyag: *a)* vízzel elegyedő anyag legyen, mint például a metanol és az acetonitril; *b)* koncentrációja nem haladhatja meg a törzsoldat teljes térfogatának 1%-át, és a talajjal érintkezésbe kerülő oldatban még kisebb mennyiség lehet jelen (lehetőleg kevesebb mint 0,1%); *c)* nem lehet felületaktív anyag, illetve nem léphet reakcióba a tesztanyaggal. Az oldást segítő anyagok használatát és annak indoklását a jegyzőkönyvben rögzíteni kell.

A gyengén oldódó anyagok esetében alkalmazható másik módszer az, hogy szerves oldószerben feloldott tesztanyagot adunk a talajból és a (desztillált vagy ionmentes vízzel készült) 0,01 M CaCl_2 -oldatból álló tesztrendszerhez („spiking”). A vizes fázis szervesoldószer-tartalmát a lehető legalacsonyabban kell tartani, és ez általános esetben nem haladhatja meg a 0,1%-ot. A szerves oldószeres oldatból történő tesztanyag-adagolás a térfogatok reprodukálhatatlanságával járhat. Tehát ez egy újabb hibaforrás beiktatását jelentheti, mivel így a tesztanyag és az oldószer koncentrációja nem lenne azonos az összes tesztben.

1.8. Az adszorpció/deszorpció teszt kivitelezésének előfeltételei

1.8.1. Analitikai módszer

A főbb paraméterek, amelyek a szorpció mérések pontosságát meghatározzák, magukban foglalják az analitikai módszer pontosságát (a tesztanyag mind az oldatban, mind az adszorbeált fázisban történő analízisének pontosságát), a tesztanyag stabilitását és tisztaságát, az adszorpció egyensúly elérését, az oldat koncentrációváltozásának nagyságát, a talaj/oldat arányt, valamint a talaj szerkezetében bekövetkező változást az egyensúly kialakulásának folyamatában (35) (59–62). Néhány, a pontossággal kapcsolatos példa ismertetése a 2. mellékletben található.

Abban a koncentrációtartományban, amely a teszt során várhatóan előfordul, az analitikai módszer megbízhatóságát ellenőrizni kell. A vizsgálatot végző személynek szabadsága kell legyen arra, hogy a célnak megfelelő pontosságú, reprodukálhatóságú, detektálási határú és visszanyerési hatékonyságú módszert dolgozzon ki. Egy ilyen teszt kivitelezésének módját az alábbiakban ismertetjük.

Megfelelő térfogatú 0,01 M CaCl_2 -oldattal (pl. 100 cm³) pl. 20 g (nagy adszorpció kapacitással rendelkező, tehát magas szervesszén- és agyagtartalmú) talajt 4 órán át rázatunk. A térfogatok és a talaj tömege az analitikai igények szerint változtatható, de kiindulásnak általában megfelel az 1:5 talaj/oldat arány. A keveréket centrifugáljuk, és a vizes fázist igény szerint szűrjük. A vizes fázishoz ezután a tesztanyag törzsoldatából olyan mennyiséget adunk, hogy a tesztanyag névleges koncentrációja a teszt során várhatóan előforduló koncentrációtartományba essen. A hozzáadott tesztanyag oldat mennyisége lehetőleg ne haladja meg a vizes fázis végtérfogatának 10%-át, hogy a pre-ekvibrációs oldat tulajdonságai a lehető legkisebb mértékben változzanak. Ezután analizáljuk az oldatot.

Az analitikai módszer műhibáinak kiszűrése és a talaj által okozott mátrixhatás ellenőrzése céljából egy talajból és CaCl_2 -oldatból álló (tesztanyagot nem tartalmazó) vakpróbát is be kell állítani.

A szorpció mérésekhez használható analitikai vizsgálómódszerek a gáz-folyadék kromatográfia (GLC), a nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC), a tömegspektrometria (pl. GC-MS, HPLC-MS) és (radioaktívan jelölt anyagok esetében) a folyadékszcintillációs számlálás. Az alkalmazott analitikai módszertől függetlenül általában a névleges értékhez viszonyított 90–110%-os visszanyerési hatékonyság megfelelő. Annak érdekében, hogy a tesztanyag koncentrációja a megoszlás kialakulása után is detektálható és értékelhető legyen, a választott analitikai módszer detektálási határának legalább két nagyságrenddel a névleges koncentráció alatt kell lennie.

A rendelkezésre álló analitikai módszer tulajdonságai és detektálási határa fontos szerepet játszanak a teszt körülményeinek és vizsgálati teljesítményének meghatározásában. A módszer az általános vizsgálati folyamatot vezeti végig, de útmutatást és ajánlásokat is tartalmaz olyan alternatív megoldásokhoz, amelyek akkor szükségesek, amikor az analitikai módszer vagy a laboratórium felszereltsége bizonyos korlátokat szab.

1.8.2. Az optimális talaj/oldat arány megválasztása

A szorpció vizsgálatokhoz megfelelő talaj/oldat arány megválasztása a K_d megoszlási együtthatótól és az adszorpció elvárt relatív mértékétől függ. A tesztanyag koncentrációváltozása az oldatban meghatározza a mérés statisztikai pontosságát, amely az adszorpció egyenlet formájától és az analitikai módszer detektálási határától függ. Ezért az általános gyakorlatban célszerű néhány előre meghatározott arányt beállítani, amelyekben az adszorbeált mennyiség több mint 20%-ot érjen el, és lehetőleg 50% felett legyen (62). Közben ügyelni kell arra, hogy a tesztanyag koncentrációja a vizes fázisban a pontos meghatározáshoz elég nagy maradjon. Ez különösen fontos a magas adszorpció százalékok esetében.

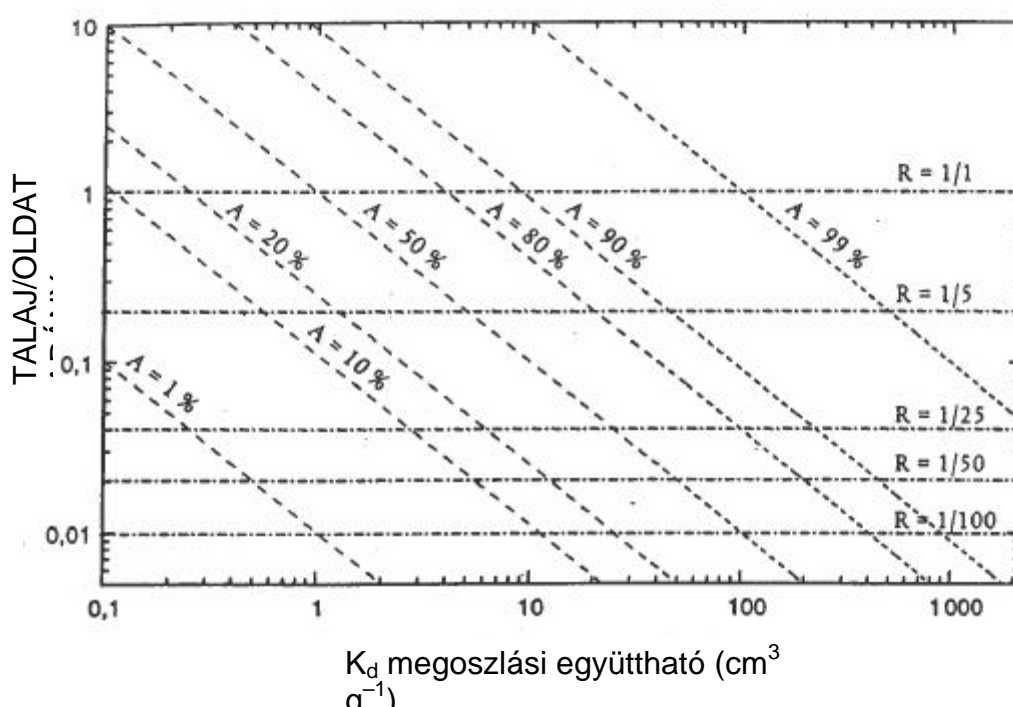
A megfelelő talaj/oldat arány kiválasztásának alkalmas megközelítése például a K_d -érték becslése előzetes vizsgálatok vagy bevett becslési technikák segítségével (3. melléklet). A megfelelő arányt ezután kiválaszthatjuk egy olyan grafikon segítségével, amely a meghatározott adszorpció százalékokra vonatkozó talaj/oldat arányt a K_d

függvényében ábrázolja (1. ábra). Ebben az esetben feltételezzük, hogy az adszorpciós egyenlet lineáris². A megfelelő összefüggést úgy kapjuk meg, ha a K_d -re vonatkozó 4. egyenletet az 1. egyenlet alakjára hozzuk:

$$\frac{V_0}{m_{\text{talaj}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(eq)} - 1 \right) K_d \quad (1.)$$

vagy logaritmusos formában fejezzük ki, feltételezve, hogy $R = m_{\text{talaj}}/V_0$ és $A_{\text{eq}}\% = \frac{m_s^{\text{ads}}(eq)}{m_0}$:

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\% / 100)}{(1 - A_{\text{eq}}\% / 100)} \right] \quad (2.)$$



1. ábra. A talaj/oldat arány és a K_d összefüggése a testanyag különböző mértékű adszorpciója esetében

Az 1. ábra a szükséges talaj/oldat arányokat a különböző mértékű adszorpciós szinteken a K_d függvényében mutatja. Például 1:5 talaj/oldat arány és 20-as K_d esetében az adszorpció körülbelül 80%-os lesz. Hogy az adszorpció azonos K_d -értékek mellett 50%-os legyen, 1:25 arány szükséges. A megfelelő arány kiválasztásának ez a megközelítése szabadságot biztosít a vizsgálatot végző személy számára, hogy a vizsgálati szükségleteknek megfelelő módszert alkalmazza.

² $C_s^{\text{ads}}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{\text{ads}}(eq)$

Nehezebben kezelhetők azok az esetek, amikor az anyag nagyon nagy vagy igen kis mértékben adszorbeálódik. Ha kis mértékű az adszorpció, 1:1 arány javasolt, bár néhány nagy szervesanyag-tartalmú talajtípus esetében kisebb arányt kell alkalmazni, hogy szuszpenziót nyerjünk. Külön figyelmet kell fordítani az analitikai metodológiára kis koncentrációkülönbségek mérésénél, különben az adszorpció meghatározása pontatlan lesz. Másfelől, nagyon magas megoszlási együtthatók (K_d) esetében 1:100 talaj/oldat arányig is fel lehet menni, hogy jelentős mennyiségű tesztanyag maradjon az oldatban. Ügyelni kell arra, hogy a keverés megfelelő legyen, és a rendszer számára elegendő időt kell biztosítani, hogy az egyensúly beálljon. A különleges esetek kezelésének másik lehetséges megközelítése – ha megfelelő analitikai metodika nem áll rendelkezésre – a K_d értékek alkalmas módszerekkel történő becslése, például a P_{ow} értékek alapján (3. melléklet). Ez leginkább a kis mértékben adszorbeálódó poláros ($P_{ow} < 20$) és a lipofil, nagy mértékben adszorbeálódó ($P_{ow} > 10^4$) anyagok esetében használható.

1.9. A teszt kivitelezése

1.9.1. A teszt körülményei

Minden vizsgálatot szobahőmérsékleten, lehetőleg 20–25 °C közötti, állandó hőmérsékleten végzünk.

A centrifugálás körülményeit úgy kell meghatározni, hogy a 0,2 µm-nél nagyobb szemcsék kiülepedjenek az oldatból. Ezek a legkisebb olyan méretű részecskék, amelyek még a szilárd részecskékhez sorolhatók, és egyben ez a szilárd és a kolloid részecskék közti különbségtétel határa. A centrifugálás körülményeinek meghatározásához a 4. melléklet nyújt útmutatást.

Ha nem áll rendelkezésre olyan centrifuga, amely a 0,2 µm-nél nagyobb szemcsék ülepedését lehetővé teszi, a centrifugálás és a 0,2 µm pórusméretű filterrel végzett szűrés kombinációja is alkalmazható. Megfelelő inert anyagból készült filtereket kell használni, hogy elkerüljük a filtereken történő tesztanyag veszteséget. Minden esetben bizonyítani kell, hogy a szűrés során tesztanyag veszteség nem lép fel.

1.9.2.1. szakasz: Előzetes vizsgálatok

Az előzetes vizsgálatok céljait A vizsgálat területei című rész foglalja össze. Az ilyen tesztek összeállításának módja az alábbiakban javasolt vizsgálati módszer leírásában található.

1.9.2.1. Az optimális talaj/oldat arány kiválasztása

Kétféle talajtípussal és háromféle talaj/oldat arányt (tehát hat vizsgálatot) állítunk be. Az egyik talajtípusnak magas a szerveszén-tartalma és alacsony az agyagtartalma, a másiknak pedig alacsony a szerveszén-tartalma és magas az agyagtartalma. Javasolt az alábbi talaj/oldat arányokat beállítani:

- 50 g talajhoz 50 cm³-t adunk a tesztanyag vizes oldatából (1:1 arány),
- 10 g talajhoz 50 cm³-t adunk a tesztanyag vizes oldatából (1:5 arány),
- 2 g talajhoz 50 cm³-t adunk a tesztanyag vizes oldatából (1:25 arány).

Azt a minimális talajmennyiséget, amellyel a vizsgálat még végrehajtható, a laboratórium felszereltsége és az analitikai módszer teljesítménye szabja meg. Javasolt legalább 1 g, illetve lehetőleg 2 g talajt használni, hogy a teszt eredményei megbízhatóak legyenek.

Egy olyan kontroll mintát is készíteni kell, amely csak a CaCl₂-oldatot és a tesztanyagot tartalmazza (talajt nem), és ezt a tesztrendszerekkel azonos kezeléseknél kell alávetni. Ennek az a célja, hogy ellenőrizzük a tesztanyag stabilitását a CaCl₂-oldatban, illetve ellenőrizzük a tesztanyagnak a tesztedények falára történő adszorpcióját.

Talajtípusonként egy-egy vakpróbát is beállítunk, amely a tesztrendszerekkel azonos mennyiségű talajt és 50 cm³ CaCl₂-oldatot tartalmaz (tesztanyagot nem), és ezt a tesztrendszerekkel azonos kezeléseknél vetjük alá. Ez háttérkontrollként szolgál az interferáló anyagok és a szennyezett talajok detektálásához az analízis során.

Az összes vizsgálatot – a kontrollokkal és a vakpróbákkal együtt – legalább két párhuzamosban kell elvégezni. A minták számát a követendő metodika szerint kell meghatározni.

Az előzetes és a fő vizsgálatok kivitelezésének módszerei általában azonosak, a fontosabb kivételeket a megfelelő helyeken említjük.

A levegőn szárított talajminták ekvilibrálását olyan módon végezzük, hogy a vizsgálat előtti napon egy éjszakán át (12 h), legalább 45 cm³ 0,01 M CaCl₂-oldattal rázatjuk őket. Ezután a tesztanyag törzsoldatából megfelelő mennyiséggel a folyadék térfogatát 50 cm³-re kiegészítjük. A hozzáadott törzsoldat mennyisége *a*) ne haladja meg az 50 cm³-es végtérfogat 10%-át, annak érdekében, hogy a lehető legkisebb mértékben változtassa meg az ekvilibrációs oldat tulajdonságait; és *b*) lehetőleg olyan, a talajjal érintkezésbe kerülő kiindulási koncentrációt (C_0) kell eredményeznie, amely legalább két nagyságrenddel nagyobb, mint az analitikai módszer detektálási határa. Ez utóbbi küszöbértéket annak érdekében rögzítették, hogy biztosítható legyen az analitikai mérések pontossága nagy mértékű (>90%) adszorpció esetén is, és később meg lehessen határozni az adszorpció izotermáit. Javasolt továbbá, amennyiben lehetséges, hogy a tesztanyag kiindulási koncentrációja (C_0) ne haladja meg az anyag oldhatósági határának 50%-át.

Az alábbiakban egy példa segítségével ismertetjük a törzsoldat koncentrációjának (C_{st}) kiszámítási módját. Ha feltételezzük, hogy az analitikai módszer detektálási határa 0,01 µg cm⁻³ és az adszorpció 90%-os, akkor a talajjal érintkezésbe kerülő tesztanyag oldat kiindulási koncentrációjának lehetőleg 1 µg cm⁻³-nek (azaz két nagyságrenddel a detektálási határ felett) kell lennie. Feltéve, hogy a törzsoldatból a rendszerhez a legnagyobb javasolt mennyiséget, azaz

5 cm³-t adunk 45 cm³ ekvibrációs CaCl₂-oldathoz (a törzsoldat így a vizes fázis 50 cm³-es végtérfogatának 10%-a), akkor a törzsoldat koncentrációja 10 µg cm⁻³ kell hogy legyen. Ez pedig három nagyságrenddel nagyobb, mint az analitikai módszer detektálási határa.

A vizes fázis pH-ját a talajjal való kontaktus előtt és után is meg kell mérni, mivel fontos szerepet játszik az adszorpció teljes folyamatában, különösen az ionizálható anyagok esetében.

A keveréket az adszorpció egyensúly beálltáig rázatjuk. Az egyensúly kialakulásának időigénye talajonként más és más, a tesztanyagtól és a talajtól is függ, de 24 óra általában elegendő (77). Az előzetes vizsgálatok végzésekor, a 48 órás ráztatás során többször mintát veszünk (például a 4., 8., 24. és a 48. órában). Az analízis időpontja már kezelhető rugalmasan, ezt a laboratórium munkarendjének megfelelően kell kijelölni.

A tesztanyag analízisére a vizes oldatban kétféle lehetőség van: a) a párhuzamos módszer és b) a „folytatásos” módszer. Hangsúlyoznunk kell azt, hogy bár a párhuzamos módszer vizsgálati szempontból „unalmasabb”, de az eredmények matematikai kezelése egyszerűbb (5. melléklet). A követendő módszer kiválasztása a vizsgálatot végző személy feladata, akinek ehhez figyelembe kell vennie a laboratórium felszereltségét és forrásait.

a) Párhuzamos módszer: egy-egy talaj/oldat aránnyal annyi mintát készítünk, ahány időpontban az adszorpció kinetika megállapításához a tesztanyag tartalmát mérni kell. Centrifugálás, és ha szükséges, szűrés után az első cső vizes fázisából például 4 óra elteltével amennyit csak lehetséges, visszanyerünk és analizáljuk. A második cső tartalmát 8 óra után, a harmadikét 24 óra után stb. dolgozzuk fel.

b) „Folytatásos” módszer: minden talaj/oldat aránnyal csak egy-egy, két párhuzamosból álló mintát készítünk. Meghatározott időpontokban a fázisok elválasztása céljából a keveréket centrifugáljuk. A vizes fázisból kivett kis mennyiségű oldat tesztanyag tartalmát azonnal meghatározzuk, és ezt követően az eredeti keverékkel folytatjuk a vizsgálatot. Ha a centrifugálás után szűrést is alkalmazunk, a laboratóriumban kis térfogatok szűrésére alkalmas eszközöknek is rendelkezésre kell állniuk. Javasolt, hogy az analízisre kivett mennyiségek össztérfogata ne haladja meg az oldat teljes térfogatának 1%-át. Ennek a kikötésnek az a célja, hogy ne változzon meg szignifikánsan a talaj/oldat arány, és ne csökkenjen a tesztanyag adszorbeálható mennyisége a teszt során.

A százalékos adszorpciót (A_t) minden egyes időpontban (t_i) a kezdeti névleges koncentráció, és a mintavétel időpontjában mért – a vakpróba értékeivel korrigált – koncentrációk alapján számítjuk ki. Az adszorpció egyensúlyi plató elérésének becslése céljából az A_t értékeket az idő függvényében ábrázoljuk (lásd az 5. melléklet 1. ábráját)³. Az egyensúlyi K_d értékét is kiszámítjuk. Ezen K_d érték alapján, az 1. ábra segítségével úgy választjuk meg a megfelelő talaj/oldat arányt, hogy a százalékos adszorpció több mint 20%-ot érjen el, és lehetőleg 50% felett legyen (61). A számításokhoz szükséges egyenletek és a grafikonok elkészítésének alapelvei az Adatok és a jegyzőkönyv című részben, illetve az 5. mellékletben találhatók.

1.9.2.2. Az adszorpció ekvibrációs idő és az egyensúlyi állapotban adszorbeált tesztanyag mennyiségének meghatározása

Mint már említettük, az A_t , illetve a C_{aq}^{ads} értékeinek az idő függvényében történő ábrázolása lehetővé teszi az adszorpció egyensúlyi plató elérésének és az egyensúlyi állapotban adszorbeált tesztanyag mennyiségének becslését. Az 5. melléklet 1. és 2. ábrája ilyen grafikonok egy-egy példáját mutatja. Az ekvibrációs időnek azt az időszakot nevezzük, amelynek során a rendszer eléri a platót.

Ha bizonyos talajok esetében nem alakul ki plató, hanem folyamatos emelkedés tapasztalható, az olyan tényezők hatásának tudható be, mint például a biodegradáció vagy a lassú diffúzió. A biodegradáció olyan módon mutatható ki, hogy a vizsgálatot sterilizált talajmintával megismételjük. Ha ebben az esetben sem sikerül platót elérni, a vizsgálatot végző személynek más, az általa végzett specifikus vizsgálatokban előforduló jelenségeket is meg kell vizsgálnia. Ezt a vizsgálati körülmények (hőmérséklet, a ráztatás időtartama, talaj/oldat arány) megfelelő módosításával lehet megtenni. A vizsgálatot végző személyre hárul annak a döntésnek a meghozása is, hogy folytatja-e a tesztet annak ellenére is, hogy esetleg nem sikerül az egyensúlyi állapotot elérni.

1.9.2.3. A tesztedény falán történő adszorpció és a tesztanyag stabilitása

Bizonyos információk a tesztanyagnak a tesztedény falán történő adszorpciójáról, illetve az anyag stabilitásáról a kontroll minták analízisével nyerhetők. Ha az analitikai módszer standard eltérésénél nagyobb koncentrációcsökkenés tapasztalható, lehetséges, hogy ezt abiotikus bomlás és/vagy a tesztedény falán történő adszorpció okozza. A két jelenséget olyan módon lehet megkülönböztetni, hogy az edény falát egy megfelelő oldószerrel alaposan átmoszuk, és a nyert oldat tesztanyag tartalmát meghatározzuk. Ha a tesztedény falán adszorpció nem figyelhető meg, a koncentrációcsökkenés az anyag abiotikus instabilitását mutatja. Ha a tesztedény falán adszorpció volt kimutatható, a tesztet más anyagból készült edényben kell kivitelezni. Az ebben a vizsgálatban meghatározott, tesztedények falán történő adszorpció adatait a talaj/oldat vizsgálatokra nem lehet közvetlenül extrapolálni. A talaj jelenléte is befolyásolja az adszorpciót.

³ A vizes fázis tesztanyag-koncentrációját (C_{aq}^{ads}) az idő függvényében ábrázoló grafikonok is használhatók az egyensúlyi plató elérésének becslésére (lásd az 5. melléklet 2. ábráját).

A tesztanyag stabilitására vonatkozó további információk nyerhetők az anyag tömegegyensúlyának az idő függvényében történő meghatározásával. Ez azt jelenti, hogy mind a vizes fázis, mind a talaj és a tesztanyag falának tesztanyag tartalmát is meghatározzuk. A rendszerhez adott tesztanyag mennyiség és a vizes fázisban, a talajban és az edény falán mért tesztanyag mennyiség különbsége egyenlő a lebomlott és/vagy elpárolgott és/vagy nem extrahált tesztanyag tömegével. Hogy a tömegegyensúlyt meg lehessen határozni, a rendszernek a vizsgálat ideje alatt el kell érnie az adszorpciós egyensúlyt.

A tömegegyensúlyt mindkét talaj esetében talajonként egyetlen olyan talaj/oldat arány esetében határozzuk meg, amikor a tesztanyag mennyiségének csökkenése 20% feletti, illetve lehetőleg 50% feletti az egyensúlyi állapotban. Amikor a talaj/oldat arány meghatározására irányuló vizsgálatban az utolsó vizesfázis-minta analízisét 48 óra után befejezzük, a fázisokat centrifugálással, illetve ha szükséges, szűrővel elválasztjuk. A vizes fázist, amennyire csak lehetséges, eltávolítjuk, és a talajhoz a tesztanyag extrakciója céljából megfelelő extraháló oldószert (legalább 95%-os extrakciós együttható) adunk. Legalább két egymást követő extrakciót célszerű végrehajtani. A talaj és a tesztanyag faláról nyert extraktumok tesztanyag tartalmát meghatározzuk, és a tömegegyensúlyt kiszámítjuk (lásd Az adatok és a jegyzőkönyv című rész 10. egyenletét). Ha ez az érték kisebb, mint 90%, úgy tekintjük, hogy a tesztanyag a teszt időtartama alatt nem stabil. A teszt folytatható, ha a tesztanyag instabilitását is számításba vesszük. Ebben az esetben a fő vizsgálatban javasolt mindkét fázis tesztanyag tartalmát meghatározni.

1.9.3.2. szakasz: Adszorpciós kinetika egyetlen tesztanyag-koncentráció alkalmazása esetén

Ötféle talajt használunk, amelyeket az 1. táblázat alapján választunk ki. Célszerű az előzetes vizsgálatokhoz használt talajok közül néhányat vagy mindet, ha megfelelőek, az öt talaj közé választani. Ebben az esetben a 2. szakaszt nem szükséges megismételni az előzetes vizsgálatokhoz használt talajokkal.

Az ekvibrációs időt, a talaj/oldat arányt, a bemérendő talaj tömegét, a talajjal érintkezésbe kerülő vizes fázis térfogatát és a tesztanyag koncentrációját az oldatban az előzetes vizsgálatok alapján határozzuk meg. Az analíziseket lehetőleg 2, 4, 6, 8, (esetleg 10) és 24 órás kezelés után végezzük. A rázatás időtartamát legfeljebb 48 óráig meg lehet hosszabbítani, ha a megfelelő talaj/oldat arány meghatározására irányuló vizsgálatok alapján hosszabb ekvibrációs időre van szükség. Az analízis időpontjainak kijelölése kezelhető rugalmasan.

Minden vizsgálatot (egy talaj + egy oldat) két párhuzamosban végzünk, hogy az eredmények varianciája elemezhető legyen. Minden vizsgálathoz egy vakpróba is tartozik. Ez olyan mennyiségű talajból és 0,01 M CaCl_2 -oldatból áll, mint a vizsgálati rendszer, de tesztanyagot nem tartalmaz. A vizsgálatához készítünk egy talaj nélküli kontroll mintát is, amely a tesztanyagot 0,01 M CaCl_2 -oldatban tartalmazza, és a tesztrendszerrel azonos kezeléseket vetjük alá. Ez a váratlan tényezők kiszűrésére szolgál.

A százalékos adszorpciót (A_t) minden időpontban, vagy időintervallumban ($A_{\Delta t_i}$) (a vizsgálat igényei szerint) kiszámítjuk, és az idő függvényében ábrázoljuk. Az egyensúlyi deszorpciós együtthatót (K_d), valamint az apoláros szerves vegyületek esetében a szerves szénre vonatkoztatott adszorpciós együtthatót (K_{oc}) szintén kiszámítjuk.

Az adszorpciós kinetikai teszt eredményei

A lineáris K_d -érték általában jellemzi egy anyag szorpciós tulajdonságait (35) (78), és kifejezi a vegyület jellemző mobilitását a talajban. Például a $K_d = 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ vegyületek általában mobilisaknak tekinthetők. Hasonlóképpen a K_{oc} -értékeken alapuló mobilitási klasszifikációs sémát (16) dolgoztak ki MacCal és munkatársai. Ezenkívül létezik egy, az a K_{oc} és a DT-50 összefüggésein alapuló, a kioldódási tulajdonságokat osztályozó séma is⁴ (32) (79).

Az eltérések analízise alapján (61) a $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ alatti K_d -értékek nem becsülhetők pontosan az oldatban történő koncentrációcsökkenés alapján, még akkor sem, ha a (pontosság szempontjából) legmegfelelőbb talaj/oldat arányt, tehát az 1:1 arányt alkalmazzuk. Ebben az esetben javasolt mind a talaj, mind az oldat tesztanyag tartalmát meghatározni.

Tekintettel a fenti megjegyzésekre, célszerű az anyag adszorpciós viselkedésének és potenciális mobilitásának vizsgálatát a rendszerek Freundlich-féle adszorpciós izotermáinak meghatározásával folytatni. Ehhez pedig – ha a teszt módszerben megjelölt vizsgálati eljárást alkalmazzuk –, a K_d értéke pontosan meghatározható. A pontos meghatározás akkor lehetséges, ha a K_d és a talaj/oldat arány szorzata 0,3 fölött van, ha a mérések a vizes fázis koncentrációcsökkenésén alapulnak (indirekt módszer), illetve 0,1 fölött, ha mindkét fázist analizáljuk (direkt módszer) (61).

1.9.4.3. szakasz: Adszorpciós izotermák, deszorpciós kinetika és deszorpciós izotermák

1.9.4.1. Adszorpciós izotermák

Öt, lehetőleg két nagyságrendet átfogó tesztanyag-koncentrációt használunk. A koncentrációk kiválasztásakor számításba kell venni az anyag vízoldhatóságát és a vizes fázisban kialakuló egyensúlyi koncentrációját. Talajonként végig ugyanazt a talaj/oldat arányt kell alkalmazni. Az adszorpciós tesztet a fenti leírás szerint végezzük, azzal a különbséggel, hogy a tesztanyag-koncentrációt csak egyszer, (a 2. szakasz vizsgálati alapján) az egyensúly kialakulásához szükséges idő elteltével határozzuk meg. Az oldatokban megmérjük az egyensúlyi koncentrációkat, és a talajon adszorbeált tesztanyag mennyiségét az oldat koncentrációcsökkenése alapján, illetve a direkt módszerrel

⁴ DT-50: a tesztanyag 50%-ának lebomlásához szükséges idő.

határozzuk meg. A talaj által grammonként adszorbeált tesztanyag mennyiséget a tesztanyag egyensúlyi koncentrációjának függvényében ábrázoljuk (lásd Az adatok és a jegyzőkönyv című részt).

Az adszorpciós izotermák meghatározására irányuló vizsgálatok eredményei

A javasolt matematikai adszorpció-modellek közül az adszorpciós folyamatok leírására leggyakrabban a Freundlich-féle izotermát használják. Az adszorpció-modellek értelmezéséről és jelentőségéről részletesebb információk találhatóak a (41) (45) (80) (81) (82) hivatkozásokban.

Megjegyzés:

Meg kell említenünk, hogy a különböző vegyületek K_F -értékei (Freundlich-féle adszorpció együttható) csak abban az esetben hasonlíthatók össze, ha ezek a K_F -értékek azonos egységekben vannak kifejezve (83).

1.9.4.2. Deszorpciós kinetika

A kísérlet célja annak vizsgálata, hogy egy vegyület a talajon reverzibilisen vagy irreverzibilisen adszorbeálódik. Ez fontos információ, mivel a deszorpciós folyamat is jelentős szerepet játszik egy vegyületnek a környezetben, a talajban történő viselkedésében. Ezen kívül a deszorpciós adatok fontos információt szolgáltatnak az átmosódás és a kioldódás számítógépes szimulációjához. Amennyiben deszorpciós vizsgálatokra van szükség, javasolt az alábbiakban leírt vizsgálati módszert alkalmazni minden olyan rendszer esetében, amelyeknél az ezt megelőző vizsgálatban a K_d -t pontosan meg lehetett határozni.

Az adszorpciós kinetika vizsgálatához hasonlóan, a deszorpciós vizsgálatot kétféleképpen kivitelezhetjük: (1) a párhuzamos módszerrel és (2) a „folytatásos” módszerrel. A követendő metodika meghatározása a vizsgálatot végző személy feladata; döntéséhez figyelembe kell vennie a laboratórium felszereltségét és forrásait.

a) Párhuzamos módszer: minden, a deszorpciós vizsgálatához kiválasztott talajból annyi azonos talaj/oldat aránnyal rendelkező mintát készítünk, ahány időintervallumban a deszorpció kinetikáját tanulmányozni akarjuk. Lehetőleg olyan időintervallumokat kell alkalmazni, mint az adszorpciós kinetika vizsgálatok. A vizsgálat időtartamát igény szerint meg lehet hosszabbítani, hogy a rendszer a deszorpciós egyensúlyt elérje. Minden vizsgálatához (egy talaj + egy oldat) beállítunk egy vakpróbát is. Ez a megfelelő tesztrendszerrel azonos talajból és 0,01 M CaCl_2 -oldatból áll, de tesztanyagot nem tartalmaz. Kontrollként 0,01 M CaCl_2 -ban oldott tesztanyagot (talaj nélkül) a többivel azonos kezelésnek vetünk alá. Az összes talajos keveréket (a 2. szakaszban meghatározott) adszorpciós egyensúly kialakulásáig rázatjuk. Ezután a fázisokat centrifugálással elválasztjuk, és a vizes fázist, amennyire csak lehetséges, eltávolítjuk. Az eltávolított oldatot azonos térfogatú, tesztanyag mentes CaCl_2 -oldattal pótoljuk, és az új keverékeket újra rázatjuk. Például 2 óra után az első cső vizes fázisát, amennyire csak lehetséges, eltávolítjuk, és a tesztanyag tartalmát meghatározzuk, a második csőét 4, a harmadikét 6 óra után stb., egészen addig, amíg a deszorpciós egyensúly ki nem alakul.

b) „Folytatásos” módszer: az adszorpciós kinetika vizsgálata után a keveréket centrifugáljuk, és a vizes fázist, amennyire csak lehetséges, eltávolítjuk. Az eltávolított oldatot azonos térfogatú, tesztanyag mentes CaCl_2 -oldattal pótoljuk. Az új keverékeket a deszorpciós egyensúly kialakulásáig újra rázatjuk. Eddig az időtartamig meghatározott időpontokban a fázisok elválasztása céljából a keveréket centrifugáljuk. A vizes fázisból kivett alikvot tesztanyag tartalmát azonnal meghatározzuk, azután ugyanazzal a keverékkel folytatjuk a vizsgálatot. Az egyes kivett alikvotok térfogata nem haladhatja meg az oldat össztérfogatának 1%-át. A keverékhez – a talaj/oldat arány fenntartása érdekében – a kivett mennyiséggel megegyező térfogatú CaCl_2 -oldatot adunk, és a következő időpontig rázatjuk.

A százalékos deszorpciót (D_t) minden időpontban vagy időintervallumban ($D_{\Delta t}$) (a vizsgálat igényei szerint) kiszámítjuk, és az idő függvényében ábrázoljuk. Az egyensúlyi deszorpciós együtthatót (K_{des}) is kiszámítjuk. A számításokhoz szükséges egyenletek Az adatok és a jegyzőkönyv című részben, illetve az 5. mellékletben található.

A deszorpciós kinetikai vizsgálatok eredményei

A százalékos adszorpciót (A_t), illetve deszorpciót (D_t) az idő függvényében ábrázoló grafikonok lehetővé teszik az adszorpciós folyamat reverzibilitásának becslését. Ha a deszorpciós egyensúly még az adszorpciós egyensúly kialakulásához szükséges idő kétszeresének eltelte előtt kialakul, és a teljes deszorpció nagyobb, mint az adszorbeált mennyiség 75%-a, az adszorpciót reverzibilisnek tekintjük.

1.9.4.3. Deszorpciós izotermák

A Freundlich-féle deszorpciós izotermákat ugyanolyan talajokkal kell meghatározni, mint amilyeneket az adszorpciós izotermák meghatározására használtunk. A deszorpciós tesztek a deszorpciós kinetikai vizsgálatokkal azonos módon kell kivitelezni, azzal a különbséggel, hogy a vizes fázist csak egyszer, a deszorpciós egyensúly kialakulásakor analizáljuk. A deszorbeálódott tesztanyag mennyiségét kiszámítjuk. A deszorpciós egyensúlyban a talajon adszorbeált állapotban maradt tesztanyag mennyiségét az oldat egyensúlyi koncentrációjának függvényében ábrázoljuk (lásd Az adatok és a jegyzőkönyv című részt, illetve az 5. mellékletet).

2. AZ ADATOK ÉS A JEGYZŐKÖNYV

Az analitikai adatokat táblázatos formában közöljük (lásd a 6. mellékletet). Az egyedi mérések eredményét és a kiszámított átlagokat is meg kell adni. Az adszorpciós izotermákat grafikus formában ábrázoljuk. A számításokat az alábbiak szerint végezzük.

A teszt céljának megfelelően úgy tekintjük, hogy 1 cm³ vizes oldat tömege 1 g. Így talaj/oldat arány ugyanazokkal a számjegyekkel w/w és w/vol formában is kifejezhető.

2.1. Adszorpció

Az adszorpciót (A_{t_i}) a tesztanyagnak a talajon, a teszt körülményei között bekövetkező, a kiindulási mennyiséghez viszonyított, százalékban kifejezett adszorbeált mennyiségeként határozzuk meg. Ha a tesztanyag stabil, és nem adszorbeálódik szignifikánsan a tesztedény falán, az A_{t_i} -t minden t_i időpontban a következő egyenlet alapján számítjuk ki:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3.)$$

ahol:

A_{t_i} = százalékos adszorpció a t_i időpontban (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = a tesztanyagnak a talajon adszorbeált tömege t_i időpontban (μg);

m_0 = a tesztanyag tömege a tesztcsőben a teszt kezdetén (μg).

A százalékos adszorpció (A_{t_i}) párhuzamos, illetve a „folytatásos” módszerek esetében történő kiszámításához részletes információk az 5. mellékletben találhatóak.

A K_d megoszlási együttható a talaj tesztanyagtartalmának és a vizes oldat tesztanyag-koncentrációjának a teszt körülményei között, adszorpciós egyensúlyban kialakult aránya.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}} \frac{V_0}{m_{talaj}} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4.)$$

ahol:

$C_s^{ads}(eq)$ = a talaj adszorbeált tesztanyagtartalma adszorpciós egyensúlyban ($\mu\text{g g}^{-1}$)

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizes fázis tesztanyag-koncentrációja adszorpciós egyensúlyban ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Ezt a koncentrációt a vakpróba értékeinek figyelembevételével, analitikai módszerekkel határozzuk meg.

$m_s^{ads}(eq)$ = a talajon adszorbeálódott tesztanyag tömege adszorpciós egyensúlyban (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a tesztanyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyban (μg)

m_{talaj} = a talajfázis tömege, szárazanyagban kifejezve (g)

V_0 = a talajjal érintkezésbe kerülő vizes fázis kiindulási térfogata (cm³)

Az A_{eq} és a K_d közötti összefüggést az alábbi egyenlet fejezi ki:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \frac{V_0}{m_{talaj}} (cm^3 g^{-1}) \quad (5.)$$

Ahol:

A_{eq} = százalékos adszorpció az adszorpciók egyensúlyban (%).

A szervesszén-tartalomra vonatkoztatott K_{oc} adszorpciók együttható a K_d megoszlási együtthatót és a talajminta szervesszén-tartalmát hozza összefüggésbe:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\% oc} (cm^3 g^{-1}) \quad (6.)$$

ahol:

% oc = a talajminta százalékos szervesszén-tartalma ($g g^{-1}$).

A K_{oc} együttható egy olyan érték, amely önmagában jellemzi a nagyjából apoláros szerves vegyületeknek a talajok vagy üledékek szervesszén-tartalma és a víz közötti megoszlását. Az ilyen anyagok adszorpciója a szorbens szervesanyag-tartalmával áll összefüggésben (7); így a K_{oc} értékek a humuszfrakciók specifikus tulajdonságaitól függenek, amelyeknek szorpciók kapacitása eredetüknek, keletkezésüknek stb. megfelelően, jelentősen eltér egymástól.

2.1.1. Adszorpciók izotermák

A Freundlich-féle adszorpciók izotermák egyenlete az adszorbeált testanyagmennyiség és az oldat egyensúlyi testanyag-koncentrációjának összefüggését fejezi ki (8).

Az adatokat az Adszorpció című részben foglaltaknak megfelelően kezeljük, és a teszt után minden tesztcsőben kiszámítjuk a talajon adszorbeálódott testanyag mennyiségét ($C_s^{ads}(eq)$, más helyeken x/m a jele). Feltételezzük, hogy az adszorpciók egyensúly kialakult, és hogy a $C_s^{ads}(eq)$ az egyensúlyi értéket jelenti:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{talaj}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{talaj}} (mg g^{-1}) \quad (7.)$$

A Freundlich-féle adszorpciók egyenlete:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (mg g^{-1}) \quad (8.)$$

vagy ennek lineáris formája:

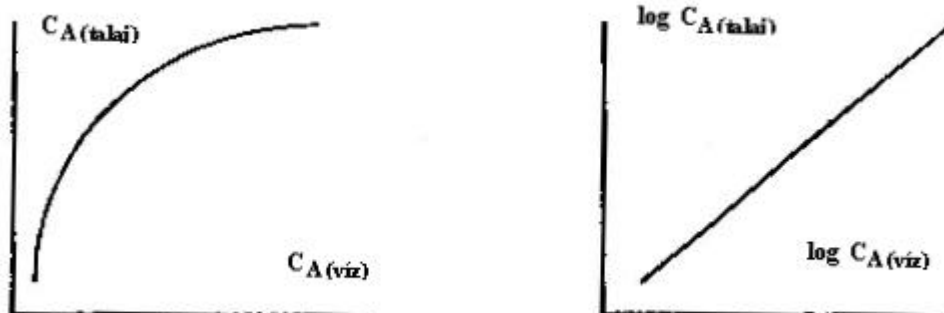
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9.)$$

ahol:

K_F^{ads} = Freundlich-féle adszorpciók együttható; a dimenziója csak abban az esetben $cm^3 g^{-1}$, ha $1/n = 1$; minden más esetben az $1/n$ meredekségét a K_F^{ads} dimenziójában ($\mu g^{1-1/n}(cm^3)^{1/n} g^{-1}$) fejezzük ki.

n = regressziók konstans; az $1/n$ értéke általában 0,7 és 1,0 között van, ami azt jelenti, hogy a szorpciók adatok általában a lineáristól kis mértékben eltérnek.

A 8. és a 9. egyenletet ábrázoljuk, és a K_F^{ads} , illetve az $1/n$ értékeit regressziós analízissel, a 9. egyenlet segítségével kiszámítjuk. A log egyenlet korrelációs együtthatóját (r^2) is meghatározzuk. A grafikonok egy-egy példáját mutatja a 2. ábra.



2. ábra. Normál és linearizált Freundlich-féle görbék

2.1.2 Tömegegyensúly

A tömegegyensúly (MB) az adszorpció teszt után analitikai módszerrel visszanyerhető tesztanyagnak a kiindulási tesztanyag mennyiséghez viszonyított százalékos aránya.

Vízzel elegyedő és nem elegyedő oldószerek esetében eltérő adatkezelési módszert kell alkalmazni. A vízzel elegyedő oldószerek esetében – az oldószeres extrakcióval kinyert tesztanyag mennyiség meghatározására – alkalmazható a Deszorpció című részben leírt adatkezelési módszer. Ha viszont az oldószere vízzel kevésbé elegyedik, a visszanyert tesztanyag mennyiség meghatározását el kell végezni.

Az adszorpció tömegegyensúlyt (MB) az alábbi egyenlet alapján kell kiszámítani. Feltételezzük, hogy az m_E kifejezés megegyezik a talajból és a tesztedény szerves oldószeres extrakcióval visszanyert tesztanyag mennyiség teljes tömegével:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10.)$$

ahol:

MB = tömegegyensúly (%)

m_E = a talajból és a tesztedény faláról két lépésben extrahált tesztanyag teljes tömege (μg)

C_0 = a tesztoldatnak a talajjal érintkezésbe kerülő kiindulási koncentrációja ($\mu\text{g cm}^{-3}$)

V_{rec} = az adszorpció ekvilibriumban visszanyert felülúszó térfogata (cm^3)

2.2. Deszorpció

A deszorpciót (D) az előzőleg adszorbeálódott tesztanyag mennyiség és a teszt körülményei között deszorbeálódott tesztanyag mennyiség százalékos arányaként határozzuk meg:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (11.)$$

ahol:

D_{t_i} = százalékos deszorpció a t_i időpontban (%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = a tesztanyagnak a talajról deszorbeálódott tömege a t_i időpontban (μg)

$m_s^{des}(eq)$ = a tesztanyag adszorbeált mennyisége a talajon, adszorpciós egyensúlyban (μg)

A százalékos deszorpció (D_{t_i}) kiszámítási módjának leírása – a párhuzamos, illetve a „folytatásos” módszer esetében – az 5. mellékletben található.

A látszólagos deszorpciós együttható (K_{des}) a teszt körülményei között a talajfázisban maradó tesztanyag mennyiségének és az oldatban levő, deszorbeálódott tesztanyag koncentrációjának aránya a deszorpciós egyensúlyban:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{talaj}} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (12.)$$

ahol:

K_{des} = deszorpciós együttható ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = a tesztanyagnak a talajról deszorbeálódott teljes tömege a deszorpciós egyensúlyban (μg)

V_T = a talajjal a deszorpciós kinetikai teszt során érintkezésbe kerülő vizes fázis összterfoglata (cm^3)

Az $m_{aq}^{des}(eq)$ kalkulációjára vonatkozó útmutatás az 5. mellékletben, a „Deszorpció” cím alatt található.

Megjegyzés:

Ha a megelőző adszorpciós tesztet a párhuzamos módszerrel végeztük, a 12. egyenletben szereplő V_T -t a V_0 -val egyenlőnek tekintjük.

2.2.1. Deszorpciós izotermák

A Freundlich-féle deszorpciós izotermák a talaj adszorbeált állapotban maradó tesztanyagtartalmának és az oldat tesztanyag-koncentrációjának összefüggését fejezik ki deszorpciós egyensúlyban (16. egyenlet).

Minden tesztcsőben a talajnak – a deszorpciós egyensúly kialakulása után – adszorbeált állapotban maradt tesztanyagtartalmát a következő egyenlet alapján számítjuk ki:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{talaj}} (\text{mg g}^{-1}) \quad (13.)$$

az $m_{aq}^{des}(eq)$ -t az alábbiak szerint határozzuk meg:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r} - m_{aq}^A (\text{mg}) \quad (14.)$$

ahol:

$C_s^{des}(eq)$ = a tesztanyagnak a deszorpciós egyensúlyban a talajon adszorbeált állapotban maradó tesztanyagtartalma ($\mu\text{g g}^{-1}$)

$m_m^{des}(eq)$ = a vizes fázisban analitikai módszerrel meghatározott tesztanyag tömege a deszorpciós egyensúlyban (μg)

m_{aq}^A = az adszorpciós egyensúlyból a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt megmaradt tesztanyag tömege (μg)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = a tesztanyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyban (μg).

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (15.)$$

V_r^F = a csőből a tesztanyag méréséhez kivett térfogat a deszorpciós egyensúlyban (cm^3)

V_R = a csőből az adszorpciós egyensúly kialakulása után kivett felülúszó térfogata, amelyet ugyanolyan térfogatú 0,01 M CaCl_2 -oldattal pótolunk (cm^3).

A Freundlich-féle deszorpciós egyenlet:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16.)$$

ennek lineáris formája:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17.)$$

ahol:

K_F^{des} = Freundlich-féle deszorpciós együttható

n = regressziós konstans

$C_{aq}^{des}(eq)$ = a tesztanyag koncentrációja a vizes fázisban, deszorpciós egyensúlyban ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Ábrázolhatjuk 16. és a 17. egyenletet, és a K_F^{des} és az $1/n$ értékét regressziós analízissel, a 17. egyenlet segítségével számíthatjuk ki.

Megjegyzés:

Ha a Freundlich-féle adszorpciós vagy deszorpciós kitevő értéke 1, akkor a Freundlich-féle adszorpciós vagy deszorpciós kötődési állandók (K_F^{ads} és K_F^{des}) egyenlők az adszorpciós, illetve a deszorpciós egyensúlyi állandókkal (K_d és K_{des}), és a C_{aq} függvényében ábrázolt C_s görbéje lineáris lesz. Ha a kitevők értéke nem egyenlő 1-gyel, akkor a C_{aq} függvényében ábrázolt C_s görbéje nem lesz lineáris, és az adszorpciós és deszorpciós állandók az izotermák mentén változnak.

2.2.2. A vizsgálati jegyzőkönyv

A jegyzőkönyvnek az alábbi információkat kell tartalmaznia:

- A felhasznált talajminták teljes azonosítása, beleértve
 - = a származási hely pontos geográfiai megjelölését (szélesség, hosszúság),
 - = a mintavétel dátumát,
 - = a talaj hasznosítási sémáját (pl. mezőgazdasági talaj, erdő stb.),
 - = a mintavételi mélységet,
 - = a talaj homok-/vályog-/agyagtartalmát,
 - = a (0,01 M CaCl₂-oldatban mért) pH-értékeket,
 - = a szervesszén-tartalmat,
 - = a szervesanyag-tartalmat,
 - = a nitrogéntartalmat,
 - = a C/N arányt,
 - = a kationcserélő kapacitást (mmol/kg),
 - = minden, a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos információt,
 - = ahol szükséges, minden, a tesztanyag adszorpciójának/deszorpciójának értelmezését segítő releváns információt,
 - = az egyes paraméterek meghatározásához használt módszerekre történő hivatkozásokat.
- a tesztanyagra vonatkozó szükséges információk,
- a vizsgálati hőmérsékletek,
- a centrifugálás körülményei,
- a tesztanyag mennyiségi meghatározására szolgáló analitikai eljárás,
- a tesztanyag törzsoldatának készítésekor bármilyen alkalmazott, oldást segítő anyag használatának indoklása,
- a számításokban végzett korrekciók magyarázata, amennyiben releváns,
- az adatlapon feltüntetendő adatok (6. melléklet) és a grafikonok,
- minden, a teszteredmények értelmezéséhez hasznos segítséget nyújtó információ és megfigyelés.

3. IRODALOM

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045. Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 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.

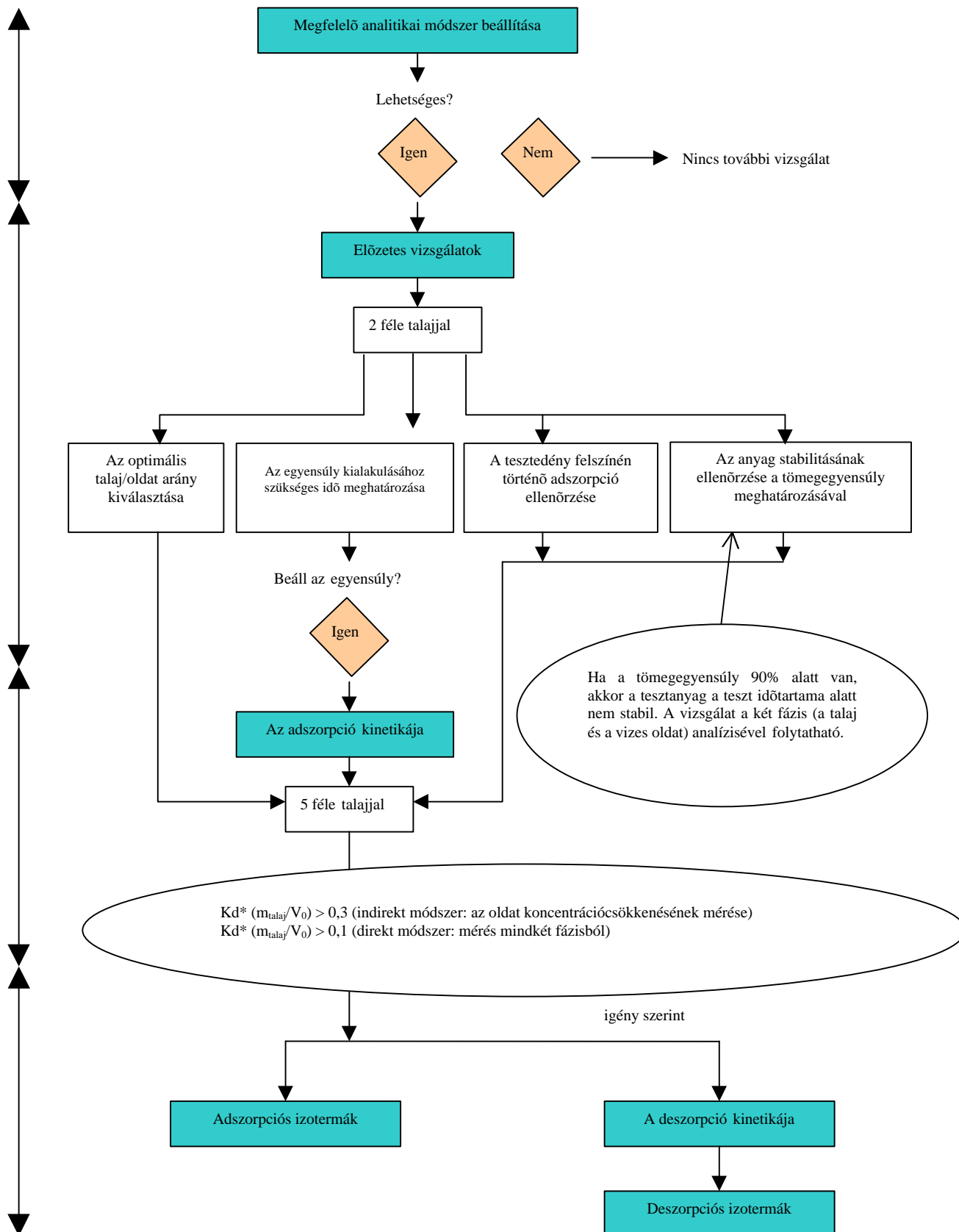
- (12) Calvet R. (1989), 'Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils', in *Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil* (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
- (13) Calvet R., (1980), 'Adsorption-Desorption Phenomena' in interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
- (14) Hasset J. J. and Banwart W. L., (1989), 'The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in *Reaction and Movement of Organic Chemicals in Soils*. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22. Pp. 31-44.
- (15) van Genuchten M. Th., Davidson J. M. and Wierenga P. J., (1974), 'An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media'. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, Vol. 38(1), pp. 29-35.
- (16) McCall P. J., Laskowski D. A., Schwann R. L. and Dishburger H. J., (1981), 'Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis', in *Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants*. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- (17) Lambert S. M., Porter P. E. and Schieferrstein R. H., (1965), 'Movement and sorption of chemicals applied to the soil'. *Weeds*, 13, pp. 185-190.
- (18) Rhodes R. C., Belasco I. J., and Pease H. L., (1970), 'Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils'. *J. Agric. Food Chem.*, 18, pp. 524-528.
- (19) Russell M. H., (1995), 'Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil' in *Environmental Behavior of Agrochemicals* (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.
- (20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W., and Holland P. T., (1988), 'Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides', *IUPAC Reports on Pesticides* (24). *Pure Appl. Chem*, 60, pp. 901-932.
- (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 Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37.*, pp. 143-154.
- (27) Hamaker J. W., (1975), 'The interpretation of soil leaching experiments', in *Environmental Dynamics of Pesticides* (eds R. Haque and V. H. Freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
- (28) Helling C. S., (1971), 'Pesticide mobility in soils'. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 35, pp. 732-810.
- (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., 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., 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 leachability*'. *J. Environ. Toxic. Chem.* 8(4). pp. 339-357.
- (33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). 'Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils.' *J. of Soil Sci.*, 28. pp. 340-350.
- (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 – 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 – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- (54) ISO/DIS 10351-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- (55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.
- (56) ISO/DIS 10351-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- (57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- (58) ISO 10381-6. 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), 'Precision in pesticide adsorption measurements'. *Soil Sci. Am. Proc.* 34, pp. 353-354.
- (60) Grover R., and Hance R. J. (1970). 'Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine. *Soil Sci.*, pp. 109-138.
- (61) Boesten J. J. T. I, 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system'. *Pest. Sci.* 1990, 30, pp. 31-41.
- (62) Boesten, J. J. T. I. 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106'. *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects*, Brussels, 26-29 April 1994.
- (63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), 'Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique'. *Weed Res.* 21, pp. 227-231.
- (64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments'. *J. Environ. Qual.* 10(3), pp. 382-386.

- (65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), 'Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water'. *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), pp. 227-231.
- (66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), Sorption of organic substances by soils and sediments'. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), pp. 297-312.
- (67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C., (1987), 'Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons'. *Chemosphere*. 16(1), pp. 109-116.
- (68) Lyman W. J., Reehl W. F., and Rosenblatt D. H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds*. American Chemical Society, Washington DC.
- (69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I., (1980), 'Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota' in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton; et al.), pp. 78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
- (70) Chiou C. T., Pecters L. J., and Freed V. H., (1979), 'A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds'. *Science*, Vol. 206, pp. 831-832.
- (71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), 'Sorption of 1-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 of 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité'. *Revue de l'Agric.*, 34(4), pp. 319-322.
- (74) Müller M., Kördel W., (1996). 'Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*. 32(12), pp. 2493-2504.
- (75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M., (1995), 'HPLC screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test' *Chemosphere* 30 (7), pp. 1373-1384.
- (76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G., (1993), 'HPLC – Screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases'. *Chemosphere* 27(12), pp. 2341-2352.
- (77) Hance R. J., (1967), 'The speed of attainment of sorption equilibria in some systems involving herbicides'. *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29-36.
- (78) Koskinen W. C., and Harper S. S., (1990). 'The retention processes mechanisms' in *Pesticides in the Soil Environment: Processes. Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series No. 2*. Madison, Wisconsin.
- (79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G., (1984). 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp. 297-325. ACS Symp. Ser. 259. American Chemical Society. Washington, DC.
- (80) Giles C. H., (1970), 'Interpretation and use of sorption isotherms' in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.
- (81) Giles, C. H., McEwan J. H., Nakhwa S. N. and Smith D., (1960), 'Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils'. *J. Chem. Soc.*, pp. 3973-93.
- (82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C., (1980), 'Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption'. *Ann. Agron.* 31, pp. 239-251.
- (83) Bedbur E., (1996), 'Anomalies in the Freundlich equation'. *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*. 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.
- (84) Guth J. A., (1985), 'Adsorption/desorption', in *Joint International Symposium. Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3. Canterbury, UK.
- (85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science* 33, Suppl. I (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

1. melléklet

A TESZTELÉS SÉMÁJA



2. melléklet

**AZ ANALITIKAI MÓDSZER PONTOSSÁGA ÉS A KONCENTRÁCIÓVÁLTOZÁS HATÁSA
AZ ADSZORPCIÓS EREDMÉNYEK PONTOSSÁGÁRA**

A következő táblázatból (84) világosan látható, hogy ha a tesztanyag kiindulási ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) és az oldatban mérhető egyensúlyi tömege [$m_{aq}^{ads}(eq) = 100 \mu\text{g}$] közti különbség nagyon kicsi, akkor az egyensúlyi koncentráció meghatározásakor jelentkező 5%-os hiba a tesztanyag talajon adszorbeált mennyiségének [$m_s^{ads}(eq)$] kiszámításakor már 50%-os, a K_d számításában pedig 52,4% hibát jelent.

A talaj mennyisége: $m_{talaj} = 10 \text{ g}$
Az oldat térfogata: $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

$m_0 = 110 \mu\text{g}$ vagy $C_0 = 1,100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (μg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	R	$m_{aq}^{ads}(eq) *$ (μg)	$C_{aq}^{ads}(eq) *$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R^\ddagger	K_d^*	R^\ddagger
	A = 9%							
	100	1,000	valós érték	10	1,00	valós érték	1	
	101	1,010	1%	9	0,90	10%	0,891	10,9%
	105	1,050	5%	5	0,50	50%	0,476	52,4%
	109	1,090	9%	1	0,10	90%	0,092	90,8%
A = 55%								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ vagy $C_0 = 1,100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	50,0	0,500	valós érték	60,0	6,00	valós érték	12,00	
	50,5	0,505	1%	59,5	5,95	0,8%	11,78	1,8%
	52,5	0,525	5%	57,5	5,75	4,0%	10,95	8,8%
	55,0	0,550	10%	55,0	5,50	8,3%	10,00	16,7%
A = 99%								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ vagy $C_0 = 1,100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	1,100	0,011	valós érték	108,9	10,89	valós érték	990	
	1,111	0,01111	1%	108,889	10,8889	0,01%	980	1,0%
	1,155	0,01155	5%	108,845	10,8845	0,05%	942	4,8%
	1,21	0,0121	10%	108,790	10,8790	0,10%	899	9,2%

ahol:

$$* m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq), \quad C_s^{ads}(eq) = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)]V_0}{m_{bodem}}, \quad K_d = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{bodem}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = a tesztanyag tömege a szilárd fázisban egyensúly esetén, μg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a tesztanyag tömege a vizes fázisban egyensúly esetén, μg

$C_s^{ads}(eq)$ = a szilárd fázis tesztanyagtartalma egyensúlyban, $\mu\text{g g}^{-1}$

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = a vizes fázis tesztanyagtartalma egyensúlyban, $\mu\text{g g}^{-1}$

R = az $m_{aq}^{ads}(eq)$ meghatározásának analitikai hibája

R^\ddagger = az analitikai hiba (R) alapján számított eltérés.

3. mellélet

K_d-BECSLÉSI TECHNIKÁK

1. Ezek a módszerek a K_d értékének becslését teszik lehetővé, például a P_{ow} értékekkel (12) (39) (63-68), illetve a vízdoldhatósági adatokkal (12) (19) (21) (39) (68-73) való összefüggése alapján, illetve polaritási adatok alapján, amelyeket reverz fázisú HPLC-s vizsgálatokkal nyerhetünk. Az 1. és a 2. táblázatban található egyenletek alapján kiszámítjuk a K_{oc} és a K_{om} értékeit, ezután pedig indirekt módon a K_d -t az alábbi egyenletek alapján:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\% oc} (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\% oc} (cm^3 g^{-1})$$

2. Ezen összefüggésekre vonatkozó koncepció két feltételezésen alapul: (1) egy anyag adszorpcióját döntően a talaj szervesanyag-tartalma határozza meg; (2) a részt vevő interakciók nagyjából nem polárosak. Következésképpen ezek az összefüggések (1) nem, vagy csak bizonyos mértékben alkalmazhatók poláros anyagok esetében, és (2) nem alkalmazhatók azokban az esetekben, ha a talaj szervesanyag-tartalma nagyon kicsi (12). Ezenkívül, bár kielégítő összefüggést találtak a P_{ow} és az adszorpció között (19), ugyanez nem mondható el a vízdoldhatóság és az adszorpció mértékének kapcsolatáról (19) (21); jelen pillanatban az eddig publikált tanulmányok meglehetősen ellentmondásosak.

3. Az adszorpció és az oktanol-víz megoszlási együttható, illetve a vízdoldhatóság közötti összefüggés néhány példáját az 1. és a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. Az adszorpció és megoszlási együttható és az oktanol-víz megoszlási együttható közötti összefüggés példái; további példák a (12) és a (68) hivatkozásban találhatók

Anyag	Összefüggés	Szerzők
Szubsztituált ureák	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromás klórozott vegyületek	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou et al. (1983) (65)
Különféle peszticidek	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromás szénhidrogének	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

2. táblázat. Az adszorpció és megoszlási együttható és a vízdoldhatóság közötti összefüggés példái; további példák a (68) és a (69) hivatkozásban találhatók

Anyag	Összefüggés	Szerzők
Különféle peszticidek	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Alifás, aromás klórozott vegyületek	$\log K_{oc} = (4,040 + /- 0,038) - (0,557 + /- 0,012) \log S_w$	Chiou et al. (1979) (70)
á-naftol	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset et al. (1981) (71)
Ciklikus, alifás aromás vegyületek	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (mp - 25)$	Karickhoff (1981) (72)
Különféle vegyületek	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Morale van Blade (1982) (73)

4. melléklet

SZÁMÍTÁSOK A CENTRIFUGÁLÁS KÖRÜLMÉNYEINEK MEGHATÁROZÁSÁHOZ

1. A centrifugálás időtartama – gömb alakú részecskéket feltételezve – az alábbi képlet segítségével számítható ki:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{h}{w^2 r_p^2 (r_s - r_{aq})} \right] \ln \left(\frac{R_b}{R_t} \right) \quad (1.)$$

Az egyszerűség kedvéért a paramétereket itt nem az SI rendszer (g, cm) szerint fejeztük ki.

ω = forgási sebesség (= 2 δ rpm/60), rad s⁻¹

rpm = fordulatszám percenként

ζ = az oldat viszkozitása, g s⁻¹ cm⁻¹

r_p = a részecskék sugara, cm

\tilde{n}_s = a talaj sűrűsége, g cm⁻³

\tilde{n}_{aq} = az oldat sűrűsége, g cm⁻³

R_t = a centrifuga rotorjának közepe és a centrifugacsőben levő folyadék teteje közti távolság, cm

R_b = a centrifuga rotorjának közepe és a centrifugacső alja közti távolság, cm

$R_b - R_t$ = a talaj/oldat keverék hossza a centrifugacsőben, cm.

Az általános gyakorlatban a teljes szeparáció biztosítása érdekében a kiszámított idő kétszeresét alkalmazzák.

2. Az 1. egyenlet tovább egyszerűsíthető, ha az oldat viszkozitását (ζ) és sűrűségét (\tilde{n}_{aq}) 25 °C-on a vízével azonosnak tekintjük; így $\zeta = 8,95 \times 10^{-3}$ g s⁻¹ cm⁻¹ és $\tilde{n}_{aq} = 1,0$ g cm⁻³.

A centrifugálás időtartamát a 2. egyenlet adja:

$$t = \frac{3,7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (r_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2.)$$

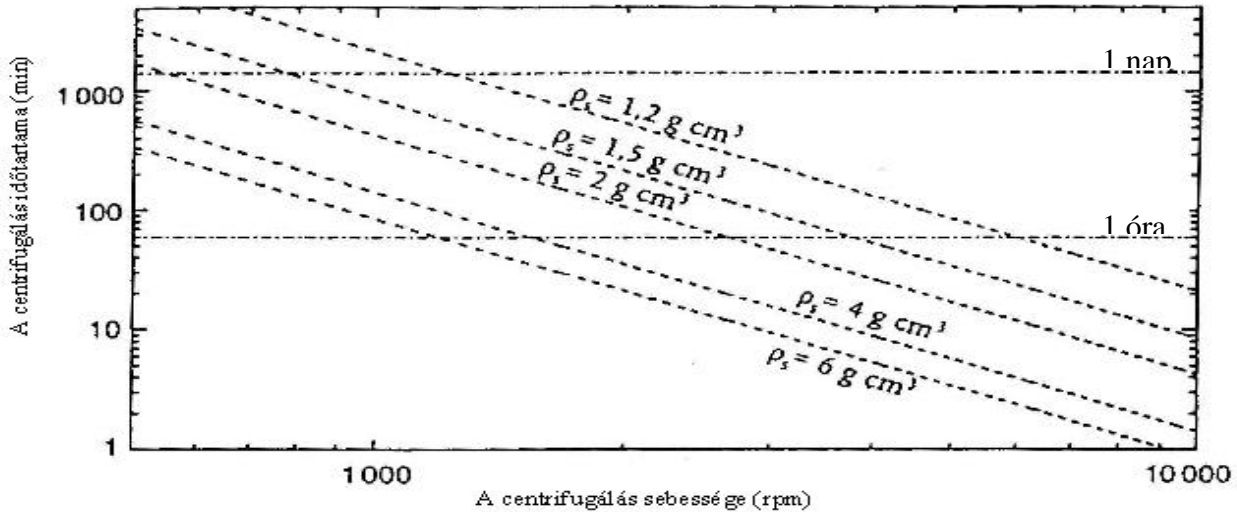
3. A 2. egyenletből látható, hogy a centrifugálás körülményeinek, tehát a centrifugálás időtartamának (t) és sebességének (rpm) meghatározásában alapvetően két paraméter fontos, hogy meghatározott méretű (esetünkben 0,1 μ m sugarú) részecskéket szeparálni tudjunk: (1) a talaj sűrűsége és (2) a keverék hossza a centrifugacsőben ($R_b - R_t$) (tehát az a távolság, amelyet egy részecske az oldat tetejétől az aljáig megtesz). Meghatározott térfogat esetében a keverék hossza nyilvánvalóan a centrifugacsőben a cső rádiuszának négyzetétől függ.

4. Az 1a ábra a centrifugálás időtartamát (t) különböző talajsűrűségek esetében, a centrifugálás sebességének függvényében (rpm), az 1b ábra pedig ugyanezt a keverék hosszának a centrifugacsőben függvényeként ábrázolja. Az 1a ábra alapján a talaj sűrűségének hatása egyértelmű: például egy átlagos, 3000-es fordulatszámmal végzett centrifugálás 1,2 g cm⁻³ talajsűrűség esetében 240 percig tart, míg 2,0 g cm⁻³-es talajsűrűség esetében csak 50 percig. Hasonlóképpen – ahogy az 1b ábra mutatja –, egy átlagos, 3000-es fordulatszámmal végzett centrifugálás 50 percig tart, ha a keverék hossza a csőben 10 cm, és 7 percig, ha 1 cm. Fontos megtalálni az optimális egyensúlyt a legkisebb lehetséges hossz és a között, hogy vizsgálatot végző személy a centrifugálás után a fázisokat könnyen el tudja különíteni.

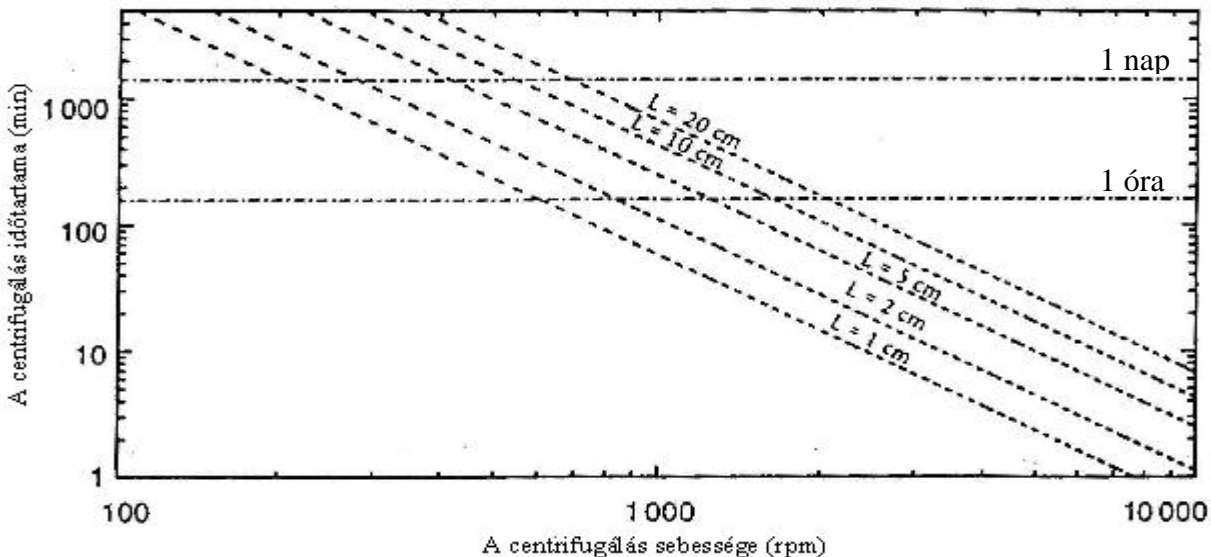
5. Mikor a talaj/oldat fázisok elválasztásának vizsgálati körülményeit meghatározzuk, számolnunk kell egy másik lehetséges „pszeudofázis”, a kolloidok jelenlétével is. Ezeknek a 0,2 μ m-nél kisebb részecskék fontos hatást

gyakorolhatnak az anyagok teljes adszorpciós mechanizmusára a talajsuszpenzióban. Ha a centrifugálást a fentiekben leírt módon végezzük, a kolloidok a vizes fázisban maradnak, és a vizes fázissal együtt kerülnek elemzésre. Így elvész a hatásukra vonatkozó információ.

Ha a vizsgálatot végző laboratórium rendelkezik ultraszűrési vagy ultracentrifugálási lehetőséggel, akkor az anyagok adszorpciója/deszorpciója mélységeiben is tanulmányozható, beleértve a kolloidokon történő adszorpcióra vonatkozó információkat is. Ebben az esetben 60 000 rpm/min. ultracentrifugálással vagy 100 000 Da porozitású ultraszűrővel a három fázis – talaj, kolloidok, oldat – elválasztható. A teszt módszert is ezekhez kell igazítani, hogy mindhárom fázisban meghatározzuk a tesztanyag tartalmát.



1a ábra. A centrifugálás időtartamának variációi (t) különböző talajsűrűségek esetében, a centrifugálás sebességének függvényében (rpm). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $h = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ és $r_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ 25 °C-on.

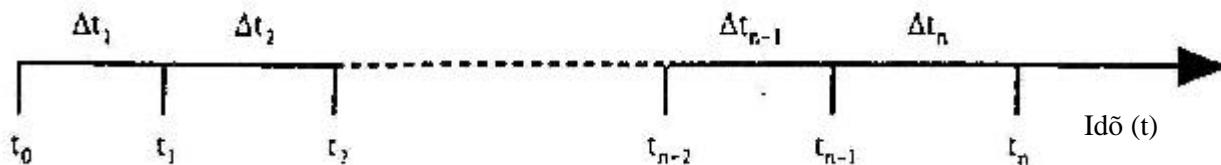


1b ábra. A centrifugálás időtartamának variációi (t) különböző talajsűrűségek esetében, a keverék hosszának a centrifugációs csőben függvényeként ábrázolva. $(R_b - R_t) = L$, $R_t = 10 \text{ cm}$, $h = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $r_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ 25 °C-on és $r_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

5. melléklet

AZ ADSZORPCIÓ (A%) ÉS A DESZORPCIÓ (D%) SZÁMÍTÁSA

Az eljárás időskálája:



Minden számításra esetében feltételezzük, hogy a testanyag stabil, és nem adszorbeálódik szignifikáns mértékben az edények falára.

ADSZORPCIÓ (A%)

a) Párhuzamos módszer

A százalékos adszorpciót minden testcsőben (i) és időpontban (t_i) az alábbi egyenlet alapján számítjuk ki:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1.)^5$$

Az egyenlet tagjai a következők szerint számíthatók ki:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2.)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3.)$$

ahol:

A_{t_i} = százalékos adszorpció (%) t_i időpontban

$m_s^{ads}(t_i)$ = a testanyag tömege a talajban az analízis t_i időpontjában (μg)

m_0 = a testanyag tömege a testcsőben a teszt kezdetén (μg)

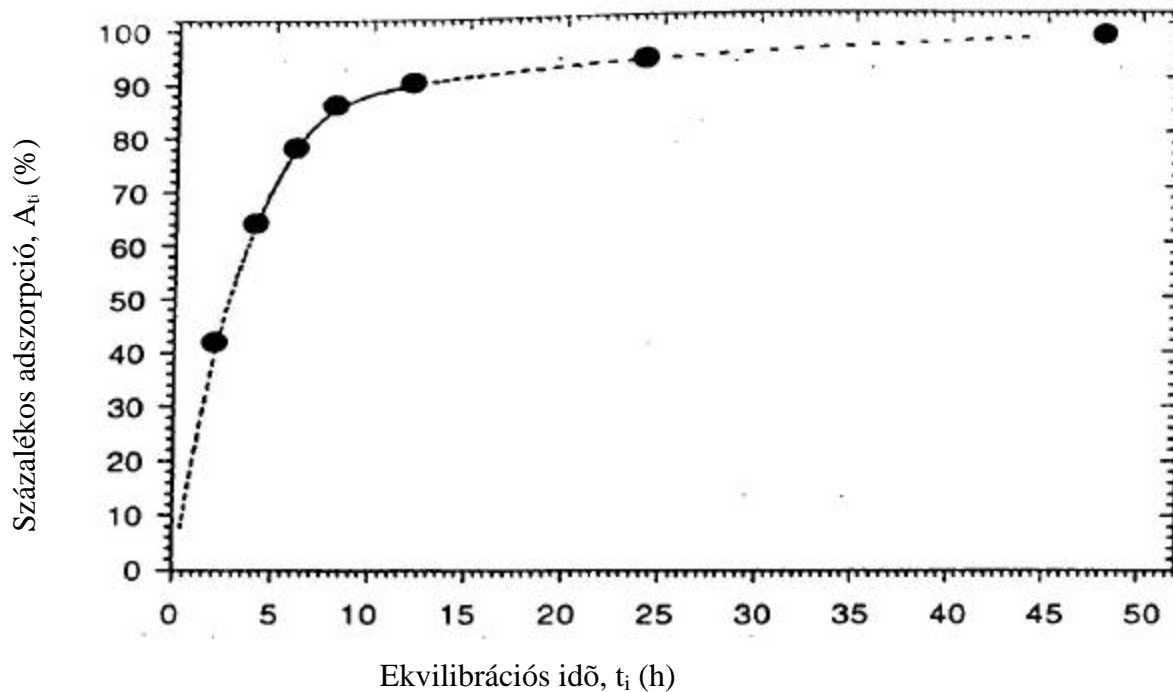
C_0 = a talajjal érintkezésbe kerülő oldat kiindulási testanyag-koncentrációja ($\mu\text{g cm}^{-3}$)

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = a testanyag koncentrációja a vizes fázisban az analízis t_i időpontjában ($\mu\text{g cm}^{-3}$); ezt az értéket analitikai módszerekkel, a vakpróbák értékeinek figyelembevételével határozzuk meg

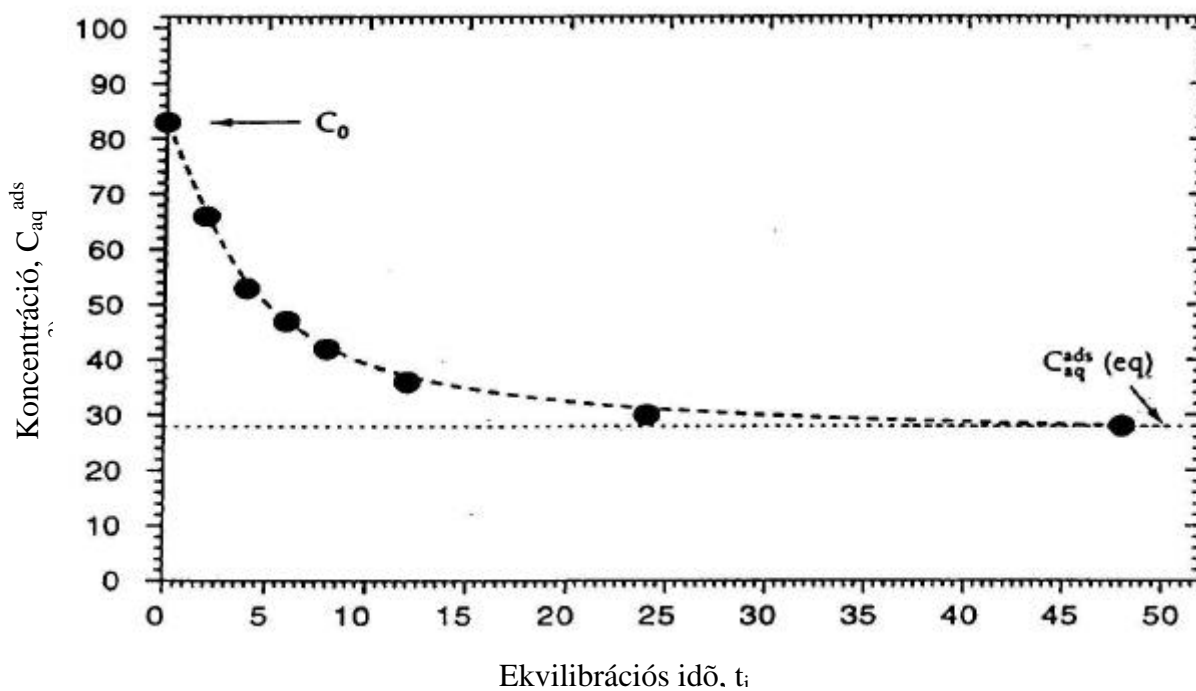
V_0 = a testoldatnak a talajjal érintkezésbe kerülő kiindulási térfogata (cm^3)

⁵ Ez az egyenlet a direkt és az indirekt módszer esetében is alkalmazható. A többi egyenlet csak az indirekt módszer esetében alkalmazható.

A százalékos adszorpció (A_t), illetve a $C_{aq}^{ads}(t_i)$ értékeit az idő függvényében ábrázoljuk, majd meghatározzuk a szorpció ekvilibrium kialakulásához szükséges időt. Ilyen grafikonok egy-egy példáját mutatja az 1. és a 2. ábra.



1. ábra. Az adszorpció egyensúly kialakulása



2. ábra. A vizes fázis testanyag-koncentrációja (C_{eq}) az idő függvényében

b) „Folytatásos” módszer

Az alábbi egyenletek számításba veszik, hogy az adszorpciós vizsgálat során a tesztanyag mérése a vizes fázisból meghatározott időpontokban kivett kis térfogatokban történik.

– Az összes időintervallum esetében a talajon adszorbeálódott tesztanyag mennyiségét a következők szerint határozzuk meg:

– az első időintervallumra $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\mathbf{Dt}_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4.)$$

– a második időintervallumra $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\mathbf{Dt}_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5.)$$

– a harmadik időintervallumra $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\mathbf{Dt}_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6.)$$

– az n-edik időintervallumra $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\mathbf{Dt}_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7.)$$

– Az egyes időintervallumokra vonatkozó százalékos adszorpciót ($A_{\Delta t_i}$) a következő egyenlet alapján számítjuk ki:

$$A_{\mathbf{Dt}_i} = \frac{m_s^{ads}(\mathbf{Dt}_i)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (8.)^{(1)}$$

A t_i időpontra vonatkozó százalékos adszorpciót (A_{t_i} vagy $A_{\Delta t_i}$) az alábbi egyenlet adja:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\mathbf{Dt}_1}^{\mathbf{Dt}_i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (9.)^{(1)}$$

Az A_{t_i} vagy az $A_{\Delta t_i}$ értékeit (a vizsgálat igénye szerint) az idő függvényében ábrázoljuk, és meghatározzuk a szorpciós egyensúly kialakulásához szükséges időt.

– A t_{eq} ekvibrációs idő elteltével
= a talajon adszorbeálódott tesztanyag tömege:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\mathbf{Dt}_i=1}^n m_s^{ads}(\mathbf{Dt}_i) \quad (10.)^{(1)}$$

= a tesztanyag tömege az oldatban:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{Dt_i=1}^n m_s^{ads}(Dt_i) \quad (11.)^{(1)}$$

= a százalékos adszorpció az egyensúlyi állapotban:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 (\%) \quad (12.)^{(1)}$$

A fentiekben használt paraméterek definíciói:

$m_s^{ads}(Dt_1), m_s^{ads}(Dt_2), \dots, m_s^{ads}(Dt_n)$ = a talajon adszorbeált tesztanyag tömege a $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ időintervallumokban (μg)

$m_m^{ads}(Dt_1), m_m^{ads}(Dt_2), \dots, m_m^{ads}(Dt_n)$ = a V_a^A alikvotokban, a t_1, t_2, \dots, t_n időpontokban mért tesztanyag tömege (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = a talajon adszorbeálódott tesztanyag tömege adszorpció egyensúlyi állapotban (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a tesztanyag tömege az oldatban, adszorpció egyensúlyi állapotban (μg)

V_a^A = a kivett alikvot térfogata, amelyben a tesztanyagot mérjük (cm^3)

A_{Dt_i} = a Δt_i időintervallumra vonatkozó százalékos adszorpció (%)

A_{eq} = százalékos adszorpció adszorpció egyensúlyi állapotban (%)

DESZORPCIÓ (D%)

A deszorpció kinetikai vizsgálat t_0 időpontjának azt a pillanatot tekintjük, amikor a maximálisan kinyerhető tesztanyagoldatot (az adszorpció egyensúly kialakulása után) azonos térfogatú 0,01 M CaCl_2 -oldattal pótoljuk.

a) Párhuzamos módszer

Egy t_i időpontban az i csőből származó vizes fázisban (V_r^i) jelen levő tesztanyag tömegét megmérjük, a deszorbeálódott tesztanyag tömegét a következő egyenlet alapján határozzuk meg:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13.)$$

A deszorpció egyensúlyban $t_i = t_{eq}$, ezért $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

A Δt_i időintervallumban deszorbeálódott tesztanyag tömegét a következő egyenlet alapján számíthatjuk ki:

$$m_{aq}^{des}(Dt_i) = m_m^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14.)$$

A százalékos deszorpciót

– t_i időpontban a 15. egyenlet:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (15.)$$

– a Δt_i időintervallumban pedig a 16. egyenlet adja meg:

$$D_{D_{t_i}} = \frac{m_{aq}^{des}(D_{t_i})}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (16.)$$

ahol:

D_{t_i} = százalékos deszorpció a t_i időpontban (%)

$D_{\Delta t_i}$ = százalékos deszorpció a Δt_i időintervallumban (%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = a deszorbeálódott tesztanyag tömege a t_i időpontban (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = a deszorbeálódott tesztanyag tömege a Δt_i időintervallumban (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = a deszorbeálódott tesztanyag vizes fázisban analitikailag mért tömege a t_i időpontban az analízishez kivett V_r^i oldattérfogatban meghatározva (μg)

m_{aq}^A = az adszorpciós egyensúlyból a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt a talajban maradt tesztanyag tömege (μg)

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17.)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = a tesztanyag tömege az oldatban adszorpciós egyensúlyi állapotban (μg)

V_R = a csőből az adszorpciós egyensúly kialakulása után kivett felülúszó térfogata, amelyet azonos mennyiségű 0,01 M CaCl_2 -oldattal pótolunk

V_r^i = a deszorpciós kinetikai vizsgálat során az (i) csőből a tesztanyag méréséhez kivett oldat térfogata (cm^3)

A deszorpciós D_{t_i} vagy $D_{D_{t_i}}$ értékeket (a vizsgálat igénye szerint) az idő függvényében ábrázoljuk, és a deszorpciós egyensúly kialakulásáig eltelt időt meghatározzuk.

b) „Folytatásos” módszer

A következő egyenletek számításba veszik azt, hogy a deszorpciós vizsgálatot megelőző adszorpciós vizsgálatot a tesztanyagmennyiség a vizes fázisból kivett kis térfogatokban (v_a^A) történő meghatározásával végeztük (a „folytatásos” módszert lásd az 1.9. A teszt kivitelezése című részben). Feltételezzük, hogy (a) az adszorpciós kinetikai vizsgálat után eltávolított felülúszót azonos térfogatú 0,01 M CaCl_2 -oldattal pótoltuk (V_R) és (b) a talajjal érintkezésben levő vizes fázis össztérfogata (V_T) a deszorpciós vizsgálat során állandó, és mennyiségét az alábbi egyenlet adja meg:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18.)$$

A t_i időpontban:

– a tesztanyag mennyiségét egy kivett kis térfogatban (v_a^D) meghatározzuk, és a deszorbeálódott tesztanyag tömegét az alábbi egyenlet szerint számítjuk:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19.)$$

- a deszorpciók ekvilibrumban $t_i = t_{eq}$, ezért $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.
- A százalékos deszorpciót (D_{t_i}) a következő egyenlet segítségével számítjuk ki:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (20.)$$

A Δt_i időintervallumban:

Az egyes időintervallumokban deszorbeálódott tesztanyag mennyiségét az alábbiak szerint számítjuk ki:

- az első időintervallumra $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \quad \text{és} \quad m_s^{des}(t_1) = m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_1) \quad (21.)$$

- a második időintervallumra $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) \quad \text{és}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - [m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_1) + m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_2)] \quad (22.)$$

- az n-edik időintervallumra $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq i}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \cdot m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_i) \right]$$

$$\text{és} \quad m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n \neq i}^n m_{aq}^{des}(\mathbf{D}t_i) \quad (23.)$$

Végül, az egyes időintervallumokra vonatkozó százalékos deszorpciót az alábbi egyenlet szerint számítjuk:

$$D_{Dt_i} = \frac{m_{aq}^{des}(Dt_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (24.)$$

a t_i időpontra vonatkozó százalékos deszorpciót pedig a következő egyenlet adja:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=Dt_1}^{Dt_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (25.)$$

amelyekben használt paraméterek meghatározásai a következők:

- $m_s^{des}(Dt_1), m_s^{des}(Dt_2), \dots, m_s^{des}(Dt_n) =$ a $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ időintervallumok után a talajon adszorbeált állapotban maradt tesztanyag tömege (μg)
- $m_{aq}^{des}(Dt_1), m_{aq}^{des}(Dt_2), \dots, m_{aq}^{des}(Dt_n) =$ a $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ időintervallumokban deszorbeálódott tesztanyag tömege (μg)
- $m_m^{des}(t_1), m_m^{des}(t_2), \dots, m_m^{des}(t_n) =$ a t_1, t_2, \dots, t_n időpontokban a V_a^A alikvotokban mért tesztanyag tömege (μg)
- $V_T =$ a „folytatásos” deszorpciók kinetikai vizsgálat során a talajjal érintkező vizes fázis összterfogata (cm^3)
- $m_{aq}^A =$ az adszorpciók egyensúlyból – a tökéletlen folyadékeltávolítás miatt – visszamaradó tesztanyag tömege (μg)

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) - V_R \right)}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26.)$$

- $V_R =$ a csőből az adszorpciók egyensúly kialakulása után eltávolított felülúszó térfogata, amelyet azonos mennyiségű 0,01 M CaCl_2 -oldattal pótolunk (cm^3)
- $v_a^D =$ a „folytatásos” módszerrel végzett deszorpciók kinetikai vizsgálat során az (i) csőből, analitikai célra kivett alikvot térfogata (cm^3)

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27.)$$

6. melléklet

TALAJON TÖRTÉNŐ ADSZORPCIÓ/DESZORPCIÓ VIZSGÁLATA

ADATKÖZLŐ LAPOK

Tesztanyag:

Tesztelt talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 h):%

Hőmérséklet: °C

Az analitikai módszer megfelelősége

Bemért talajmennyiség	g	
A talaj száraz tömege	g	
A CaCl ₂ -oldat térfogata	cm ³	
A oldat névleges végkoncentrációja	µg cm ⁻³	
A oldat analitikai módszerrel meghatározott végkoncentrációja	µg cm ⁻³	

Az alkalmazott analitikai módszer elve:

Az analitikai módszer kalibrációja:

Tesztanyag:

Tesztelt talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 h):%

Hőmérséklet: °C

Az adszorpció vizsgálata: vakpróbák és kontrollok

	Jele	Mértékegysége	Vakpróba		Vakpróba		Kontroll	
A testcső száma								
Bemért talajmennyiség		g					0	0
A bemért talajban jelen levő víz (kiszámított) térfogata		cm ³					–	–
A hozzáadott 0,01 M CaCl ₂ -oldat térfogata		cm ³						
A hozzáadott tesztanyag-törzsoldat térfogata		cm ³	0	0				
A vizes fázis (számított) össztérfogata		cm ³					–	–
A tesztoldat kiindulási koncentrációja a vizes fázisban		µg cm ⁻³						
Rázatus és centrifugálás után								
Koncentráció a vizes fázisban		µg cm ⁻³						

Megjegyzés: szükség esetén a táblázatba új oszlopokat is be lehet iktatni.

Tesztanyag:

Tesztelt talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 h):%

Hőmérséklet: °C

Tömegegyensúly

	Jele	Mértékegysége				
A tesztcső száma						
Bemért talajmennyiség	–	g				
A talaj száraz tömege	m_{talaj}	g				
A bemért talajban jelen levő víz (kiszámított) térfogata	V_{WS}	cm^3				
A talaj ekvibrálásához használt 0,01 M CaCl_2 -oldat térfogata		cm^3				
A törzsoldat térfogata		cm^3				
A talajjal érintkezésbe kerülő vizes fázis össztérfogata	V_0	cm^3				
A tesztoldat kiindulási koncentrációja	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Ekvibrációs idő	–	h				
Rázatás és centrifugálás után						
A tesztanyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja adszorpciós egyensúlyban	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}} (eq)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Ekvibrációs idő	t_{eq}	h				
Az 1. oldószeres hígítás						
A kivett vizes fázis térfogata	V_{rec}	cm^3				
A hozzáadott oldószer térfogata	ΔV	cm^3				
Az 1. oldószeres extrakció						
Az oldószerben analizált jel	S_{E1}	változó				
A tesztanyag koncentrációja az oldószerben	C_{E1}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
A talajból és az edény faláról extrahált tesztanyag tömege	m_{E1}	μg				
A 2. oldószeres hígítás						
A kivett vizes fázis térfogata	ΔV_s	cm^3				
A hozzáadott oldószer térfogata	$\Delta V'$	cm^3				
A 2. oldószeres extrakció						
Az oldószerben analizált jel	S_{E2}	változó				
A tesztanyag koncentrációja az oldószerben	C_{E2}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
A talajból és az edény faláról extrahált tesztanyag tömege	m_{E2}	μg				
A két lépésben extrahált tesztanyag teljes tömege	m_{E}	μg				
Tömegegyensúly	MB	%				

Tesztanyag:

Tesztelt talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 h):%

Hőmérséklet: °C

Adszorpciós izotermák

	Jele	Mértékegysége								
A tesztcső száma										
Bemért talajmennyiség	–	g								
A talaj száraz tömege	E	g								
A bemért talajban jelen levő víz (kiszámított) térfogata	V_{ws}	cm ³								
A talaj ekvilibrálásához használt 0,01 M CaCl ₂ -oldat térfogata		cm ³								
A hozzáadott törzsoldat térfogata		cm ³								
A talajjal érintkezésbe kerülő vizes fázis össztérfogata	V_0	cm ³								
A tesztoldat kiindulási koncentrációja	C_0	µg cm ⁻³								
Ekvilibrációs idő	–	h								
Rázatás és centrifugálás után										
A tesztanyagnak a vakpróba értékeivel korrigált koncentrációja a vizes fázisban	$C_{aq}^{ads} (eq)$	µg cm ⁻³								
Hőmérséklet		°C								
1 g talaj által adszorbeált tesztanyag tömege	$C_s^{ads} (eq)$	µg g ⁻¹								

Regressziós analízis:

A K_F^{ads} értéke:

Az 1/n értéke:

Regressziós együttható (r^2):

Tesztanyag:

Tesztelt talaj:

A talaj szárazanyag-tartalma (105 °C, 12 h):%

Hőmérséklet: °C

Az analitika metodológiája: Indirekt Párhuzamos „Folytatásos”
 Direkt

Deszorpciós teszt

	Jele	Mértékegysége	Időinter- vallum	Időinter- vallum	Időinter- vallum	Időinter- vallum
Az adszorpciós lépésből származó cső száma						
A talajon adszorbeált anyag tömege egyensúlyi állapotban	$m_s^{ads} (eq)$	µg				
A vizes fázis eltávolított térfogata, amelyet 0,01 M CaCl ₂ -dal pótolunk	V_R	cm ³				
A talajjal érintkező vizes fázis teljes térfogata	PM V_0 FM V_T	cm ³ cm ³				
Az adszorpciós egyensúlyból – a tökéletlen térfogat helyettesítésből adódóan – visszamaradt tesztanyag tömege	m_{aq}^A	µg				
<i>Deszorpciós kinetika</i>						
A talajról deszorbeálódott anyag mért tömege a t _i időpontban	$m_m^{des} (t_i)$	µg				
Az (i) csőből a tesztanyag méréséhez kivett oldat térfogata	PM V_r^i	cm ³				
	FM V_a^D	cm ³				
A talajról deszorbeálódott anyag tömege a t _i időpontban (számított érték)	$m_{aq}^{des} (t_i)$	µg				
A talajról Δt _i időintervallumban deszorbeálódott anyag tömege (számolt mennyiség)	$m_{aq}^{des} (Δt_i)$	µg				
<i>Deszorpciós százalék</i>						
Deszorpció a t _i időpontban	D_{t_i}	%				
Deszorpció a Δt _i időintervallumban	$D_{Δt_i}$	%				
Látszólagos deszorpciós koefficiens	K_{des}					

PM: párhuzamos módszer

FM: folytatásos módszer

C.19. ADSZORPCIÓS EGYÜTTHATÓ BECSLÉSE TALAJON ÉS SZENNYVÍZISZAPON NAGYHATÉKONYSÁGÚ FOLYADÉK KROMATOGRÁFIÁVAL (HPLC)

1. ELJÁRÁS

Az eljárás azonos az OECD TG121 (2000) módszerrel.

1.1. Bevezetés

Az anyagok szorpciós (megkötődési) tulajdonságait talajokban vagy szennyvíziszapokban a C.18 eljárás szerint kísérletesen meghatározott paraméterekkel lehet leírni/meghatározni. Az egyik fontos paraméter az adszorpciós együttható, mely az anyag koncentrációja a talajban, illetve az iszapban és a vizes fázisban mért koncentráció közötti arányszám adszorpciós egyensúlyban. A talaj szervesszén-tartalmára vonatkoztatott adszorpciós együttható (K_{oc}) egy hasznos mutató, mely jellemzi a talaj vagy szennyvíziszap szervesanyagának megkötő képességét és lehetővé teszi az összehasonlítást a különböző kémiai anyagok között. Ez a paraméter becsülhető a vízdoldhatóság és az n-oktanol/víz megoszlási hányados közötti kapcsolat alapján (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

A kísérletes eljárás, mely ebben a fejezetben ismertetésre kerül, HPLC-t használ adszorpciós együttható (K_{oc}) becslésére talajban és szennyvíziszapban (8). Az így becsült értékek megbízhatóbbak, mint az QSAR becslésekből nyert értékek (9). Mivel ez egy becslési eljárás, ezért az egyensúlyi C.18 metodikát nem helyettesítheti teljes egészében. Mindezzel együtt a becsült K_{oc} hasznos lehet a megfelelő tesztparaméterek kiválasztásában a C.18 eljárás szerinti adszorpciós/deszorpciós tanulmányokhoz, amelyben meghatározzuk a megoszlási hányadost (K_d) vagy a Freundlich-féle adszorpciós együtthatót (K_f) a 3. egyenlet szerint (l. az 1.2. fejezetet).

1.2. Definíciók

K_d : megoszlási hányados; a szorbensből (talajból vagy szennyvíziszapból) álló, kétfázisú rendszerben meghatározott, egyensúlyi oldott tesztanyag-koncentrációk (C) hányadosa. A megoszlási hányados dimenzió nélküli érték, mivel a koncentrációkat mindkét fázisban tömeg/tömeg alapon fejezzük ki. Abban az esetben, ha a vizes fázis tesztanyag-koncentrációját tömeg/térfogat egység fejezzük ki, úgy a K_d mértékegysége ml/g. A K_d értéke a szorbens tulajdonságai, valamint a koncentráció függvényében változhat.

$$K_d = \frac{C_{talaj}}{C_{víz}} \quad \text{vagy} \quad \frac{C_{iszap}}{C_{víz}} \quad (1)$$

Ahol

C_{talaj} = a vizsgálati anyag koncentrációja a talajban egyensúlyi állapotban ($\mu\text{g/g}$)

C_{iszap} = a vizsgálati anyag koncentrációja a szennyvíziszapban egyensúlyi állapotban ($\mu\text{g/g}$)

$C_{víz}$ = a vizsgálati anyag koncentrációja a vizes fázisban egyensúlyi állapotban ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$)

K_f : a Freundlich-féle adszorpciós együtthatót a vizsgálati anyag talajbani vagy szennyvíziszapbani koncentrációjaként határozzuk meg (x/m), amikor az egyensúlyi koncentráció a vizes fázisban $C_{víz} = 1$, mértékegysége: $\mu\text{g/g}$ szorbens. A K_f értéke a szorbens tulajdonságaitól függ.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{víz} \quad (2)$$

ahol:

x/m = a szorbensen – m (g) – megkötődött vizsgálati anyag mennyisége x (μg), egyensúlyi állapotban

$1/n$ = a Freundlich-féle adszorpciós izoterma meredeksége

$C_{víz}$ = a vizsgálati anyag koncentrációja a vizes fázisban egyensúlyi állapotban ($\mu\text{g/ml}$).

Ha $C_{víz} = 1$; $\log K_f = \log \frac{x}{m}$.

K_{oc} : a megoszlási hányados (K_d) vagy Freundlich-féle adszorpciók együttható a szorbens szerkezet-tartalmában (f_{oc}) kifejezve: különösen a nem ionos vegyületek esetében, a vizsgálati anyag és a szorbens közötti adszorpció mértékét kifejező, közelítő mutató, mely lehetővé teszi az összehasonlítást a különböző vegyületek között. A K_d és K_f mértékegységeitől függően, a K_{oc} vagy dimenzió nélküli, vagy ml/g vagy $\mu\text{g/g}$ szerves anyag.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (dimenzió nélküli vagy ml/g) vagy } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g/g)} \quad (3)$$

A K_{oc} és K_d közti kapcsolat nem mindig lineáris, és így a K_{oc} értékek a talajoktól függően változhatnak, de variabilitásuk sokkal kisebb, mint a K_d vagy K_f értékeké.

Az adszorpciók együttható levezethető a kapacitási faktorból (k'), ha a $\log k'$ és egy választott referenciavegyület $\log K_{oc}$ kalibrációs görbéjét használjuk.

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o} \quad (4)$$

ahol:

t_R : a vizsgálati és referenciaanyag HPLC-s retenció ideje (perc)

t_o : HPLC holtidő (perc) (l. az 1.8.2. fejezetet)

P_{ow} : oktanol/víz megoszlási hányados, az oldott vizsgálati anyag oktanolban, illetve vízben meghatározott koncentrációinak hányadosa; ez dimenzió nélküli érték.

$$P_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{v\acute{e}z}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

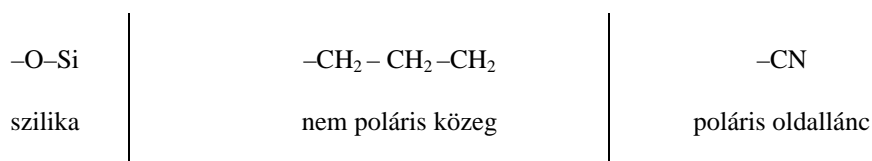
1.3. Referenciaanyagok

A szerkezeti képletet, tisztaságot és a disszociációs állandót (ha lehetséges) ismernünk kell az eljárás használata előtt. Hasznos, ha ismerjük az anyag vízben és szerves oldószerekben való oldhatóságát, az oktanol/víz megoszlási hányadosát, valamint hidrolitikus tulajdonságait.

Ha a vizsgálati anyag mért HPLC-s retenciósidő-adatait az adszorpciók együtthatóra akarjuk vonatkoztatni, kalibrációs görbét veszünk fel a $\log k'$ -re a $\log K_{oc}$ függvényében. Minimum hat mérési pontot használunk, a vizsgálati anyag várható értéke alatt és felett legalább egy-egy mérési ponton kell mérnünk. Az eljárás pontossága szignifikánsan megnő, ha a referenciaanyag szerkezete hasonló a vizsgálati anyag szerkezetéhez. Ha ilyen adatok nem állnak rendelkezésre, a vizsgálótól függ, milyen referenciaanyagokat használ. Ebben az esetben ajánlatos általánosabb, szerkezetileg heterogénebb anyagokat választani. A Függelék 1. táblázata tartalmazza a referenciaanyagként használható vegyületeket, valamint K_{oc} értékeket a szennyvíziszapra, a 3. táblázat a talajra. Más kalibrációs anyagok kiválasztását indokolni kell.

1.4. Az eljárás elve

A HPLC-s vizsgálatához használt analitikai oszlop töltete a kereskedelemben elérhető szilárd fázisú cianopropil lipofil és poláris oldalláncokkal. Közepesen poláris, szilika alapú állófázist alkalmazunk:



Az eljárás elve hasonló az A.8 metodikához (megoszlási együttható, HPLC módszer). Amíg a vizsgálandó anyag a mozgófázissal együtt áthalad az oszlopon, a vizsgálandó anyag reakcióba lép az állófázissal. A vizsgálandó anyag megoszlik a mozgófázis és állófázis között, emiatt késleltetetten jelenik meg. Az állófázis kettős összetétele miatt (vannak poláris és nem poláris kötőhelyei) lehetőség nyílik a molekula poláris és nem poláris csoportjainak reakciójára

hasonlóan ahhoz, ahogy a szerves anyagok viselkednek talaj, vagy szennyvíziszap mátrixokban. Ez teszi lehetővé, hogy megbecsüljük az adszorpciók együtthatóját az oszlopon meghatározható retenciós idő és a szerves anyagon való megkötődés közti kapcsolat alapján.

A pH jelentősen befolyásolja a megkötődési viselkedést, főleg a poláris anyagok esetében. A mezőgazdasági talajok vagy a szennyvíztisztító berendezések tankjaiban a pH általában 5,5–7,5 között mozog. Az ionképző anyagokat csak abban az esetben kell – megfelelő pufferoldatok segítségével – mind ionizált formájukban, mind nem ionos formájukban vizsgálni, ha vizsgálati anyag a pH 5,5–7,5 tartományban legalább 10%-ban disszociál.

Mivel a HPLC-s oszlopon történő retenció és az adszorpciók együtthatója közötti összefüggést használjuk a becslésre, nincs szükség kvantitatív analitikai eljárásra, csupán a retenciós időt kell meghatározni. Ha megfelelő referenciaanyagkészletünk van és standard kísérleti körülmények között dolgozunk, ez az eljárás gyors és hatékony módszer az adszorpciók együttható (K_{oc}) becslésére.

1.5. A teszt alkalmazhatósága

A HPLC-eljárás azokra (a jelölt vagy jelöletlen) kémiai anyagokra alkalmazható, amelyekre van megfelelő meghatározási eszköz (pl. spektrofotométer, radioaktív detektor) és elég stabilak a vizsgálat ideje alatt. Ez a módszer különösen hasznos olyan esetekben, amikor a vizsgálandó anyagot más kísérleti körülmények között nehéz vizsgálni (pl. illékony anyagok, vízben az analitikai meghatározáshoz szükséges koncentrációban nem oldható anyagok, illetve az inkubációs rendszerben a felszínhez erősen kötődő anyagok esetében). A metodika használható keverékekre is, amelyek nem adnak szétváló elúciós sávokat. Ilyen esetben a vizsgálandó keverék vegyületeinek log K_{oc} értékeinek alsó és felső határát meg kell határozni.

A szennyeződések néhány esetben problémát okoznak a HPLC-s eredmények interpretálásában, de ennek kis jelentősége van egészen addig, amíg a vizsgálandó anyag analitikailag tisztán azonosítható és a szennyeződésektől elválasztható.

Az eljárást a Függelék 1. táblázatában felsorolt anyagokra validálták, és alkalmazták számos más kémiai anyagra is, amelyek a következő vegyületsoporthoz tartoznak:

- aromás aminok (pl. trifluralin, 4-kloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-metilanilin, N-metilanilin, 1-naftilamin)
- aromás karboxilsavészterek (pl. benzoésavas metilészter, 3,5-dinitrobenzoésavas etilészter)
- aromás szénhidrogének (pl. toluol, xylool, etilbenzol, nitrobenzol)
- aryloxyphenoxypropionsav észterek (pl. diclofop-metil, fenoxaprop-etil, fenoxaprop-P-etil)
- benzimidazol és imidazol fungicidek (pl. karbendazim, fuberidazol, triazoxid)
- karboxilsavamidok (pl. 2-klórbenzamid, N,N-dimetilbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metilbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid)
- klórozott szénhidrogének (pl. endoszulfán, DDT, hexaklorobenzol, quintozol, 1,2,3-triklórbenzol)
- szerves foszfortartalmú rovarirtók (pl. azinfosz-metil, disulfoton, fenamifosz, izofenfosz, pirozofosz, sulprofosz, triazofosz)
- fenolok (pl. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaklórfenol, 2,4,6-triklórfenol, 1-naftol)
- fenilurea-származékok (pl. izoproturon, monolinuron, pencycuron)
- pigment festékanyagok (pl. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)
- poliaromás szénhidrogének (pl. acenaftén, naftalin)
- 1,3,5-triazin gyomirtók (pl. prometrin, propazin, simazin, terbutrin)
- triazolszármazékok (pl. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Az eljárás nem használható azokra az anyagokra, amelyek akár az eluenssel, akár az állófázissal reakcióba lépnek. Szintén nem használható azokra az anyagokra, amelyek a szerves komponensekkel specifikus úton reagálnak (pl. komplexképzés az agyagásványokkal). Az eljárás nem megfelelő felületaktív anyagokra, szerves vegyületekre, közepesen erős vagy erős szerves savakra, illetve bázisokra. A log K_{oc} a 1,5–5,0 tartományban határozható meg. Az ionizálható anyagok pufferolt mozgófázissal mérhetőek, de vigyázni kell, hogy elkerüljük a puffer vagy a vizsgálandó anyag kicsapódását.

1.6. Minőségi kritériumok

1.6.1. Pontosság

A módszerrel a vizsgálandó anyag adszorpciók együtthatója az egyensúlyi módszerrel meghatározotthoz képest általában $\pm 0,5$ log egységen belül becsülhető (lásd a Függelék 1. táblázatát). Nagyobb pontosság érhető el, ha a referenciaanyagok szerkezetileg hasonlóak a vizsgálati anyaghoz.

1.6.2. Ismételhetőség

A meghatározásokat legalább párhuzamosan kell végezni. A log K_{oc} értékek a párhuzamos mérések között nem térhetnek el jobban, mint 0,25 log egység.

1.6.3. Reprodukálhatóság

Az eljárás eddigi alkalmazásából eredő tapasztalatok alátámasztják a módszer validitását. A HPLC módszer vizsgálata során 48 anyag, főleg növényvédő szer talajban meghatározott K_{oc} értékei alapján korrelációs koefficiens $R=0,95$ volt (10) (11).

Egy laboratóriumok közti összehasonlító vizsgálat során, amelyben 11 laboratórium vett részt, fejlesztették és validálták a módszert (12). Az eredményeket a Függelék 2. táblázata foglalja össze.

1.7. A vizsgálati módszer leírása

1.7.1. Az adszorpció együttható előzetes becslése

Az oktanol-víz megoszlási együttható P_{ow} (= K_{ow}) és bizonyos mértékig a vízdoldhatóság is használható az adszorpció mértékét kifejező mutatóként, különösen a nem ionos anyagok esetében, sőt ezek alapján előzetesen becsülhető a vizsgálati tartomány is. Többféle hasznos korrelációról beszámoltak közleményekben kémiai anyagok számos csoportjára (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. Készülék

Az ajánlott folyadékkromatográf pulzálásmentes pumpával és megfelelő detektorral legyen felszerelve. Injektor hurokkal(loop) ellátott szelep használata ajánlott. Használjunk kémiaileg kötött kereskedelmi cyanopropil szilika alapú töltetet (pl. Hypersil, Zorbax CN).

Előtétoszlop ugyanolyan töltettel behelyezhető az injektáló rendszer és az analitikai oszlop közé. A különböző forgalmazók által gyártott oszlopok elválasztó képessége jelentősen különböző lehet. Útmutatásként a következő kapacitási faktorokkal rendelkezzen: $\log k' > 0,0$ legyen a $\log K_{oc} = 3,0$ -ra, és $k' > 0,4$ legyen a $\log K_{oc} = 2,0$ -ra, ha mozgófázisként metanol/víz 55/45% elegyet használunk.

1.7.3. Mozgófázis

Számos mozgófázist megvizsgáltak, a következő kettő ajánlott:

- metanol/víz (55/45 v/v %)
- metanol/0,01 M citrátbuffer pH 6,0 (55/45 v/v %)

HPLC minőségű metanolt és desztillált vizet vagy citrátbufferet használjunk az elúciós oldat készítéséhez. A keveréket gáztalanítsuk használat előtt. Izokratikus elúciót alkalmazzunk. Ha nem megfelelő a metanol/víz elegy, kipróbálhatunk más szerves oldószer/víz elegyet, pl. etanol/víz vagy acetonitril/víz keveréket. Az ionizálható vegyületeknél ajánlott puffert alkalmazni a stabil pH eléréséhez. Vigyázni kell, hogy elkerüljük a sók kicsapódását és az oszlop károsodását, ami előfordulhat néhány szerves oldószer/puffer keveréknél.

Egyéb aditívek, mint pl. ionpárok az álló fázis szorpció tulajdonságainak befolyásolása miatt nem alkalmazhatók. Az álló fázis ilyen változásai ugyanis irreverzibilisek lehetnek. E célból az aditíveket alkalmazó kísérleteket külön oszlopokon kell végezni.

1.7.4. Oldott anyagok

A vizsgálandó anyagokat és a referenciaanyagokat a mozgófázisban oldjuk fel.

1.8. A vizsgálat kivitelezése

1.8.1. A vizsgálat körülményei

A mérés alatt a hőmérsékletet mérni kell. A hőmérséklet-kontrollált oszlop használata igen javasolt, hogy a kalibráció, a becslési futtatások, valamint a vizsgálandó anyag mérése alatt biztosítsuk az állandó körülményeket.

1.8.2. A holtidő (t_0) meghatározása

Két különböző módszer szükséges a holtidő (t_0) meghatározásához (lásd még az 1.2. fejezetet).

1.8.2.1. A holtidő meghatározása homológ sorok segítségével

Ez az eljárás megbízható és standard értékeket adott t_0 -ra. A részleteket lásd az A.8. vizsgálati módszernél, a HPLC-metodikával meghatározott (n-oktanol/víz) megoszlási hányados című részben.

1.8.2.2. A holtidő meghatározása inert anyagokkal, amelyek nem kötődnek meg az oszlopon

Ez az eljárás azon alapul, hogy formamid-, urea- vagy nátrium-nitrát oldatot injektálunk az oszlopra. A méréseket legalább két párhuzamosban kell elvégezni.

1.8.3. A retenciós idők (t_R) meghatározása

Referenciaanyagokat választunk az 1.3. fejezet szerint. Ezeket a retenciós idők meghatározására injektálhatjuk keverékként is, feltéve, ha bizonyítást nyert, hogy egyik referenciaanyag retenciós idejét sem befolyásolja a többi referenciaanyag jelenléte. A kalibrációt napközben egyenletesen elosztva legalább kétszer végezzük el, hogy az oszlop tulajdonságaiban bekövetkező, nemvárt változásokat számításba tudjuk venni. A legmegfelelőbb gyakorlat szerint a vizsgálandó anyag injektálása előtt és után injektáljuk a kalibrációs anyagokat. Így meggyőződhetünk arról, hogy a retenciós idő nem módosult-e. A vizsgálati anyagokat külön, a lehető legkisebb mennyiségben injektáljuk az oszlopra (hogy elkerüljük az oszlop túlterhelését) és meghatározzuk a retenciós időket. A mérés megbízhatóságát növelendő legalább két párhuzamos mérést végezzünk. A $\log K_{oc}$ értékek, amelyek az egyes mérésekből adódnak, 0,25 log egység tartományon belül kell hogy legyenek.

1.8.4. Értékelés

A kapacitási faktorokat a választott referenciaanyagok holtidejéből és retenciós idejéből számítjuk a 4. egyenlet alapján (1. az 1.2. fejezetet). A referenciaanyagok $\log k'$ adatait ezután grafikusán ábrázoljuk a $\log K_{oc}$ értékek függvényében, amelyeket az egyensúlyi vizsgálatok alapján kaptak. Ezek a Függelék 1. és 3. táblázatában megtalálhatók. A grafikont használva a vizsgálati anyagok $\log k'$ értékei alapján meghatározzuk a $\log K_{oc}$ értékeket.

Amennyiben az eredmények szerint a vizsgálati anyag $\log K_{oc}$ értéke a teszt kalibrációs tartományán kívülre esik, a vizsgálatot más, megfelelőbb referencia anyagokkal kell megismételni.

2. ADATOK ÉS JELENTÉS

A jelentés a következőket tartalmazza:

- a vizsgálati és a referenciaanyagok azonosítását, tisztaságukat, a pK_a értékeket, ha rendelkezésre állnak
- a műszer leírását és a vizsgálati körülményeket: pl. az analitikai (és az előtét-) oszlop típusát, méreteit, a detektálás módját, a mozgófázist (a komponensek arányát és a pH-t), valamint a hőmérsékleti tartományt a mérés alatt
- a holtidőt és a meghatározására használt módszert
- a vizsgálati és referenciaanyagok mennyiségét, amelyet az oszlopra injektáltunk
- a referenciavegyületek retenciós idejét, amelyeket a kalibrációra használtunk
- a regresszió egyenes jellemzőit ($\log k'$ és $\log K_{oc}$ között) és a regressziós egyenes grafikonját
- a vizsgált vegyület átlagos retenciós adatát és a becsült $\log K_{oc}$ értéket
- a kromatogramokat.

3. IRODALOM

- (1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.
- (2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.
- (3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.
- (4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227-231.
- (5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci Health, B19, pp. 297-312.
- (6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.
- (7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 833-846.
- (8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
- (9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.
- (10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases. Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.
- (11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.
- (12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

Függelék

1. táblázat

A talajra és szennyvíziszapra vonatkozó k_{oc} értékek és a hplc metodikával becsült értékek összehasonlítása ⁽¹⁾⁽²⁾

Anyag	CAS No	Log K_{oc} szennyvíziszap	Log K_{oc} HPLC	Δ	Log K_{oc} talaj	Log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazine	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantrén	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Benzooesavas fenilészter	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-Nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Acetanilid	103-84 -4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Anilin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-Diklóranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

⁽¹⁾ W. Kördel, D. Hennecke, M. Hermann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere. 35(1/2), pp. 121-128.

⁽²⁾ W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere. 35(112), pp. 107-119.

2. táblázat

Laboratóriumok közti összehasonlító vizsgálat eredményei (11 résztvevő laboratórium), amelyek alapján javították és validálták a hplc metodikát ⁽¹⁾

Anyag	CAS No	Log K_{oc} (OECD 106)	K_{oc}	Log K_{oc}
			[HPLC vizsgálat]	
Atrazine	1912-24-9	1,81	78±16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100±8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292±58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465±62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	2062±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), pp. 1373-1384.

3. táblázat

A HPLC metodikához ajánlott referenciaanyagok talajadszorpciós adatok alapján

Referenciaanyag	CAS No	Log K _{oc} átlag érték az egyensúlyi vizsgálatból	K _{oc} adatok száma	Log S. D.	Hivatkozás
Acetanilide	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N.N-dimetilbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metilbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Metilbenzoát	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Izoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofosz	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalin	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfán-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yyellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-triklorobenzol	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γHCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fention	55-38-9	3,331	3	2,49	(c)
Direct Rred81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pirazofosz	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α endosulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diklofop-metil	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantrén	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41mix	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 No106 01 044 (1994).

^(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.

^(c) Ipar által szolgáltatott adatok.

C.20 DAPHNIA MAGNA REPRODUKCIÓS TESZT

1. VIZSGÁLAT

Ez a reprodukciós toxicitási teszt azonos az OECD TG 211(1998) teszttel.

1.1. Bevezetés

A teszt lényege, hogy megbecsüljük a kémiai anyagok hatását a *Daphnia magna* szaporodási képességére.

1.2. Meghatározások és egységek

Szülő állatok: azok a nőstény *Daphniák*, amelyekkel a tesztet kezdjük és amelyeknek a szaporulatát vizsgáljuk a teszt folyamán.

Szaporulat: azok a fiatal *Daphniák*, melyek a vizsgálat során születnek a szülőktől.

Legkisebb megfigyelt még hatékony koncentráció (LOEC): az a legkisebb vizsgált koncentráció, amelynél statisztikailag szignifikáns eltérés figyelhető meg a szaporodásban és a szülők mortalitásában ($p < 0,05$ szinten) a kontrollhoz viszonyítva a megfigyelt behatási periódusban. A LOEC feletti koncentrációk mindegyikének legalább annyira vagy nagyobb mértékben hatékonyan kell lennie, mint a LOEC. Ha az előbbi feltételek nem teljesülnek, teljes értékű magyarázatot kell adni arra, hogyan lett kiválasztva a LOEC (és a továbbiakban a NOEC) értéke.

Hatástalan koncentráció (NOEC): közvetlenül a LOEC alatti koncentráció, amelynél nem tapasztalunk statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$ szinten) különbséget a kontroll és a vizsgált anyag között a behatási időtartam alatt.

EC_x: a vízben oldott anyag koncentrációja, amely x %-ban csökkenti a *Daphnia magna* szaporulatát a behatási időtartam alatt.

Belső növekedési ráta: a populáció növekedés mértéke, amely magába foglalja a szaporulatot és a kor specifikus pusztulást (20) (21) (22). Ez a ráta 0 egy egyensúlyi populációban. A növekvő populációra ez az érték pozitív, míg a csökkenő populációnál negatív. Természetesen az utóbbi nem megfelelő a tesztelésre.

Detektálás határa: a legalacsonyabb koncentráció, amely megfigyelhető, de nem számszerűsíthető

Meghatározás határa: a legalacsonyabb koncentráció, amely kvantitatíven mérhető.

Mortalitás: egy állatot akkor minősítünk elpusztultnak, ha nem mozdul, vagyis nem képes úszni, vagy nem figyelhető meg mozgás a függelékben vagy az utóbélben 15 másodpercen belül a teszt edény enyhe rázogatósa ellenére sem. (Ha más meghatározást használunk, jelezni kell a referenciával együtt.)

1.3. A vizsgálati eljárás elve

24 óránál nem idősebb, fiatal *Daphniák*on a vizsgálat kezdetén vízhez adott teszt anyag hatását vizsgáljuk bizonyos koncentráció tartományban. A teszt időtartama 21 nap. A vizsgálat végén az élő szülőállat élő szaporulatát vesszük figyelembe. Ez azt jelenti, hogy az időközben elpusztult szülő állat szaporulatát kizárjuk a kalkulációból. A szülő állatok szaporulatát kifejezhetjük többféle módon (pl. állatonként és naponként az élő utódok száma az első utód megjelenését követően) ezen kívül közölni kell az élő szülőnként a teljes utód számot a vizsgálat végén. A teszt anyag hatásának kitett állatok szaporulatát viszonyítjuk a kontroll szaporulatához, hogy meghatározhassuk a LOEC, és ezt követően a NOEC értéket. Ezenkívül, amennyire lehet, az adatokat regresszió analízissel értékeljük, hogy becsülni tudjuk a szaporulat az x %-os csökkenését (pl. EC₅₀, EC₂₀ vagy EC₁₀).

A szülő állatok túlélését valamint az első születés időpontját is regisztrálni kell. Más, a vizsgálati anyag hatására fellépő hatásokat, így növekedést és a valószínű belső növekedési rátát szintén lehet vizsgálni.

1.4. A vizsgálati anyagok tulajdonságai

Egy akut toxicitási tesztet feltétlenül javasolt elvégezni (lásd C.2. 1. rész). Ennek eredménye hasznos lehet a reprodukciós teszt koncentráció tartományának beállításában. Ismerni kell a tesztanyag vízoldékonyságát és göznyomását, valamint egy megfelelő analitikai metodikát, mellyel a tesztoldatban a vizsgálandó anyag mennyiségi meghatározását elvégezhetjük, A módszer mérési határát és a visszanyerés hatékonyságát közölni kell.

Ismernünk kell a vizsgálati anyag szerkezeti felépítését, az anyag tisztaságát, fény és a vizsgálati körülmények alatti stabilitását, a pK_a-t, P_{ow}-t, a biológiai lebonthatósági teszt eredményét (lásd C.4. eljárást).

1.5. A vizsgálat érvényessége

Ahhoz, hogy a teszt érvényes legyen, a következőknek kell teljesülni a kontroll vizsgálatban:

- a szülő állatok (nőstény *Daphnia*) pusztulása nem haladhatja meg a 20 %-ot a teszt végére
- a túlélő szülők átlagos élő szaporulata ≥ 60 kell legyen a teszt végére.

1.6. A vizsgálati eljárás leírása

1.6.1. Felszerelés

A vizsgálati edények és más, a teszt oldattal érintkező berendezés üveg vagy más, kémiaailag inert anyagú kell legyen.

Ezenkívül a következő felszerelés szükséges még:

- oxigénmérő (mikroelektroddal vagy más alkalmas készülék az oldott oxigén mérésére kis térfogatokban).
- megfelelő berendezés a hőmérséklet szabályozására
- pH mérő
- a víz keménységének meghatározására alkalmas berendezés
- a víz összes szerves szén koncentrációjának (TOC) és/vagy a kémiai oxigén igényének (KOI) meghatározására alkalmas készülék

– a víz összes szerves szén koncentrációjának (TOC) és/vagy a kémiai oxigén igényének (KOI) meghatározására alkalmas készülék

- megfelelő berendezés a fény szabályozására és intenzitásának mérésére.

1.6.2. Teszt szerkezet

A teszthez használható faj a *Daphnia magna* Straus. Más *Daphnia* fajok is használhatók, ha biztosítjuk a teszt érvényességére vonatkozó feltételeket (az egyes *Daphnia* fajokra jellemző szaporodási kritériumok a kontrollban teljesülnek). Ha más *Daphnia* fajokat használunk, akkor azokat azonosítani, és használatukat indokolni kell.

A legjobb, ha genotípusosan meghatározott klónt használunk. A kutatás (1) kimutatta, hogy az A Klón (mely a franciaországi IRCHA intézetből származik) (3) megbízhatóan teljesíti a túlélő szülőnkénti átlagos utódszám ≥ 60 -at, ha a tenyésztési körülmények ebben a metodikában leírtakkal egyezők.

A vizsgálat kezdetén az állatok 24 óránál fiatalabbak legyenek és nem származhatnak az első szaporulatból. Egészséges törzstenyészetből származhatnak csak (pl. stresszre utaló tünetek nem fordulhatnak elő, úgy mint magas halandóság, hímek vagy ehippiumokjelenléte, első szaporulat megjelenésének késlekedése, szintelen állatok stb.). A törzstenyészet állatait ugyanolyan körülmények (fény, hőmérséklet, közeg, etetés, térfogategységre eső állatszám) között kell tartani, mint a tesztelés alattiakat. Ha a vizsgálatnál alkalmazott tenyészfolyadék más, mint amit a tenyésztéshez szoktunk használni, helyes, ha az állatokat a tesztelés előtt három hétig akklimatizáljuk (vagyis egy generációt), hogy elkerüljük a szülő állatok stressz reakcióit.

1.6.3. Tenyészfolyadék

Ajánlatos, hogy jól definiált tenyészfolyadékot használjunk a teszteléshez. Ezt megvalósíthatjuk úgy, hogy nem használunk tengeri alga vagy talaj kivonatokat, melyek nehezen jellemezhetőek, és ez lehetőséget ad a laboratóriumok közötti standardizálásra. Az Elendt M4 (4) és M7 tenyészfolyadék (lásd 1. Függelék) megfelelően bizonyult erre a célra. Más tenyészfolyadékok is elfogadhatóak (5) (6), ha a *Daphnia* tenyészet a tesztelés validitási kritériumainak megfelelnek.

A nem definiálható adalékokat tartalmazó tenyészfolyadékok esetében pontos leírást kell adni az adalék összetételéről, de főleg a széntartalmáról, mivel ez hozzájárulhat az alkalmazott etetéshez. Ajánlatos, hogy meghatározzuk a szerves adalékot tartalmazó törzsoldat összes szerves szén (TOC) tartalmát és/vagy a kémiai oxigén igényét (KOI) és ez alapján becsüljük meg, hogy mennyiben járul hozzá az elkészített teszt oldat TOC/KOI értékéhez. A tenyészsoldat TOC értéke 2 mg/l alatt legyen az algaetetés megkezdése előtt (7).

Ha a vizsgálandó anyagok fémekeket tartalmaznak, fontos, hogy ismerjük a teszt folyadék tulajdonságait (pl. keménység, kelátképző kapacitás), mivel ez befolyásolhatja az anyag toxicitását. Épp ezért egy jól ismert összetételű tenyészfolyadékkal kell dolgozni. Mai tudásunk szerint csak az Elendt M4 és M7 tenyészsoldat alkalmas hosszú idejű tesztelésre. Mind az M4 és M7 oldatok tartalmaznak EDTA-t. Kimutatták (2), hogy a kadmium látszólagos toxicitása általában alacsonyabb a reprodukciós tesztelésnél, ha M4 vagy M7 oldatot használnak, mintha EDTA nélküli oldattal tesztelnének. Ezért az M4 és M7 oldat nem ajánlott a fémekeket tartalmazó vizsgálati anyagok esetében, de más kelátképző anyagokkal készített oldat sem használható. Ezért alternatív megoldásként az ASTM kemény édes művizet (7) ajánlják, mely nem tartalmaz EDTA-t, de ki kell egészíteni tengeri alga kivonattal (8). Az ASTM kemény édes

műviz és tengeri alga kivonat kombinációja alkalmas a *Daphnia* hosszú idejű tenyésztésére és tesztelésre egyaránt (2), bár egy gyenge kelátképző tulajdonság ebben az esetben is megfigyelhető a tengeri alga kivonat miatt.

A tesztelés kezdetén és közben az oldott oxigén tartalom 3 mg/l felett legyen. A pH 6-9 közötti tartományba essen és normál körülmények között ne változzon többet 1,5 egységnél az egész tesztelés ideje alatt. A keménység 140 mg/l (mint CaCO₃) feletti értéke ajánlatos. Ezen, vagy ennél magasabb keménységen a szaporodási képesség megfelel a validitási kritériumoknak (9)(10).

1.6.4. Tesztoldatok

A választott koncentráció tartomány teszt oldatait rendszerint a törzsoldat hígításával készítjük. A törzsoldatot úgy készítjük, hogy az anyagot oldjuk a teszt oldatban.

Szerves oldószerekre vagy diszpergáló szerekre lehet szükség ahhoz, hogy megfelelően koncentrált törzsoldatot kapjunk, bár ezeknek a szereknek a használatát minden lehetséges módon el kell kerülni. A megfelelő szerves oldószerekre példa lehet az acetone, etanol, metanol, dimetilformamid, trietilenglikol. A diszpergálószerekre példa Cremophor RH40, 0,01%-os metilcellulóz és HCO-40.

Oldószereket is használhatunk a törzsoldatok készítésénél annak érdekében, hogy pontosan tudjuk adagolni a vízhez. Az ajánlott oldószer koncentráció a végső teszt közegben 0,1 mg/l legyen, így a fent felsorolt szerek nem lesznek toxikusak, valamint nem fokozzák az anyag vízoldhatóságát.

A diszpergáló szerek segíthetnek a pontos adagolásban és a diszperzióban. A fent felsorolt diszpergálószerek ajánlott végső koncentrációja (pl. 0,1 ml/l) nem toxikus és nem fokozza az anyag vízoldhatóságát.

1.7. A tesztelés elrendezése

Véletlenszerűen kell elrendezni, valamint kezelni a tesztedényeket. Az ebből eredő hibákat a koncentrációhatásnak tulajdoníthatjuk. Főleg, ha a vizsgálati egységeket a kezelés vagy a koncentráció sorrendjében vizsgáljuk, akkor néhány idő függő hatás, mint a kezelő fáradtsága, vagy más hiba a nagyobb koncentrációknál nagyobb hatások megállapításához vezethet. Továbbá, ha úgy ítéljük meg, hogy a kezdeti vagy a környezeti körülmények befolyásolják az eredményeket, pl. a tesztedény helyzete a laboratóriumban, meg kell fontolnunk a vizsgálat beszüntetését is.

1.8. A vizsgálat

1.8.1. A vizsgálat körülményei

1.8.1.1. Időtartam

A teszt 21 napig tart.

1.8.1.2. Tesztállatok elrendezése

A szülő állatokat egyenként tartjuk a vizsgálati edényben 50–100 ml közegben.

Nagyobb térfogatra is szükség lehet, ha a vizsgálati anyag koncentrációjának analitikai mérése csak nagyobb térfogatban oldható meg, bár a koncentráció párhuzamos edényben is mérhető. Ha nagyobb térfogatot használunk, mint 100 ml, a *Daphniáknak* adott táplálék adagot növelni kell, hogy biztosítsuk a megfelelő táplálék szükségletet és kielégítsük a validitási kritériumokat. Az átfolyásos teszt-rendszerben alternatív elrendezéseket is el lehet fogadni (pl. 10-10 állat négy csoportja egy nagyobb tesztelő térfogatban), de minden eltérést jegyzőkönyvezni kell.

1.8.1.3. Az állatok száma

A félstatikus tesztelésnél minden koncentrációra legalább 10, egyedileg elhelyezett állatot kell vizsgálni és a kontroll sorozatban szintén legalább 10 állatot használunk.

Az átfolyásos tesztelésnél 40 állatot tízesével négy csoportra osztunk minden vizsgálati koncentrációra, ez az elrendezés megfelelőnek bizonyult (1). Megengedhető kisebb állatszám is, minimálisan 20 állat egyenlő számú egyeddel 2 vagy több csoportba osztva minden koncentrációban (pl. négy párhuzamos 5-5 *Daphniával*). Megjegyzendő, hogy ahol csoportosan tartják a tesztállatokat, ott nem lehet megállapítani a teszt végén az élő szülőkre vonatkoztatott összes élő szaporulatot, ha a szülő elpusztul. Ilyen esetben a szaporulatot a teszt elején jelenlevő szülő számra vonatkoztatott élő összes szaporulattal fejezhetjük ki.

1.8.1.4. Etetés

A félstatikus teszteknél a legmegfelelőbb, ha naponta végezzük, de legalább háromszor egy héten (pl. a tesztoldatok cseréjénél). Az eltéréseket jegyzőkönyvezni kell (pl. az átfolyásos rendszerrel).

A tesztelés alatt a szülő állatokat élő alga sejtekkel etetjük a következők egyikével vagy keverékével: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (most *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) és *Scenedesmus subcapitatus*. Az etetés a szerves

szén (C) mennyiségén alapul, melyet biztosítunk minden szülő állatnak. A kutatás (12) kimutatta, hogy a *Daphnia magna* táplálékigénye 0,1-0,2 mg C/*Daphnia/nap*, ami elégséges ahhoz, hogy teljesüljön a szaporulatra vonatkozó validitási kritérium. A táplálék napi adagja lehet egyenletes a teljes tesztelés alatt, vagy lehetséges, hogy a tesztelés elején kevesebbet adunk és később, a *Daphniák* növekedésével többet, de akkor sem meghaladva a 0,1-0,2 mg C mennyiséget.

Ha helyettesítő méréseket használunk a kívánt táplálék mennyiségének eléréséhez, így az algaszámot vagy fényelnyelést (kényelmi megfontolásból, mivel a szén tartalom meghatározása időigényes mérés), akkor minden laboratóriumnak egyedileg kell nomogramot készítenie a helyettesítő mérés és a szén tartalom közti összefüggésre (lásd 2. Függelék, amely javaslatot ad a nomogram készítésre). A nomogramokat évente kell ellenőrizni, vagy gyakrabban, ha az algatenyésztés körülményei változnak. A széntartalom helyettesítő mérésre a fényelnyelést megfelelőbbnek találták, mint a sejtszámot (13).

Koncentrált alga szuszpenzióval kell etetni a *Daphniákat* (a legkisebb térfogatot használva), hogy elkerüljük a hígulást a teszt edényekben. Algakoncentrátumot centrifugálással nyerhetünk, majd ezt követően desztillált vagy ionmentes vízben, vagy *Daphnia* tenyészfolyadékban reszuszpendáljuk a sejteket.

1.8.1.5. Fény

A 16 órás megvilágítás ne haladja meg a $15-20 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$ -t.

1.8.1.6. Hőmérséklet

A vizsgálati közeg hőmérséklete $18-22^\circ\text{C}$ között legyen. Mindamellet egy tesztelésen belül a hőmérséklet nem változhat többet 2°C -nál (pl. $18-20$, $19-21$ vagy $20-22^\circ\text{C}$). Ennek ellenőrzésére használhatunk egy külön edényt.

1.8.1.7. Levegőztetés

A tesztelés alatt levegőztetni nem szabad.

1.8.2. A vizsgálati koncentrációk

Általában legalább öt koncentrációt használunk geometrikus sorba rendezve. A szorzó faktor ne haladja meg a 3,2-t és minden koncentrációhoz megfelelő számú párhuzamost kell beállítani (lásd 1.8.13. fejezetben). Indoklás szükséges, ha kevesebb, mint öt koncentrációt használunk. A vizsgálati anyagok oldhatósági limitjük (tesztközegben) felett nem vizsgálhatók.

A koncentráció tartomány összeállításánál figyelembe kell venni:

(i) Ha az a cél, hogy meghatározzuk a LOEC/NOEC értékét, akkor úgy választjuk meg a legalacsonyabb koncentrációt, hogy elég alacsony legyen ahhoz, hogy ne kapjunk szignifikánsan alacsonyabb szaporodási képességet a kontrollhoz képest. Ha ez nem áll fenn, akkor meg kell ismételni a vizsgálatot, alacsonyabb koncentrációt használva.

(ii) Ha az a cél, hogy meghatározzuk a LOEC/NOEC értékét, akkor a legmagasabb koncentrációt úgy választjuk meg, hogy elég nagy legyen ahhoz, hogy szignifikánsan alacsonyabb szaporodási képességet kapjunk a vizsgált koncentrációban a kontrollhoz képest.

(iii) Ha a szaporodásra kifejtett hatás EC_x értékének meghatározása szükséges, akkor tanácsos elegendő koncentráció használata, hogy a megfelelő konfidencia szinten lehessen meghatározni EC_x értékét. Ha az EC_{50} értékét határozzuk meg, tanácsos olyan koncentrációt is választani, ami az EC_{50} érték feletti. Bár az EC_{50} becslhető, de a konfidencia tartomány nagyon széles lesz az EC_{50} -re és nem lehet kielégítően megítélni az illetett modell adekvátságát.

(iv) A vizsgálati koncentráció tartományt úgy választjuk meg, hogy egyik koncentrációnak se legyen statisztikailag szignifikáns hatása a szülők túlélése szempontjából, ellenkező esetben az egyszerű reprodukciós teszt a reprodukciós és mortalitási teszt kombinációja lenne és sokkal komplexebb statisztikai analízis lenne szükség az értékeléshez.

A vizsgálandó anyag toxicitásának előzetes ismerete (pl. az akut tesztből és/vagy tartomány kereső vizsgálatból) segít a megfelelő vizsgálati koncentrációkat megtalálni.

Ahol oldószert vagy diszpergálószer használunk, hogy elősegítsük a tesztoldatok készítését (lásd 1.6.4. fejezetet), a végső koncentrációjuk nem haladhatja meg a teszt edényekben a 0,1 ml/l-t és koncentrációjuk minden teszt edényben azonos legyen.

1.8.3. Kontrollok

Egy kontroll sorozatot és egy oldószert, vagy diszpergálószer tartalmazó kontroll sorozatot kell beállítani a tesztanyag vizsgálata mellé. Ha használtunk oldószert vagy diszpergálószer a koncentrációjuknak ugyanannak kell lennie, mint a tesztanyagot tartalmazó edényekben. Megfelelő számú párhuzamost használjunk (lásd 1.8.1.3. fejezetet).

Általában egy jól elvégzett teszt esetében a variációs koefficiens 25% körül mozog a szülőnkénti élő szaporulatot illetően, ha a szülőket egyenként elkülönítve tartjuk a tesztelés során.

1.8.4. A teszt közeg frissítése

A teszt közeg frissítése függ a vizsgálandó anyag stabilitásától, de legalább háromszor hetente végezzük el. Ha az előzetes stabilitási vizsgálatok (lásd 1.4. fejezetet) alapján az anyag koncentrációja nem stabil (tudniillik, a nominál koncentráció a 80-120% tartományon kívül esik vagy a kezdeti koncentrációhoz képest a mért koncentráció 80% alá esik) sűríteni kell a közeg frissítését, vagy átfolyásos rendszert kell alkalmazni.

Félstatikus vizsgálatnál előkészítjük a tesztelő edények második sorozatát és a szülő állatokat egy megfelelő átmérőjű üvegpipettával áthelyezzük a lehető legkevesebb folyadék átvitelével.

1.8.5. Megfigyelések

A megfigyelések eredményeit eredménylapokon rögzítjük (lásd a példákat a 3., 4. Függelékben).

Ha más mérésekre is szükség van (lásd 1.3. és 1.8.8. fejezeteket), további megfigyeléseket is rögzítenünk kell.

1.8.6. Utódok

Az egyes szülők utódait naponta eltávolítjuk és leszámoljuk az első utódnemzedék megjelenése után, hogy megakadályozzuk a táplálék elfogyasztását, amelyet a szülőknek szántunk. Ennek a vizsgálatnak a célja szerint csak az élő utódokat számoljuk le, de feljegyezhető az abortált pete vagy elpusztult utód is.

1.8.7. Mortalitás

Legjobb, ha naponta feljegyezzük a szülő állatok pusztulását, leginkább az utódok számlálásakor.

1.8.8. Más paraméterek

Bár ez a metodika főleg a szaporodásra kifejtett hatást vizsgálja, azonban lehetőség nyílik más hatások nyomon követésére is, melyek szintén statisztikailag analizálhatók. A növekedés mérése különösen ajánlott, mivel információt nyerhetünk a lehetséges szubletális hatásokról, melynek ismerete hasznosabb lehet, mint a reprodukciós hatás egyedüli vizsgálata; a szülő állatok hosszának mérése a teszt végén szintén ajánlott (a testhossz a léctüske nélkül értendő). Más paraméterek is vizsgálhatók vagy számíthatók, így az első utódnemzettség születési ideje (valamint a következőké), a szülőnkénti utódok száma és mérete, az abortált utódok száma, hímek vagy ephippiumok jelenléte és a populáció belső növekedési rátája.

1.8.9. Az analitikai meghatározások és mérések gyakorisága

Oxigén koncentráció, hőmérséklet, keménység, pH értékek legalább egyszer egy héten a régi és új tápoldatban, a kontroll(ok)ban és a legnagyobb teszt koncentrációban mérendők.

A tesztelés alatt a vizsgálandó anyag koncentrációját szabályos időközönként ellenőrizzük.

Félstatikus tesztelési körülmények között, ahol a vizsgálandó anyag koncentrációja várhatóan a nominális érték $\pm 20\%$ -a körüli érték (tehát a 80-120% tartományba esik – lásd 1.4. és 1.8.4. fejezeteket), ott, mint minimális mérési követelmény, a legnagyobb és legkisebb teszt koncentrációt analizáljuk a frissen készített oldatoknál, valamint a közeg frissítésekor a tesztelés első hetén (az analízist ugyanabból a hígításból végezzük a készítéskor és a frissítéskor). Ezt követően legalább hetenként megismételjük az analízist.

Azoknál a vizsgálatoknál, ahol várhatóan a tesztelendő anyag koncentrációja kívül esik a nominális érték $\pm 20\%$ tartományán, akkor az összes teszt koncentrációt analizálni szükséges a készítésnél és a frissítéseknél egyaránt. Mindamellet azoknál a teszteléseknél, ahol a vizsgálandó anyag kezdeti koncentrációja kívül esik a nominális érték $\pm 20\%$ tartományán, de elégséges bizonyíték van arra, hogy a kezdeti koncentráció ismételt és stabil (tehát a kezdeti koncentráció 80-120% tartományon belül van), a kémiai meghatározásokat heti két, három alkalomra lehet csökkenteni a legnagyobb és legkisebb teszt koncentrációnál mérve. Minden esetben a tesztanyag koncentrációjának meghatározását a frissítést megelőzően minden teszt koncentráció egyik párhuzamosában végezzük.

Ha átfolyásos rendszert használunk, a mintázási rend hasonló a félstatikus vizsgálatnál leírtakhoz (de ebben az esetben a régi oldatnak nincs megfelelője). Mindamellet tanácsos az első héten a mintázási gyakoriságot növelni (pl. három mérés sorozat), hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a koncentráció stabil marad. Az ilyen típusú teszteknel a hígítótvíz és a vizsgálati anyag átfolyási sebességét naponta ellenőrizzük.

Ha a vizsgálati anyag koncentrációja bizonyosan megmarad a nominális vagy kezdeti koncentráció $\pm 20\%$ tartományán belül a tesztelés egész ideje alatt, akkor az eredményeket a nominális vagy a kezdeti mért koncentráció alapján adjuk meg. Ha az eltérés nagyobb 20%-nál, az eredményeket idővel súlyozott átlagértékkel kell megadni (lásd 5. Függelék).

2. ADATOK ÉS JELENTÉS

2.1. Az eredmények kezelése

Ennek a tesztnek a célja, hogy meghatározzuk a vizsgálati anyag hatását, amelyet az élő szülő állatok összes élő utódainak számára fejt ki a teszt végén. A szülőnkénti összes utód számát teszt edényenként (ill. párhuzamosokban) kell meghatározni. Ha a tesztelés során valamely párhuzamosban a szülő állat elpusztul, vagy kiderül, hogy hím került bele, azt a párhuzamosot ki kell zárni az értékelésből. A vizsgálat a továbbiakban csökkentett számú párhuzamosban folytatódik.

A LOEC, illetve a NOEC becslésekor, vagyis a kémiai anyag szaporodásra kifejtett hatásának vizsgálatakor meg kell állapítanunk minden koncentráció összes párhuzamosában az átlagot és standard deviációt variancia analízissel (ANOVA). Minden koncentráció átlagát összehasonlítjuk a kontroll átlagával egy megfelelő többletűzéses módszerrel. Erre a célra a Dunnet- vagy Williams-teszt megfelelő (14) (15) (16) (17). Ellenőrizni kell, hogy az ANOVA variancia homogenitás hipotézise helyes-e. A Grafikus ellenőrzés inkább ajánlott mint a formális tesztelés (18); ajánlott alternatíva még a Bartlett-teszt lefuttatása. Ha a homogenitási feltétel nem teljesül, akkor az ANOVA-t megelőzően az eredmények transzformálását kell elvégezni a variancia homogenitás biztosítására, vagy súlyozott ANOVA-t kell használni. Az ANOVA-t használva (legkisebb szignifikáns különbség alapján) a detektálható hatás nagyságát kiszámítjuk és közöljük.

Az 50%-os szaporodás csökkenést okozó koncentráció becslésére (EC₅₀) egy megfelelő, pl. logisztikus görbét használunk, melyet illesztünk a statisztikai eljárással kapott adatokra pl. a legkisebb négyzetek elve alapján. A görbére használhatunk olyan paramétereket, mely alapján az EC₅₀, a standard hiba is közvetlenül megállapítható. Ez igen megkönnyíti az EC₅₀ körüli konfidencia tartomány meghatározását is. Hacsak nincs komoly okunk arra, hogy különböző konfidencia tartományokat használjunk, a két oldali 95%-os konfidencia tartomány használata ajánlatos. Az illeszkedési eljárás egyben biztosítja az illeszkedés hiányának szignifikáns becslésének eszközét is. Ezt elvégezhetjük grafikusán is, vagy a maradék négyzetes összegek osztásával az illeszkedés hiányára és 'a tisztán hiba komponensekre' következtethetünk és elvégezhetjük az illeszkedés hiányára a szignifikancia tesztet. Mivel azok a kezelések, amelyek a szaporodásra kevésbé hatnak, ezekben az esetekben az utódok számában a variancia nagyobb lesz, mint az alacsony szaporodást mutató kezeléseknél, súlyozva kell figyelembe venni a megfigyelt értékeket, hogy tükrözze a különböző varianciát a különböző kezelt csoportoknál [lásd háttér információként a (18) referenciát].

A végső körvizsgálatban (2) az adatok analízisére az alábbi modell alapján a következő logisztikus görbét használták, bár más megfelelő modell is használható:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

ahol:

Y: a teszt végén az élő szülő állatonkénti összes utódszám (minden teszt edényre külön kalkuláljuk)

x: az anyag koncentrációja

c: várható utódszám, ha az anyag koncentráció x=0

x₀: a populációban az EC₅₀

b: meredekségi paraméter

Ez a modell az esetek nagy számában megfelelő, de vannak olyan tesztek is, ahol nem megfelelő. A modell validitását ellenőrizni kell, ahogy feljebb javasoltuk. Néhány esetben, amikor az alacsony koncentrációk viszonylag fokozott hatást mutatnak, ott a hormesis modell lehet hasznos (19).

Más hatékony koncentrációk, mint EC₁₀ vagy EC₂₀ szintén becsülhetők, bár ilyenkor más paraméterek használata ajánlott, mint az EC₅₀ becsléséhez használtak.

2.2. Teszt jelentése

A jelentésnek a következőket kell tartalmaznia

2.2.1. A vizsgálati anyag

- fizikai és releváns fiziko-kémiai tulajdonságok,
- kémiai azonosítási adatok, beleértve a tisztaság mértékét is.

2.2.2. Tesztelésre használt faj

– a klón (ha genetikailag tipizált), forgalmazó vagy eredet (ha ismert) és a használt tenyésztési körülmények. Ha a *Daphnia magna*-tól eltérő fajt használunk, jegyzőkönyvezni kell és igazolni.

2.2.3. Tesztelési körülmények

- a használt tesztelési eljárás jellemzői (pl. fél-statikus vagy átfolyó rendszerű, térfogat, literenkénti szám)
- fény-sötét periodicitás, fényintenzitás
- a tesztelés elrendezése (pl. párhuzamosok száma, párhuzamosonkénti szülőszám)
- a használt tenyészfolyadék összetétele

– ha használtunk szerves adalékot, összetétele, eredete, a készítési eljárás, a törzsoldat TOC/KOI, a tesztoldatokban becsült TOC/KOI

– az etetés részletes adatai, beleértve a mennyiséget (mg C/*Daphnia*/nap) és a kísérő jegyzéket (pl. a táplálék típusa, az alga fajneve és ha ismert a törzs, tenyésztési körülmények)

– a törzsoldatok készítésének módja, a tenyészfolyadék frissítésének gyakorisága (oldószer vagy diszpergálószer koncentrációja, ha használtunk)

2.2.4. Eredmények megadása

- előzetes vizsgálatok eredményei a vizsgálati anyag stabilitásáról
- a névleges (nominális) teszt koncentrációk és a vizsgálati anyag összes koncentráció meghatározásának eredményei a tesztedényekben (lásd a 4. Függelék eredménylapját); az analízis visszanyerési hatékonysága és a meghatározás korlátai
- a vízminőség a teszt edényen belül (pl. pH, hőmérséklet, oldott oxigén koncentráció, a TOC és/vagy KOI és keménység, ha rendelkezésre áll) (lásd a 3. Függelék eredménylapját)
- minden egyes szülőállat élő utódainak összesítése (lásd 3. Függelék eredménylapját)
- a szülőállatok közt bekövetkezett pusztulás száma és dátuma (lásd a 3. Függelék eredménylapját)
- a kontroll szaporodási képességének variációs koefficiense (az élő szülőállatonkénti összes élő utód számán alapulva a teszt végén)

– grafikon a vizsgálati anyag koncentrációjának függvényében ábrázolva az élő szülő állatonkénti összes utódszámot minden párhuzamosban

– a legkisebb, még a szaporodásra hatékony koncentráció (LOEC), az alkalmazott statisztikai eljárás leírásával együtt, közölni kell milyen mértékű a hatás, és a szaporodásra már nem hatásos koncentráció (NOEC), ahol lehetséges, LOEC/NOEC a szülő állatok mortalitására

– ahol lehetséges, az EC_x és a konfidencia tartomány, valamint a kalkulációra használt illesztett modell grafikonja, a dózis-válasz görbe meredeksége és a standard hibája

– más megfigyelt biológiai hatás vagy mérés: közlés bármely más biológiai hatásról, melyet mértünk vagy megfigyeltünk a teszt alatt (pl. a szülő állatok növekedése) megfelelően igazolva

- a teszt metodikától való bármely eltérés magyarázata.

3. IRODALOM

(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* Straus. *Ecotoxicology and Environmental*

Safety, 21, pp. 257-265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, pp. 25-33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47, pp. 775-782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P.A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Lokke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), pp. 144-148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.*, 26, pp. 1-8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. *Arch. Hydrobiol.*, 120(2), pp. 185-196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokircheniella subcapitata* Hindak, F- 1990. *Biologice Prace*, 36, 209.

(12) Sims L. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, pp. 2053-2058.

(13) Sims L (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, pp. 459-466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp. 1096-1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, pp. 103-117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, pp. 510-531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, pp. 93-96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). *A Primer of Population Biology*. Sinauer Associates Inc. Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). *An introduction to quantitative Ecology*. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, pp. 532.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G., McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. *Ecology*, 67, pp. 1156-1166.

I. Függelék

A jól definiált elendt m7 és m4 médium elkészítése

Elendt M7 és M4 tenyészedatboz való hozzászoktatás (akklimatizáció)

Néhány laboratóriumnak nehézséget okozott a *Daphnia* M4, illetve M7 tenyészedatra való közvetlen átvitele. Mindemellett a fokozatos akklimatizációval sikert érhetünk el, pl. a saját tenyészedatunkhoz 30% Elendtt, majd 60% Elendtt adunk, majd 100% Elendtt használunk.

KÉSZÍTÉS

Nyomelemek

Külön elkészítjük a törzsoldatokat (1) az egyes nyomelemekből megfelelő tisztaságú vízzel pl. deionizált, desztillált vagy reverz ozmózzissal előállítva. Ezekből a törzsoldatokból (1) készítjük az egyedi (H) törzsoldatot, mely az összes nyomelemet tartalmazza. (Összetett oldat)

Törzsoldatok I. (Egyes anyagokból)	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció (M4 tenyészedatra vonatkoztatott x-szeres mennyiség)	A II. törzsoldat elkészítése, I. törzsoldat vízhez adott mennyisége (ml/l)	
			M4	M7
H ₃ B ₀ ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ *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 *6H 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 * 2H ₂ O	5000	20 00	-	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	1 991	20 00	-	-

Mind a Na₂EDTA-t mind a FeSO₄ oldatot külön készítjük el, egybeöntjük és azonnal autoklávozzuk. Ez a következő adja:

2liter FeEDTA		1 000	20,0	5,0
---------------	--	-------	------	-----

M4 és M7 oldat

M4 és M7 tenyészsoldatokat a II., a makroelemek és a vitaminok törzsoldatainak összelegyítésével készítjük.

	A vízhez adott mennyiség (mg/l)	Koncentráció az M4 tenyészsoldatra vonatkoztatva (x-szeres)	Hozzáadott törzsoldat mennyisége a tenyészsolda készítésénél (ml/l)	
			M4	M7
Nyomelemeket tartalmazó törzsoldat II.		20	50	50
Makroelemek törzsoldatai (egyes anyagokból)				
CaCl ₂ *2H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ *7H 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
Összetett vitamintörzsoldat	–	10 000	0,1	0,1
Az összetett vitamin törzsoldatot, mely 3 vitamint tartalmaz 1 literben a következők szerint készítjük				
<u>Tiaminhidroklorid</u>	750	10 000	-	-
Cyanokobalamin (B ₁₂)	10	10 000	-	-
Biotin	7,5	10 000	-	-

A vitamin törzsoldatot fagyasztva tároljuk kis aliquot mennyiségekben. A vitaminoldatot a tenyészsoldat használata előtt közvetlenül adjuk hozzá.

Megjegyzés: A végleges tenyészsoldat készítésekor, hogy elkerüljük a sók kiválását, a törzsoldatok aliquotjait 500–800 ml deionizált vízhez adjuk és aztán töltjük fel 1 literre.

Az első közlemény az M4 tenyészsoldatról a következő irodalomban jelent meg: Elendt, B.P. (1990) Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, pp.25-33.

2. Függelék

Összes szerves szén (toc) meghatározása és az etetésre használt alga toc tartalmához nomogram készítése

Az etetésre használt alga széntartalmának közvetlen mérése nehezen kivitelezhető, ennek helyettesítésére a korrelációból eredő más mérések, így az algaszám vagy fényabszorbancia használható.

TOC-ot inkább a magas hőmérsékletű metodikával kell mérni, mint az UV vagy perszulfátos metodikákkal (lásd MSZ EN 1484-1998).

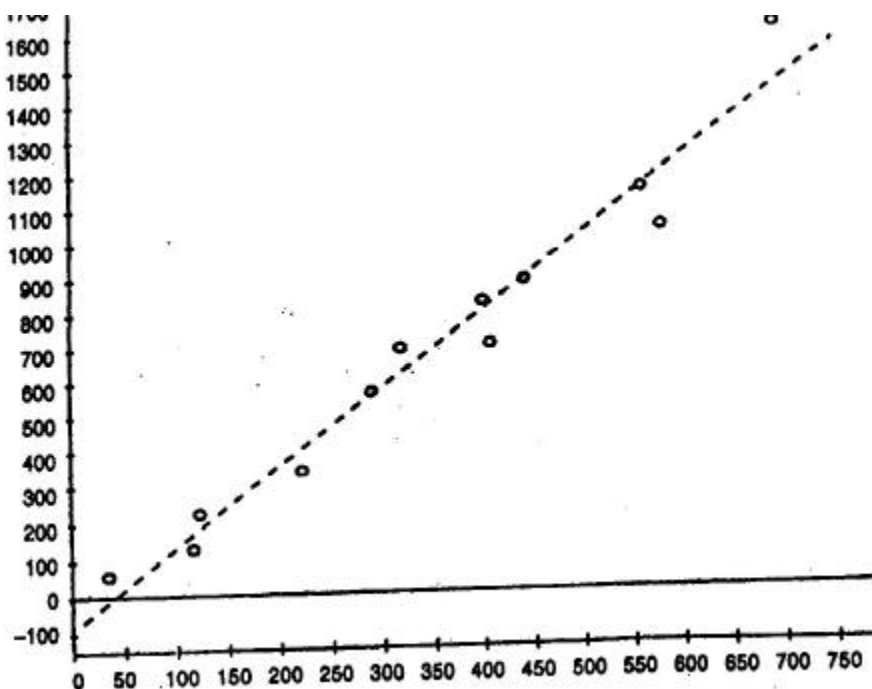
Nomogram készítéséhez az algát centrifugálással elkülönítjük a tenyészfolyadéktól, majd reszuszpendáljuk desztillált vízzel. Mérjük a helyettesítő paramétert és TOC koncentrációt minden mintánál három ismétlésben. Desztillált vizet használva háttérként, ennek értékét levonjuk az alga minta TOC koncentrációjából.

A nomogramnak lineárisnak kell lennie a kívánt szén koncentráció tartományban. Példákat az alábbiakban mutatunk be.

Megjegyzés: Ezeket az ábrákat nem használhatjuk a konverzióra, hanem minden laboratórium el kell végezze a saját korrelációs méréseit.

Chlorella vulgaris var. viridis (CCAP 211/12)
Regressziós egyenes a mg/l szárazanyag és mg C/l között
Félfolyamatos palackban tenyésztett sejtek koncentrált szuszpenziójából nyert adatok. A koncentrált sejteket desztillált vízben reszuszpendálták.
Korrelációs koefficiens – 0,980

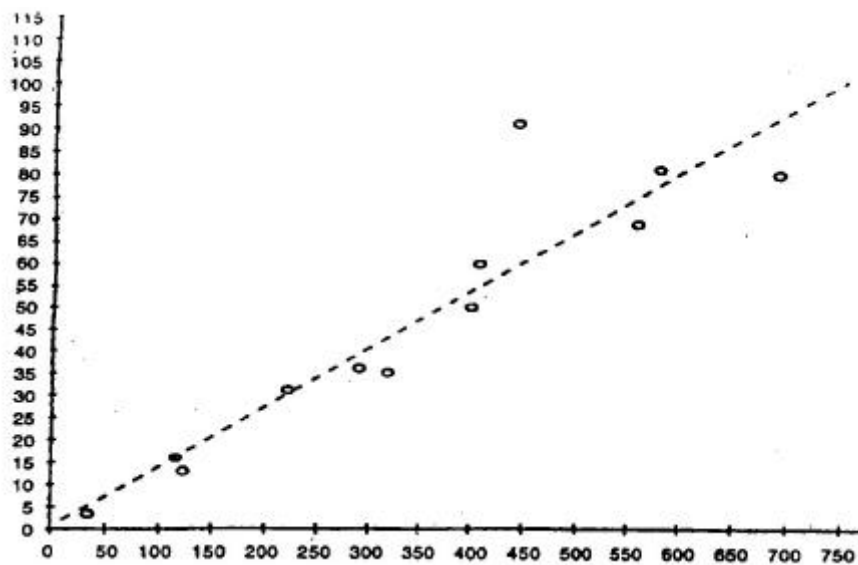
Koncentrált alga táplálék mg/l szárazanyagban



mg C/l koncentrált algatáplálékban

Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12)
 Regressziós egyenes a mg/l szárazanyag és mg C/l között
 Félfolyamatos palackban tenyésztett sejtek koncentrált szuszpenziójából nyert adatok. A koncentrált sejteket desztillált vízben reszuspendálták.
 Korrelációs koefficiens – 0,926

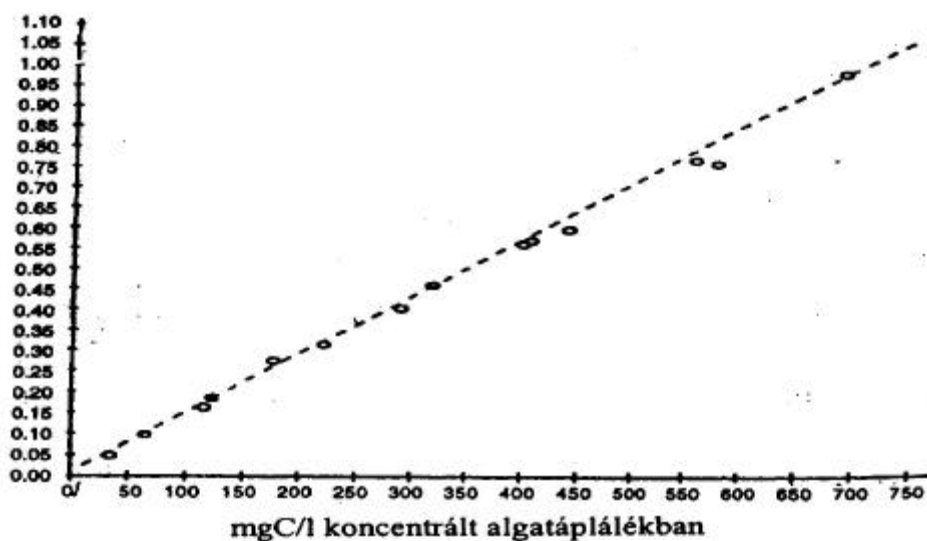
A koncentrált algaáplálék sejt száma (sejt/l*10⁸)



mg C/l koncentrált algaáplálékban

Chlorella vulgaris var. *viridis* (CCAP 211/12)
 Regressziós egyenes az abszorbancia (1 cm-es küvettában) és mg C/l között
 Félfolyamatos palackban tenyésztett sejtek koncentrált szuszpenziójából nyert adatok. A koncentrált sejteket desztillált vízben reszuspendálták.
 Korrelációs koefficiens – 0,998

Abszorbancia 440 nm-en 1/10 hígítású koncentrált algaáplálékban



mgC/l koncentrált algaáplálékban

3. Függelék

Példaadatlap a tenyészdát frissítésére, fizikai/kémiai monitor dataira, etetésre, és felnőtt állatok pusztulására

Vizsgálat száma: Kezdési dátum Klón: Tenyészdát: Táplálék: Vizsgálati anyag: Névleges koncentráció

Nap	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Frissítés (x-szel jelöljük)																								
pH (1)																							új	
																							régi	
O ₂ mg/l (1)																							új	
																							régi	
Hőmérséklet (°C)(1)																							új	
																							régi	
Etetés (x-szel jelöljük)																								
Élettelen utód (2)																								Összesen
Edény 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Összesen	
Összesített felnőtt pusztulás (3)																								

- (1) Jelölje, melyik edényben végezte a vizsgálatot
- (2) Jelölje a pusztult utódot a megfelelő négyzetben (u)
- (3) Jelölje bármely szülő állat pusztulását (sz)

4. Függelék

Példaadatlap a kémiai analízis eredményeinek közléséhez

a) Mért koncentrációk

Névleges koncentráció	1. heti minta		2. heti minta		3. heti minta	
	Friss	Régi	Friss	Régi	Friss	Régi

b) Mért koncentrációk, mint a névleges (nominális) érték százaléka

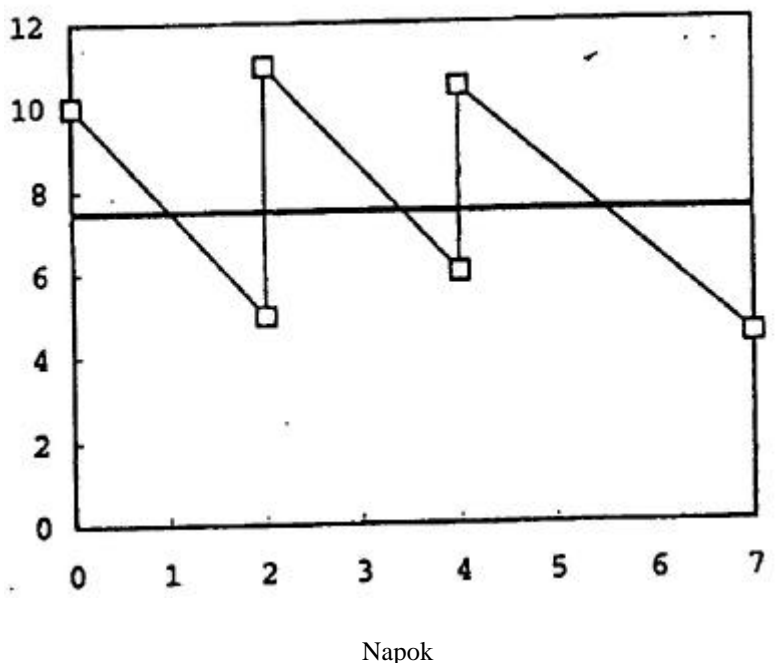
Névleges koncentráció	1. heti minta		2. heti minta		3. heti minta	
	Friss	Régi	Friss	Régi	Friss	Régi

5. Függelék

Idővel súlyozott átlag kiszámítása

Idővel súlyozott átlag

Ha a vizsgálati anyag koncentrációja csökken a frissítési periódus alatt, figyelembe kell venni, hogy milyen reprezentatív koncentrációt használjunk a *Daphnia* szülőállatokkal szerzett tapasztalat alapján. A választás biológiai és statisztikai megfontolások alapján történik. Például, ha azt gondoljuk, hogy tapasztalat alapján a szaporodást a főleg a csúcs koncentráció fogja befolyásolni, akkor a maximum koncentrációt használjuk. Mindamelllett, ha a toxikus anyag akkumulációját vagy hosszú idejű hatását kell inkább figyelni, akkor az átlagos koncentráció használata kívánatosabb. Ebben az esetben az idővel súlyozott átlag koncentrációt tanácsos használni, mivel ez figyelembe veszi az idő folyamán bekövetkező változásokat.



1. ábra. Példa az idővel súlyozott átlagra

Az 1. ábra példát mutat be egy egyszerűsített, 7 napig tartó teszt esetében. A tesztoldat frissítése 0., 2. és 4. napon történt.

- A vékony cikk-cakk vonal a koncentrációt mutatja az időben. Tételezzük fel, hogy a koncentrációesés exponenciális csökkenési folyamattal írható le.
- A hatpontú görbe a mért koncentrációkat mutatja be a frissítési periódus elején és végén.
- a vastag egyenes az idővel súlyozott átlagot mutatja.

Az idővel súlyozott átlagot kiszámíthatjuk úgy, hogy az idővel súlyozott átlag egyenlő a koncentrációs görbe alatti területtel. A számítást a fenti példa alapján az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat az idővel súlyozott átlag kiszámításához

Frissítés száma	Napok	Konc0	Konc1	Ln (Konc0)	Ln (Konc1)	Terület
1	2	10,000	4,493	2,330	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
Összes nap: 7					Összes terület	50,091
					Idővel súlyozott átlag	7,156

'Napok': a frissítési periódusban a napok száma

'Konc0': minden frissítési periódus kezdetén mért koncentráció

'Konc1': minden frissítési periódus végén mért koncentráció

'Ln(Konc0)': A Konc0 természetes alapú logaritmusa

'Ln(Konc1)': A Konc1 természetes alapú logaritmusa

'Terület': minden frissítési periódusra megszerkesztett exponenciális görbe alatti terület, melyet a következőképpen számolunk:

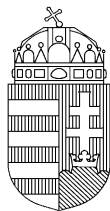
$$\text{Terület} = \frac{\text{konc0} - \text{konc1}}{\ln(\text{konc0}) - \ln(\text{konc1})} * \text{napok}$$

'Az idővel súlyozott átlag': az összes terület osztva az összes nappal

Természetesen a *Daphnia* reprodukciós tesztre a táblázatot ki kell bővíteni 21 napra.

Az világos, ha csak az egyes frissítési periódusok elején és végén mérünk koncentrációt, nem lehetséges a csökkenés exponenciális voltának igazolása.. Különböző görbék különböző számítást tennének szükségessé a terület kiszámítására. Ennek ellenére, az exponenciális csökkenés egyáltalán nem lehetetlen és valószínű a legjobb görbe, amit használhatunk más információ hiányában.

Mindemellett elővigyázatosság szükséges, ha egyáltalán nem tudunk kimutatni vizsgálati anyagot a frissítési periódusok végén. Hacsak nem tudjuk megbecsülni, milyen hamar tűnik el az anyag az oldatból, lehetetlen valós területet kapni a görbe alatt és ennél fogva lehetetlen valós idővel súlyozott átlagot is kapni.



A MAGYAR HIVATALOS KÖZLÖNYKIADÓ megjelentette a

TÖRVÉNYEK ÉS RENDELETEK HIVATALOS GYŰJTEMÉNYE 2002

című hétkötetes jogszabálygyűjteményt.

A kiadványt az Igazságügyi Minisztérium és a Miniszterelnöki Hivatal a korábbi évek gyakorlatához hasonlóan név- és tárgymutatóval, kiegészítő jegyzetekkel, valamint változásmutatóval látta el.

A jogszabálygyűjtemény I., II., III., IV., V., VI. és VII. kötetének ára: **189 840 Ft áfával.**

A kötetekre szóló megrendelést a Magyar Hivatalos Közlönykiadó címére (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6.) kérjük eljuttatni. Fax: 338-4746 vagy 267-2780.

M E G R E N D E L Ő L A P

Megrendeljük a

TÖRVÉNYEK ÉS RENDELETEK HIVATALOS GYŰJTEMÉNYE 2002

című hétkötetes kiadványt példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házszám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül átutaljuk a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára.

Keltezés:.....

.....
cégszerű aláírás

ELŐFIZETÉSI FELHÍVÁS

Kormányrendelet felhatalmazása alapján jelenteti meg a Miniszterelnöki Hivatal a Magyar Közlöny mellékleteként a **HIVATALOS ÉRTESÍTŐT**. A lap hetente, szerdánként, tematikus főrészekben hitelesen közli a legfőbb állami, önkormányzati, társadalmi, gazdasági szervek, illetve szervezetek személyi, szervezeti, igazgatási és képzési, valamint a hírközlési tevékenység (frekvenciagazdálkodás, távközlés, postaügy, informatika) közleményeit, továbbá az üzleti élet híreit. Térítési díj ellenében közzé tesszük a Kincstári Vagyoni Igazgatóság vagyoneértékesítési pályázatait, az állami, társadalmi, gazdasági szervezetek, parlamenti pártok, kamarák, helyi önkormányzatok, egyházak, különböző képviseletek közleményeit. Fizetett hirdetésként — akár színes oldalakon is — helyet kaphatnak az Értesítőben a gazdálkodó szervezetek, egyetemek, alapítványok, de magánszemélyek közérdeklődésre számot tartó közlései is.

Őszintén reméljük, hogy a hírek, információk, közlemények egy lapban történő pontos és rendszerezett formában való közreadásával sikerül hatékonyabbá és eredményesebbé tenni előfizetőink tájékozódását a hivatali és üzleti életben. Az érdeklődők számára egyéb hasznos információkat is nyújt a lap.

A lap előfizetésben megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadó 1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6. címen, levélcím: 1394 Budapest 62., Pf. 357; faxszám: 318-6668.

2003. évi éves előfizetési díja: 9408 Ft áfával.

A **HIVATALOS ÉRTESÍTŐ** egyes számai megvásárolhatók a kiadó közlönyboltjában: 1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6. Telefon/fax: 267-2780.

M E G R E N D E L Ő L A P

Megrendelem a **HIVATALOS ÉRTESÍTŐ** című lapot példányban, és kérem a következő címre kézbesíteni:

Megrendelő neve:

címe (város/község, irányítószám):

utca, házsám:

Ügyintéző (telefonszám):

2003. évi előfizetési díj fél évre 4704 Ft áfával

egy évre 9408 Ft áfával

Számlát kérek a befizetéshez.

Kérjük, a négyzetbe történő X bejelöléssel jelezze az előfizetés időtartamát.

Kelt.:

.....
cégszerű aláírás

ELŐFIZETÉSI FELHÍVÁS

A jogalkotásról szóló 1987. évi XI. törvény rendelkezik — többek között — a Magyar Köztársaság Kormánya hivatalos lapjának, a **Határozatok Tárá**nak megjelentetéséről.

A Határozatok Tárat szerkeszti a Miniszterelnöki Hivatal a Szerkesztőbizottság közreműködésével, évente mintegy 60 alkalommal jelenik meg.

A Határozatok Tára a Kormánynak azokat a határozatait (kétezes) közli, amelyeknek közzétételét a Kormány elrendelte, továbbá tartalmazza a miniszterelnök határozatait, a Miniszterelnöki Hivatalt vezető miniszter határozatait, valamint a minisztériumok, az országos hatáskörű szervek, az önkormányzatok közleményeit, hirdetményeit, különféle tájékoztatóit, továbbá azokat a közleményeket stb., amelyeket a Miniszterelnöki Hivatalt vezető miniszter engedélyez.

A Határozatok Tára megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadó címén (Budapest VIII., Somogyi Béla u. 6.; postacím: 1394 Budapest 62, Pf. 357.) vagy a 318-6668 faxszámán.

Éves előfizetési díja 2003. évre: 14 448 Ft áfával.

Példányonként megvásárolható a kiadó közlönyboltjában (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6. Tel/fax: 267-2780).

MEGRENDELŐLAP

Megrendelem a

HATÁROZATOK TÁRA

című lapot példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házsám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

Előfizetési díj egy évre: 14 448 Ft áfával

fél évre: 7 224 Ft áfával

Csekket kérek a befizetéshez

Kérjük, a négyzetbe történő X bejelöléssel jelezze az előfizetés időtartamát!

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára átutaljuk.

Keltezés:

.....
cégszerű aláírás

ELŐFIZETÉSI FELHÍVÁS

A Miniszterelnöki Hivatal és a Belügyminisztérium közös szerkesztésében havonta megjelenő

ÖNKORMÁNYZATOK KÖZLÖNYE

az önkormányzatok számára működésük során hasznos és nélkülözhetetlen tájékoztató forrás.

A kiadvány első három része az önkormányzatokat érintő, újonnan kihirdetett jogszabályokat (törvények, rendeletek — ideértve az önkormányzati rendeleteket is —, alkotmánybíróági és egyéb határozatok) közli. Negyedik főrésze közleményeket, pályázati felhívásokat és tájékoztatásokat (szakértők közleményei, az Állami Számvevőszék ajánlásai, az önkormányzatok által elnyerhető támogatások pályázati feltételei, az önkormányzatok éves pénzügyi beszámolóit, alapító okiratok stb.) tartalmaz.

Az **Önkormányzatok Közlönye** előfizetésben megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadó (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6.) címen (postacím: 1394 Budapest 62. Pf. 357) vagy a 318-6668 faxszámán.

2003. évi éves előfizetés díja: 3696 Ft áfával.

Példányonként megvásárolható a kiadó közlönypoltjában (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6. Tel./fax: 267-2780).

MEGREDELŐLAP

Megrendeljük az **Önkormányzatok Közlönye** című lapot példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házszám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára átutaljuk.

Keltezés:

.....
cégszerű aláírás

KÖZLEMÉNY

A Magyar Hivatalos Közlönykiadó a Magyar Közlöny különszámaként megjelentette

**Az általános forgalmi adóról szóló
1992. évi LXXIV. törvény,
a társasági adóról és az osztalékadóról szóló
1996. évi LXXXI. törvény,
az egyszerűsített vállalkozói adóról szóló
2002. évi XLIII. törvény
és a helyi adókról szóló 1990. évi C. törvény
HATÁLYOS SZÖVEGE**

című, A/4 formátumú, 136 oldal terjedelmű kiadványt.

A különszám az általános forgalmi adóról szóló 1992. évi LXXIV. törvény, a társasági adóról és az osztalékadóról szóló 1996. évi LXXXI. törvény, az egyszerűsített vállalkozói adóról szóló 2002. évi XLIII. törvény és a helyi adókról szóló 1990. évi C. törvény tárgymutatóval ellátott hatályos szövegét tartalmazza.

A kézirat lezárva: 2003. április 15-én.

Ára: 1792 Ft áfával.

A megrendeléseket a Magyar Hivatalos Közlönykiadó címére (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6.) lehet feladni.
Fax: 338-4746 vagy 267-2780.

MEGRENDELŐLAP

Megrendeljük

**Az általános forgalmi adóról szóló
1992. évi LXXIV. törvény,
a társasági adóról és az osztalékadóról szóló
1996. évi LXXXI. törvény,
az egyszerűsített vállalkozói adóról szóló
2002. évi XLIII. törvény
és a helyi adókról szóló 1990. évi C. törvény
HATÁLYOS SZÖVEGE**

című kiadványt példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házszám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára átutaljuk.

Keltezés:

.....
cégszerű aláírás

KÖZLEMÉNY

A Magyar Hivatalos Közlönykiadó a Magyar Közlöny különszámaként megjelentette

AZ ALAPÍTVÁNYOKKAL KAPCSOLATOS JOGSZABÁLYOK

című, A/4 formátumú, 64 oldal terjedelmű kiadványt.

A különszám a Polgári Törvénykönyv alapítványokra vonatkozó rendelkezéseit, a Legfelsőbb Bíróság alapítványi tárgyú kollégiumi állásfoglalásait és eseti döntéseit, valamint az alapítványokra vonatkozó nyilvántartási, gazdálkodási, számviteli, vám-, adó- (ideértve az szja 1%-a felhasználásának szabályait) és illetékszabályok hatályos szövegét tartalmazza. Közlésre kerül továbbá a Kormány által alapított közalapítványok és alapítványok jegyzéke.

A kézirat lezárva: 2003. április 10-én.

Ára: 1176 Ft áfával.

A megrendeléseket a Magyar Hivatalos Közlönykiadó címére (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6.) lehet feladni. Fax: 338-4746 vagy 267-2780.

MEGRENDELŐLAP

Megrendeljük

AZ ALAPÍTVÁNYOKKAL KAPCSOLATOS JOGSZABÁLYOK

című kiadványt példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házszám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára átutaljuk.

Keltezés:

.....
cégszerű aláírás

KÖZLEMÉNY

A Magyar Hivatalos Közlönykiadó a Magyar Közlöny különszámaként megjelentette

AZ ÚJ POLGÁRI TÖRVÉNYKÖNYV KONCEPCIÓJA ÉS TEMATIKÁJA

című, A/4 formátumú, 144 oldal terjedelmű kiadványt.

A kiadvány a Kormány 1003/2003. (I. 25.) Korm. határozatával elfogadott új Polgári Törvénykönyv Konceptióját és a Kodifikációs Főbizottság által jóváhagyott szabályozási Tematikát egybefoglalva tartalmazza.

Ára: 980 Ft áfával.

A megrendeléseket a Magyar Hivatalos Közlönykiadó címére (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6.) lehet feladni.
Fax: 338-4746 vagy 267-2780.

MEGRENDELŐLAP

Megrendeljük

AZ ÚJ POLGÁRI TÖRVÉNYKÖNYV KONCEPCIÓJA ÉS TEMATIKÁJA

című kiadványt példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házsám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára átutaljuk.

Keltezés:

.....
cégszerű aláírás

Szerkeszti a Miniszterelnöki Hivatal, a Szerkesztőbizottság közreműködésével.

A Szerkesztőbizottság elnöke: dr. Pulay Gyula. A szerkesztésért felelős: dr. Müller György. Budapest V., Kossuth tér 1—3.
Kiadja a Magyar Hivatalos Közlönykiadó. Felelős kiadó: dr. Kodela László elnök-vezérigazgató.
Budapest VIII., Somogyi Béla u. 6. Telefon: 266-9290.

Előfizetésben megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadónál

Budapest VIII., Somogyi Béla u. 6., 1394 Budapest 62. Pf. 357, vagy faxon 318-6668.

Előfizetésben terjeszti a Magyar Hivatalos Közlönykiadó a FÁMA Rt. közreműködésével. Telefon/fax: 266-6567.

Információ: tel./fax: 317-9999, 266-9290/245, 357 mellék.

Példányonként megvásárolható a kiadó Budapest VIII., Somogyi B. u. 6. (tel./fax: 267-2780) szám alatti közlönypoltjában, illetve megrendelhető a www.mhk.hu/kozlonybolt internetcímen.

2003. évi éves előfizetési díj: 62 496 Ft. Egy példány ára: 140 Ft 16 oldal terjedelemig, utána + 8 oldalanként + 140 Ft.

A kiadó az előfizetési díj évközbéli emelésének jogát fenntartja.

HU ISSN 0076—2407

03.1735 — Nyomja a Magyar Hivatalos Közlönykiadó Lajosmizsei Nyomdája. Felelős vezető: Burján Norbert.