

Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

► **B**

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

ze dne 30. května 2008,

kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek

(Text s významem pro EHP)

(Úř. věst. L 142, 31.5.2008, s. 1)

Ve znění:

		Úřední věstník		
		Č.	Strana	Datum
► <u>M1</u>	Nařízení Komise (ES) č. 761/2009 ze dne 23. července 2009	L 220	1	24.8.2009
► <u>M2</u>	Nařízení Komise (EU) č. 1152/2010 ze dne 8. prosince 2010	L 324	13	9.12.2010

**NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008****ze dne 30. května 2008,****kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek****(Text s významem pro EHP)**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES ⁽¹⁾, a zejména na čl. 13 odst. 3 uvedeného nařízení,

vzhledem k těmto důvodům:

- (1) Podle nařízení (ES) č. 1907/2006 se na úrovni Společenství stanoví zkušební metody pro účely provádění zkoušek látek, jsou-li tyto zkoušky vyžadovány pro získání informací o podstatných vlastnostech látek.
- (2) Směrnice Rady 67/548/EHS ze dne 27. června 1967 o sblížení právních a správních předpisů týkajících se klasifikace, balení a označování nebezpečných látek ⁽²⁾ stanovila v příloze V metody určení fyzikálně-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látek a přípravků. Příloha V směrnice 67/548/EHS byla zrušena směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2006/121/ES s účinností ode dne 1. června 2008.
- (3) Zkušební metody obsažené v příloze V směrnice 67/548/EHS by měly být zahrnuty do tohoto nařízení.
- (4) Tímto nařízením není vyloučeno použití jiných zkušebních metod, pokud je ovšem jejich použití v souladu s čl. 13 odst. 3 nařízení č. 1907/2006.

⁽¹⁾ Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1; opravené znění v Úř. věst. L 136, 29.5.2007, s. 3.

⁽²⁾ Úř. věst. L 196, 16.8.1967, s. 1. Směrnice naposledy pozměněná směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2006/121/ES (Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 850; opravené znění v Úř. věst. L 136, 29.5.2007, s. 281) – *nutno aktualizovat s příslušnými odkazy, jakmile bude zveřejněn dokument týkající se třicátého přizpůsobení technickému pokroku.*

▼B

- (5) Při stanovení zkušebních metod je třeba vzít plně v úvahu zásadu nahrazovat, omezovat a zdokonalovat používání zvířat při provádění zkoušek, zejména pokud existují vhodné validované metody, které nahrazení, omezení nebo zdokonalení zkoušek prováděných na zvířatech umožňují.
- (6) Ustanovení tohoto nařízení jsou v souladu se stanoviskem výboru zřízeného podle článku 133 nařízení (ES) č. 1907/2006,

PŘIJALA TOTO NAŘÍZENÍ:

Článek 1

Zkušební metody k použití pro účely nařízení (ES) č. 1907/2006 jsou stanoveny v příloze tohoto nařízení.

Článek 2

Komise podle potřeby přezkoumá zkušební metody uvedené v tomto nařízení s cílem nahradit, omezit nebo zdokonalit zkoušky na obratlovcích.

Článek 3

Všechny odkazy na přílohu V směrnice 67/548/EHS se považují za odkazy na toto nařízení.

Článek 4

Toto nařízení vstupuje v platnost prvním dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropské unie*.

Použije se ode dne 1. června 2008.

▼B*PŘÍLOHA***ČÁST A: METODY PRO STANOVENÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ**

OBSAH

- A.1 BOD TÁNÍ/BOD TUHNUTÍ
- A.2 BOD VARU
- A.3 RELATIVNÍ HUSTOTA
- A.4 TLAK PAR
- A.5 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ
- A.6 ROZPUSTNOST VE VODĚ
- A.8 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT
- A.9 BOD VZPLANUTÍ
- A.10 HOŘLAVOST (PEVNÉ LÁTKY)
- A.11 HOŘLAVOST PLYNŮ
- A.12 HOŘLAVOST (PŘI STYKU S VODOU)
- A.13 PYROFORICKÉ VLASTNOSTI PEVNÝCH LÁTEK A KAPALIN
- A.14 VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI
- A.15 BOD SAMOZÁPALU (KAPALINY A PLYNY)
- A.16 RELATIVNÍ TEPLOTA SAMOZÁPALU PEVNÝCH LÁTEK
- A.17 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (PEVNÉ LÁTKY)
- A.18 POČETNĚ PRŮMĚRNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOST A DISTRIBUCE MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI POLYMERŮ
- A.19 OBSAH NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK V POLYMERECH
- A.20 CHOVÁNÍ POLYMERŮ PŘI ROZPOUŠTĚNÍ NEBO EXTRAKCI VE VODĚ
- A.21 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (KAPALINY)
- A.22 DÉLKOVĚ VÁŽENÝ STŘEDNÍ GEOMETRICKÝ PRŮMĚR VLÁKEN

▼B**A.1 BOD TÁNÍ/BOD TUHNUTÍ****1. METODA**

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a přístroje jsou určeny ke stanovení bodu tání látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Výběr metody závisí na povaze látky, která má být zkoumána. Omezením bude tedy skutečnost, zda lze danou látku rozmělnit na prášek snadno, obtížně nebo zda ji nelze rozmělnit.

U některých látek je vhodnější stanovení bodu tuhnutí nebo krystalizace a normalizované metody pro tato stanovení jsou v této metodě rovněž uvedeny.

Nelze-li vzhledem ke zvláštním vlastnostem látky dobře stanovit žádný z uvedených parametrů, může být vhodné stanovit bod teploty.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod tání je definován jako teplota, při níž dochází za atmosférického tlaku k přechodu z pevného do kapalného skupenství a která za ideálních podmínek odpovídá bodu tuhnutí.

Vzhledem k tomu, že u mnoha látek dochází k fázovému přechodu v rozmezí teplot, je toto rozmezí často nazýváno rozmezím bodu tání.

Přepočítání jednotek (K na °C)

$$t = T - 273,15$$

t: Celsiova teplota, stupně Celsia (°C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při zkoumání nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v literatuře (4).

▼ B1.4 **PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY**

Stanovuje se teplota (teplotní rozmezí) fázového přechodu z pevného do kapalného skupenství nebo z kapalného do pevného skupenství. V praxi se při zahřívání/ochlazování vzorku zkoušené látky za atmosférického tlaku stanoví teploty počátku tání/tuhnutí a konce tání/tuhnutí. Je popsáno pět typů metod, jmenovitě kapilární metoda, metody používající zahřívací bloky, metody stanovení bodu tuhnutí, metody termické analýzy a stanovení bodu tekutosti (vyvinuto pro minerální oleje).

V některých případech může být vhodné měřit bod tuhnutí místo bodu tání.

1.4.1 **Kapilární metoda**1.4.1.1 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní*

Malé množství jemně rozmělněné látky se vpraví do kapiláry a zhutní se. Kapilára se zahřívá spolu s teploměrem, přičemž se rychlost nárůstu teploty během tání nastaví na méně než 1 K/min. Stanoví se teploty počátku a konce tání.

1.4.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem*

Provádí se podobně jako v bodě 1.4.1.1 s tím rozdílem, že kapilára a teploměr jsou umístěny v kovovém vyhříváném bloku a pozorují se otvory v bloku.

1.4.1.3 *Detekce fotočlánekem*

Vzorek v kapiláře se automaticky zahřívá v kovovém válci. Otvorem ve válci prochází látkou světelný paprsek na přesně kalibrovaný fotočlánek. Při tání mění většina látek optické vlastnosti a z neprůhledných se mění na průhledné. V tomto okamžiku vzroste intenzita světla dopadajícího na fotočlánek a do zařízení odečítajícího teplotu platinového odporového teploměru umístěného v topné komůrce je vyslán signál k zastavení zaznamenávání. Tato metoda není vhodná pro některé silně zbarvené látky.

1.4.2 **Zahřívací bloky**1.4.2.1 *Koflerův zahřívací stolek*

Koflerův zahřívací stolek je tvořen dvěma kovovými částmi s různou teplotní vodivostí, je vyhříván elektricky a je konstruován tak, že teplotní gradient je po jeho délce téměř lineární. Teplota stolku se může měnit od 283 do 573 K; stolek je vybaven speciálním zařízením pro odečítání teploty, tvořeným jezdceem s ukazatelem a stupnicí navrženou pro daný stolek. Pro stanovení bodu tání se látka nanese v tenké vrstvě přímo na povrch stolku. Během několika sekund se vytvoří ostrá dělicí linie mezi kapalnou a pevnou fází. Teplota v místě dělicí linie se odečte po nastavení ukazatele na tuto dělicí linii.

▼ B1.4.2.2 *Tavící mikroskop*

Pro stanovení bodu tání velmi malých množství látek se používají různé typy mikroskopů s ohřívacím stolcem. Většina ohřívacích stolků využívá k měření teploty citlivé termočlánky, používají se však i rtuťové teploměry. Typický přístroj pro stanovení bodu tání pomocí mikroskopu s ohřívacím stolcem má ohřívací komoru s kovovou deskou, na kterou se umístí vzorek na podložním sklíčku. Ve středu kovové desky je otvor, kterým může procházet světelný paprsek odražený osvětlovacím zrcátkem mikroskopu. Při měřeních se ohřívací komora přikryje skleněnou destičkou, aby se omezila cirkulace vzduchu v místě, kde se nachází vzorek.

Ohřev vzorku se kontroluje regulačním odporem. Pro velmi přesná měření opticky anisotropních látek lze používat polarizované světlo.

1.4.2.3 *Menisková metoda*

Tato metoda se používá především pro polyamidy.

Vizuálně se stanoví teplota, při které se zřetelně posune meniskus silikonového oleje uzavřeného mezi ohřívacím blokem a skleněnou krycí destičkou umístěnou na vzorku zkoušeného polyamidu.

1.4.3 **Metoda stanovení bodu tuhnutí**

Vzorek se vloží do speciální zkumavky, která se umístí do přístroje pro stanovení bodu tuhnutí. Během ochlazování se vzorek nepřetržitě pomalu míchá a ve vhodných intervalech se odečítá teplota. Jakmile je teplota po několika odečtích konstantní (po odpovídající korekci teploměru), je zaznamenána jako bod tuhnutí.

Podchlazení je nutno zabránit udržováním rovnováhy mezi pevnou a kapalnou fází.

1.4.4 **Termická analýza**1.4.4.1 *Diferenční termická analýza (DTA)*

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem, jež jsou podrobeny stejnému řízenému teplotnímu programu. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu teploty.

▼B1.4.4.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)*

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna zaznamenána jako endotermická (tání) nebo exotermická (tuhnutí) odchylka od základní linie záznamu tepelného toku.

1.4.5 **Bod tekutosti**

Metoda byla vyvinuta pro minerální oleje a je vhodná pro měření olejovitých látek s nízkým bodem tání.

Po počátečním zahřátí se vzorek určitou rychlostí ochlazuje a v intervalech po 3 K se stanovuje jeho tekutost. Nejnižší teplota, při níž je ještě pozorován pohyb látky, se zaznamená jako bod tekutosti.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod stanovení bodu tání/rozmezí bodu tání jsou uvedeny v této tabulce.

TABULKA: POUŽITELNOST METOD

A. **Kapilární metody**

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost ⁽¹⁾	Existující norma
Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní	ano	pouze pro několik látek	273 až 573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem	ano	pouze pro několik látek	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Detekce fotočlánkem	ano	pro některé látky s použitím přídavných zařízení	253 až 573 K	± 0,5 K	

⁽¹⁾ Závísí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

▼B

B. Zahřívací bloky a stanovení bodu tuhnutí

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Koflerův zahřívací stolek	ano	ne	283 až > 573 K	± 1 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Tavicí mikroskop	ano	pouze pro několik látek	273 až > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Menisková metoda	ne	především pro polyamidy	293 až > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218(E)
Metoda stanovení bodu tuhnutí	ano	ano	223 až 573 K	± 0,5 K	např. BS 4695

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

C. Termická analýza

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Diferenční termická analýza	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Diferenční skenovací kalorimetrie	ano	ano	173 až 1 273 K	do 600 K ± 0,5 K K do 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

D. Bod tekutosti

Metoda měření	Látky, které lze rozmělnit na prášek	Látky, které nelze snadno rozmělnit na prášek	Rozsah teplot	Odhadnutá přesnost (1)	Existující norma
Teplota tekutosti	pro minerální oleje a olejové látky	pro minerální oleje a olejové látky	223 až 323 K	± 0,3 K	ASTM D 97-66

(1) Závisí na typu zařízení a stupni čistoty látky.

1.6 POPIS METOD

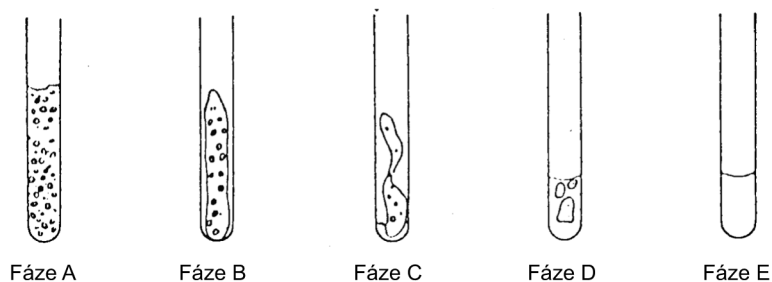
Postupy téměř všech těchto zkušebních metod jsou popsány v národních a mezinárodních normách (viz doplněk 1).

1.6.1 Kapilární metody

Při pomalém vzestupu teploty lze u jemně práškovitých látek obvykle rozlišit stupně tání znázorněné na obrázku 1.

▼ **B**

Obrázek 1



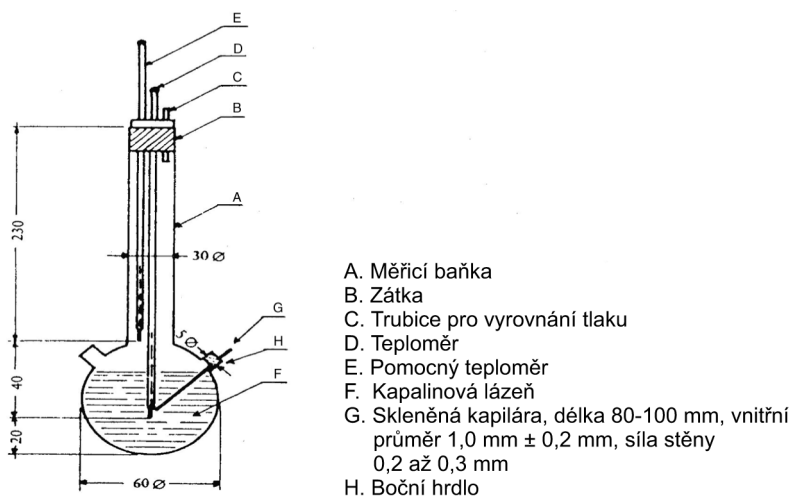
- Fáze A (Počátek tání): na vnitřní straně trubičky se stejnoměrně drží jemné kapičky.
- Fáze B V důsledku smršťení vzorku se mezi vnitřní stěnou a vzorkem tvoří mezera.
- Fáze C Smršťený vzorek se začíná hroutit dolů a stává se tekutým.
- Fáze D Na povrchu se tvoří úplný meniskus, ale značná část vzorku je dosud pevná.
- Fáze E (Konečná fáze tání): Vzorek již neobsahuje žádné pevné částice.

Během stanovení bodu tání se zaznamenávají teploty počátku tání a konečné fáze.

1.6.1.1. *Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní*

Na obrázku 2 je znázorněna normalizovaná skleněná aparatura pro stanovení bodu tání (JIS K 0064); všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech.

Obrázek 2



▼ B*Kapalinová lázeň:*

Je třeba zvolit vhodnou kapalinu. Volba kapaliny závisí na bodu tání, který má být stanoven, např. kapalný parafin pro stanovení bodu tání nižšího než 473 K, silikonový olej pro stanovení bodu tání nižšího než 573 K.

Pro stanovení bodu tání vyššího než 523 K lze použít směs tří hmotnostních dílů kyseliny sírové a dvou hmotnostních dílů síranu draselného. S tímto typem směsi je třeba pracovat s náležitou opatrností.

Teploměr:

Měly by se používat pouze teploměry, které splňují požadavky norem ASTM E 171, DIN 12770, JIS K 8001 nebo rovnocenných norem.

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

Postup:

Suchá látka se jemně rozetře v třecí misce a vpraví se do kapiláry zatavené na jednom konci, a to tak, aby po zhutnění byla kapilára naplněna do výšky přibližně 3 mm. Má-li se dosáhnout stejnoměrného zhutnění, nechá se kapilára dopadnout z výšky přibližně 700 mm skleněnou trubicí na hodinové sklíčko.

Naplněná kapilára se vloží do lázně tak, aby se střední část rtuťové baňky teploměru dotýkala kapiláry v místě, kde se nachází vzorek. Kapilára se obvykle vkládá do lázně při teplotě asi o 10 K nižší, než je bod tání.

Lázeň se zahřívá tak, aby vzestup teploty činil přibližně 3 K/min. Lázeň se míchá. Asi 10 K pod očekávaným bodem tání se růst teploty upraví na nejvýše 1 K/min.

Výpočet:

Bod tání se vypočte takto:

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

kde:

T = korigovaný bod tání v K

T_D = odečet teploty na teploměru D v K

T_E = odečet teploty na teploměru E v K

n = počet stupňů, o něž rtuťový sloupec teploměru D vyčnívá z kapaliny.

1.6.1.2 *Zařízení pro stanovení bodu tání s kovovým blokem**Přístroj:**Je tvořen:*

- válcovým kovovým blokem, jehož horní část je dutá a tvoří komoru (viz obrázek 3),
- kovovou krycí deskou se dvěma nebo více otvory, kterými je možno do kovového bloku zavést trubičky,

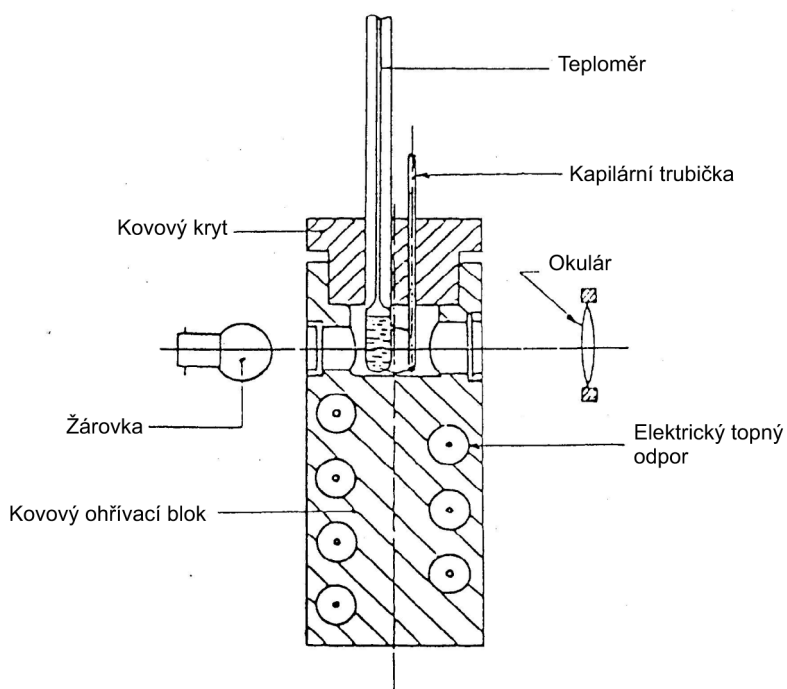
▼ B

- ohřívacím systémem kovového bloku, například elektrickým topným odporem uzavřeným v kovovém bloku,
- regulačním odporem pro regulaci příkonu, je-li použit elektrický ohřev,
- čtyřmi okénky ze žáruvzdorného skla v bočních stěnách ohřívací komory, orientovanými vůči sobě pod pravým úhlem. Před jedním z těchto okének je umístěn okulár pro pozorování kapilární trubičky. Ostatní tři okénka slouží k osvětlení vnitřního prostoru žárovkami,
- kapilární trubičkou z žáruvzdorného skla zatavenou na jednom konci (viz 1.6.1.1).

Teploměr:

Viz normy uvedené v 1.6.1.1. Je rovněž možné použít termoelektrické měřicí přístroje srovnatelné přesnosti.

Obrázek 3

1.6.1.3 *Detekce fotočlánkem**Přístroj a postup:*

Přístroj se skládá z kovové komory s automatickým ohřívacím zařízením. Tři kapilární trubičky se naplní podle bodu 1.6.1.1 a umístí se do ohřívací komory.

▼ B

Pro kalibraci přístroje je k dispozici několik lineárních režimů růstu teploty, přičemž vhodný lineární růst teploty se elektricky nastaví předem zvolenou konstantou. Zaznamenávací zařízení ukazují teplotu v ohřívací komoře a teplotu látky v kapilárách.

1.6.2 Zahřívací bloky**1.6.2.1 Koflerův zahřívací stolek**

Viz doplněk.

1.6.2.2 Tavní mikroskop

Viz doplněk.

1.6.2.3 Menisková metoda (pro polyamidy)

Viz doplněk.

V oblasti bodu tání by měla být rychlost ohřevu menší než 1 K/min.

1.6.3 Metody stanovení bodu tuhnutí

Viz doplněk.

1.6.4 Termická analýza**1.6.4.1 Diferenční termická analýza**

Viz doplněk.

1.6.4.2 Diferenční skenovací kalorimetrie

Viz doplněk.

1.6.5 Stanovení bodu tekutosti

Viz doplněk.

2. DATA

V některých případech je nutno provést korekci teploměru.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- použitá metoda,
- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,
- odhad přesnosti.

Jako bod tání se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulky).

▼B

Leží-li rozdíl teplot počáteční a konečné fáze tání v mezích přesnosti metody, uvede se jako bod tání konečná teplota, v opačném případě se uvedou obě teploty.

Jestliže se látka před dosažením bodu tání rozkládá nebo sublimuje, uvede se teplota, při které dochází k pozorovanému jevu.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. LITERATURA

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.
- 2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803–834.
- 3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
- 4) IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505–515.

▼ B*Doplněk*

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Kapilární metody**

1.1 Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní

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

1.2 Přístroje pro stanovení bodu tání s kovovým blokem

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

2. **Zahřívací bloky**

2.1 Koflerův zahřívací stolek

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

2.2 Tavicí mikroskop

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

2.3 Menisková metoda (pro polyamidy)

ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point“
--------------	--

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66 Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials

NF T 51-050 Resines de polyamides. Determination du „point de fusion“ methode du menisque

3. **Metody stanovení bodu tuhnutí**

BS 4633 Method for the determination of crystallizing point

BS 4695 Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)

DIN 51421 Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

ISO 2207 Cires de petrole: determination de la temperature de figeage

DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsiiuren

NF T 60-114 Point de fusion des paraffines

NF T 20-051 Methode de determination du point de cristallisation (point de congélation)

ISO 1392 Method for the determination of the freezing point

4. **Termická analýza**

4.1 Diferenční termická analýza

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

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

▼B

	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermo-analytical data
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
4.2	Diferenční skenovací kalorimetrie	
	ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
	ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
	ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermo-analytical data
	DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe
5.	Stanovení bodu tekutosti	
	NBN 52014	Echantillonnage et analyse des produits du petrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monster-neming en ontleding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt
	ASTM D 97-66	Standard test method for pour point of petroleum oils
	ISO 3016	Petroleum oils – Determination of pour point

▼B**A.2 BOD VARU****1. METODA**

Většina dále popsaných metod je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1). Jejich základní principy jsou uvedeny v literatuře (2) a (3).

1.1 ÚVOD

Popsané metody a zařízení lze použít pro kapaliny a látky s nízkým bodem tání, pokud nepodléhají chemickým reakcím pod bodem varu (např. autooxidaci, přesmyku, rozkladu atd.). Metody lze použít jak pro čisté kapalně látky, tak pro kapalně látky obsahující nečistoty.

Přednost mají metody využívající detekci fotočlánekem a metody termické analýzy, protože umožňují stanovení jak bodu tání, tak bodu varu. Tato měření mohou být navíc prováděna automaticky.

„Dynamická metoda“ má tu výhodu, že ji lze použít i ke stanovení tlaku par a přitom není třeba korigovat bod varu na normální tlak (101,325 kPa), neboť tento tlak lze během měření nastavit manostatem.

Poznámky:

Vliv nečistot na stanovení bodu varu závisí ve velké míře na jejich povaze. Jestliže vzorek obsahuje těkavé nečistoty, které mohou ovlivnit výsledky, může být látka přečištěna.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Standardní bod varu je definován jako teplota, při které je tlak par dané kapaliny roven 101,325 kPa.

Jestliže se měření bodu varu neprovádí za normálního tlaku, lze závislost tlaku par na teplotě popsat Clausiovou-Clapeyronovou rovnicí:

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

kde:

P = tlak par látky v Pa,

ΔH_v = výparné teplo v Jmol⁻¹

R = univerzální molární plynová konstanta = 8,314 Jmol⁻¹ K⁻¹

T = termodynamická teplota v K

Bod varu se uvádí s ohledem na okolní tlak při měření.

▼ B*Přepočty*

Tlak (jednotka: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 Mpa

(jednotka „bar“ je nadále přípustná, její používání se však nedoporučuje)

133 Pa = 1 mm Hg = 1 torr

(jednotky „mm Hg“ a „torr“ nejsou povoleny)

1 atm = standardní atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ není povolena).

Teplota (jednotka:K)

$t = T - 273,15$

t: Celsiova teplota, stupeň Celsia (°C)

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Některé kalibrační látky jsou uvedeny v doplňku.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Pět metod stanovení bodu varu (teplotního rozmezí bodu varu) je založeno přímo na měření teploty varu, další dvě využívají termální analýzy.

1.4.1 Stanovení ebulliometrem

Ebullimetry byly původně vyvinuty pro stanovení molekulové hmotnosti na základě zvýšení teploty varu, jsou však vhodné také pro přesná měření bodu varu. Velmi jednoduchý přístroj je popsán v normě ASTM D 112072 (viz doplněk). V tomto přístroji se kapalina zahřívá za rovnovážných podmínek při atmosférickém tlaku, dokud nezačne vřít.

1.4.2 Dynamická metoda

Metoda zahrnuje měření teploty kondenzace páry vhodným teploměrem umístěným za varu ve zpětném toku (refluxu). U této metody lze měnit tlak.

1.4.3 Destilační metoda pro stanovení bodu varu

Metoda zahrnuje destilaci kapaliny a měření teploty kondenzace páry, přičemž se stanovuje také množství destilátu.

▼B**1.4.4 Postup podle Siwoloffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce, která je ponořena do tepelné lázně. Do zkumavky se vzorkem je zasunuta zatavená kapilára, v jejíž spodní části se nachází vzduchová bublinka.

1.4.5 Detekce fotočlánkem

Při použití principu unikajících bublinek podle Siwoloffa se provádí automatické fotoelektrické měření.

1.4.6 Diferenční termická analýza

Při této technice se zaznamenává teplotní rozdíl mezi látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty, přičemž látka a referenční materiál se podrobí témuž řízenému teplotnímu programu. Jestliže u studované látky dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu teploty.

1.4.7 Diferenční skenovací kalorimetrie

Při této technice se látka a referenční materiál podrobí stejnému řízenému teplotnímu programu a zaznamenává se rozdíl energie absorbované látkou a referenčním materiálem jako funkce teploty. Tato energie je energií potřebnou k zachování nulového teplotního rozdílu mezi látkou a referenčním materiálem. Jestliže u vzorku dojde k fázovému přechodu, který je spojen se změnou enthalpie, je tato změna indikována jako endotermická odchylka (var) od základní linie záznamu tepelného toku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost a přesnost různých metod používaných pro stanovení bodu/teplotního rozmezí bodu varu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Srovnání metod

Metoda měření	Odhadnutá přesnost	Existující norma
Stanovení ebulliometrem	± 1,4 K (do 373 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ± 2,5 K (do 600 K) ⁽¹⁾ ⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dynamická metoda	± 0,5 K (do 600 K) ⁽²⁾	
Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)	± 0,5 K (do 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Postup podle Siwoloffa	± 2 K (do 600 K) ⁽²⁾	
Detekce fotočlánkem	± 0,3 K (do 373 K) ⁽²⁾	
Diferenční termická analýza	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76
Diferenční skenovací kalorimetrie	± 0,5 K (do 600 K) ± 2,0 K (do 1 273 K)	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Tato přesnost platí pouze pro jednoduchý přístroj, popsany např. v normě ASTM D 1120-72; může být zlepšena použitím dokonalejšího ebulliometru.

⁽²⁾ Platí pouze pro čisté látky. Užití za jiných okolností by mělo být zdůvodněno.

▼ B

1.6 POPIS METOD

Postupy některých zkušebních metod jsou popsány v mezinárodních a národních normách (viz doplněk).

1.6.1 **Ebuliometr**

Viz doplněk.

1.6.2 **Dynamická metoda**

Viz metoda A.4 pro stanovení tlaku par.

Zaznamaná se teplota varu naměřená při tlaku 101,325 kPa.

1.6.3 **Destilační metoda (stanovení rozmezí bodu varu)**

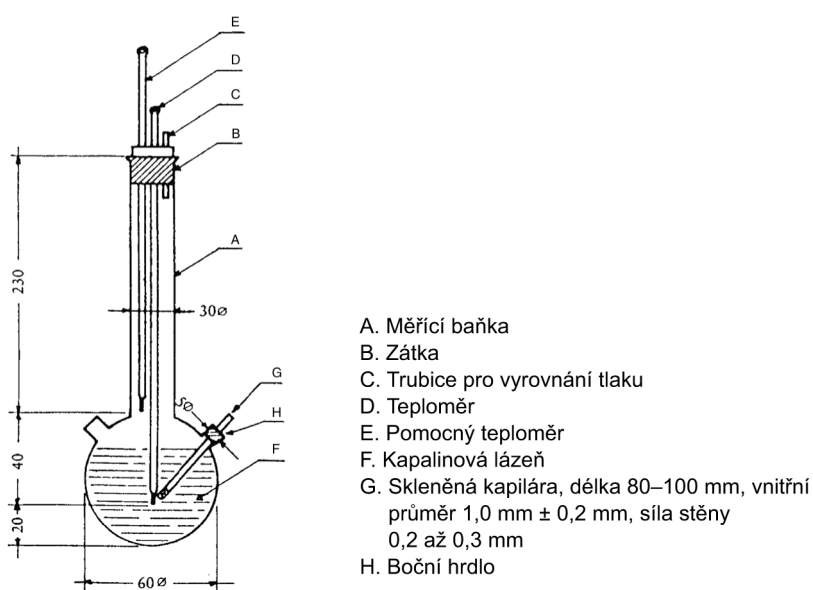
Viz doplněk.

1.6.4 **Postup podle Siwoloffa**

Vzorek se zahřívá ve zkumavce o průměru přibližně 5 mm v přístroji pro stanovení bodu tání (obrázek 1).

Na obrázku 1 je znázorněn normalizovaný přístroj pro stanovení bodu varu (JIS K 0064) (přístroj je skleněný, všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech).

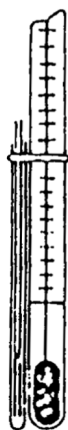
Obrázek 1



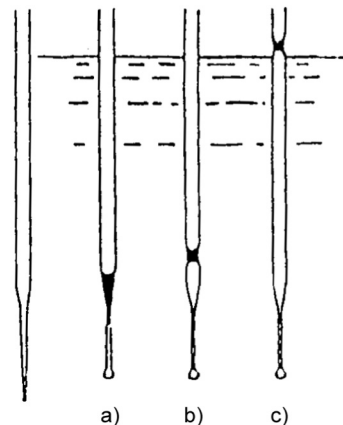
Do zkumavky se vloží kapilára (varná kapilára) zatavená asi 1 cm nad spodním koncem. Zatavená část kapiláry musí ležet pod hladinou kapaliny. Zkumavka obsahující kapiláru se upevní buď pryžovou páskou k teploměru, nebo pomocí bočního držáku (viz obrázek 2).

▼B

Obrázek 2

Princíp podle Siwoloboffa

Obrázek 3

Modifikovaný princíp

Kapalina pro lázeň se volí podle bodu varu. Pro teploty do 573 K lze použít silikonový olej. Parafinový olej lze použít pouze do 473 K. Kapalina v lázni se zahřívá tak, aby vzestup teploty byl zpočátku asi 3 K/min. Lázeň se míchá. Asi 10 K před očekávaným bodem tání se zahřívání snižuje tak, aby nárůst teploty byl nejvýše 1 K/min. Krátce před dosažením bodu varu začnou z varné kapiláry rychle unikat bublinky.

Bodu varu je dosaženo, když při ochlazování náhle ustane unikání bublinek a kapalina začne v kapiláře stoupat. Příslušný údaj na teploměru je bodem varu látky.

Modifikovanou metodou (obrázek 3) se bod varu stanovuje v kapiláře pro stanovení bodu tání. Ta se vytáhne do tenké špičky dlouhé asi 2 cm (a) a do ní se nasaje malé množství vzorku. Otevřený konec tenké části kapiláry se zataví tak, aby na konci byla malá vzduchová bublinka. Při zahřívání v aparatuře pro stanovení bodu tání (b) se vzduchová bublinka rozpíná. Bod varu odpovídá teplotě, při které sloupeček látky dosáhne hladiny kapalinové lázně (c).

1.6.5 Detekce fotočlánkem

Vzorek se zahřívá v kapiláře ve vyhříváném kovovém bloku.

Otvory v bloku se vede světelný paprsek tak, aby procházel látkou na přesně kalibrovaný fotočlánek.

Při zvyšování teploty vzorku stoupají z kapiláry jednotlivé vzduchové bublinky. Při dosažení bodu varu počet bublinek značně vzroste. To vede ke změně intenzity světla zaznamenané fotočlánkem a vyvolá signál v měřicím přístroji, kterým se zastaví zaznamenávání teploty měřené platinovým odporovým teploměrem umístěným v bloku.

Tato metoda je zvláště vhodná, protože umožňuje stanovení teplot nižších než laboratorní teplota až do 253,15 K (–20 °C) bez jakékoli úpravy přístroje. Pouze je třeba umístit přístroj v chladicí lázni.

▼ B1.6.6 **Termická analýza**1.6.6.1 *Diferenční termická analýza*

Viz doplněk.

1.6.6.2 *Diferenční skenovací kalorimetrie*

Viz doplněk.

2. **DATA**

Při malých odchylkách od normálního tlaku (nejvýše ± 5 kPa) se hodnoty teploty varu přepočítávají na normalizovanou teplotu T_n pomocí Sidneyovy-Youngovy rovnice:

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

kde:

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ [pozor na znaménko]}$$

$$P = \text{naměřený tlak v kPa}$$

$$f_T = \text{velikost změny teploty varu v závislosti na změně tlaku v K/kPa}$$

$$T = \text{naměřená teplota varu v K}$$

$$T_n = \text{teplota varu korigovaná na normální tlak v K}$$

Teplotní korekční faktory f_T a rovnice pro jejich aproximaci jsou uvedeny pro řadu látek ve zmíněných mezinárodních a národních normách.

Například metoda podle DIN 53171 uvádí přibližné korekce pro rozpouštědla obsažená v nátěrových hmotách:

Tabulka 2

Teplotní korekční faktory f_T

Teplota T (K)	Korekční 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

▼ B3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- použitá metoda,
- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,
- odhad přesnosti.

Jako bod varu se uvede střední hodnota alespoň dvou měření, jejichž výsledky leží v rozmezí odhadnuté přesnosti (viz tabulka 1).

Uvedou se naměřené teploty varu a jejich střední hodnota a dále hodnota tlaku v kPa, při kterém byla měření provedena. Tlak by se měl pokud možno blížit normálnímu tlaku.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

4. **LITERATURA**

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

▼ B*Doplněk*

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Ebuliometr**
 - 1.1 Zařízení pro stanovení bodu tání s kapalinovou lázní

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

2. **Destilační postupy (teplotní rozmezí bodu varu)**

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

3. **Diferenční termická analýza a diferenční skenovací kalorimetrie**

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

▼B**A.3 RELATIVNÍ HUSTOTA****1. METODA**

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1).
Základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody stanovení relativní hustoty jsou použitelné pro pevné a kapalné látky bez jakýchkoli omezení, pokud jde o jejich čistotu. Jednotlivé metody, které lze použít, jsou uvedeny v tabulce 1.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Relativní hustota D_{4}^{20} pevných látek nebo kapalin je poměr mezi hmotností určitého objemu zkoumané látky stanovenou při 20 °C a hmotností stejného objemu vody stanovenou při 4 °C. Relativní hustota nemá rozměr.

Hustota látky P je podíl hmotnosti látky m a jejího objemu V.

Jednotkou hustoty P, v soustavě SI je kg/m^3 .

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY (1, 3)

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METOD

Používají se čtyři skupiny metod.

1.4.1 Vztlakové metody**1.4.1.1 *Hustoměry* (pro kapaliny)**

Dostatečně přesné a rychlé stanovení hustoty lze provést plovoucími hustoměry, které umožní stanovit hustotu kapaliny odečtením hloubky jejich ponoření na kalibrované stupnici.

1.4.1.2 *Hydrostatické váhy* (pro kapaliny a pevné látky)

Ke stanovení hustoty zkoušeného vzorku lze využít rozdíl mezi jeho hmotností stanovenou na vzduchu a ve vhodné kapalině (např. vodě).

U pevných látek je naměřená hustota reprezentativní jen pro daný použitý vzorek. Při stanovení hustoty kapalin se zváží těleso známého objemu nejdříve na vzduchu a poté v kapalině.

1.4.1.3 *Metoda ponořené kuličky* (pro kapaliny) (4)

Touto metodou se stanoví hustota kapaliny z rozdílu mezi výsledky vážení kapaliny před ponořením kuličky známého objemu do zkoušené kapaliny a po něm.

▼ B**1.4.2 Pyknometrické metody**

Pro pevné látky a kapaliny lze použít pyknometry různých tvarů o známém objemu. Hustota se vypočte z rozdílu výsledků vážení plného a prázdného pyknometru a z jeho známého objemu.

1.4.3 Vzduchový srovnávací pyknometr (pro pevné látky)

Hustotu pevné látky v libovolné formě je možné měřit při pokojové teplotě plynovým srovnávacím pyknometrem. Objem látky se měří ve vzduchu nebo v inertním plynu v kalibrovaném válci nastavitelného objemu. Pro výpočet hustoty se po skončení měření objemu provede vážení.

1.4.4 Oscilační densimetr (5, 6, 7)

Hustotu kapaliny lze měřit oscilačním densimetrem. Mechanický oscilátor konstruovaný ve tvaru U trubice se rozkmitá na rezonanční kmitočet, který závisí na jeho hmotnosti. Po vložení vzorku se rezonanční kmitočet oscilátoru změní. Aparaturu je nutné kalibrovat dvěma kapalinami o známé hustotě. Kapaliny by měly být voleny nejlépe tak, aby pokrývaly rozmezí, ve kterém leží hustota měřeného vzorku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Použitelnost různých metod pro stanovení relativní hustoty je uvedena v tabulce.

1.6 POPIS METOD

Normy uvedené jako příklady, ve kterých je možno vyhledat technické podrobnosti, jsou uvedeny v doplňku.

Zkoušky musí být provedeny při 20 °C a provedou se nejméně dvě měření.

2. DATA

Viz normy.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění.

Relativní hustota D_4^{20} se uvede podle definice v bodě 1.2 společně se skupenstvím měřené látky.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.



Tabulka

Použitelnost metod

	Hustota		Nejvyšší možná hodnota	
	pevné látky	kapaliny		
1.4.1.1 Hustoměr		ano	5 Pa s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2 Hydrostatické váhy				
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (A)
b) kapaliny		ano	5 Pa s	ISO 901 a 758
1.4.1.3 Metoda ponořené kuličky		ano	20 Pa s	DIN 53217
1.4.2 Pyknometr				ISO 3507
a) pevné látky	ano			ISO 1183 (B) NF T 20053
b) kapaliny		ano	500 Pa s	ISO 758
1.4.3 Vzduchový srovnávací pyknometr	ano			DIN 55990 Teil 3 DIN 53243
1.4.4 Oscilační densimetr		ano	5 Pa s	

4. **LITERATURA**

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 109, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.
- 2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part 1.
- 3) IUPAC, Recommended reference materials for realization of physico-chemical properties, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 508.
- 4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, vol.11, 427–430.
- 5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, vol. 19, 297–302.
- 6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen – Verfahren zur Dichtebestimmung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeutische Industrie, 1975, vol. 37, 717–726.
- 7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenschaft, 1976, vol. 9, 253–255.

▼ B*Doplněk*

Další technické podrobnosti je možné zjistit například v těchto normách:

1. **Vztlakové metody**1.1 **Hustoměr**

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

1.2 **Hydrostatické váhy***Pro pevné látky*

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

Pro kapaliny

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

▼B

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

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

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

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

1.3 Metoda ponořené kuličky

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

2. **Pyknometrické metody**

2.1 Pro kapaliny

ISO 3507 Pycnometers

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

DIN 12797 Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous)

DIN 12798 Lipkin pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at 15 °C)

DIN 12800 Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798)

DIN 12801 Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than $100 \cdot 10^{-6} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼ B

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

▼B

2.2 Pro pevné látky

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

3. **Vzduchové srovnávací pyknometry**

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

▼ M1**A.4 TLAK PAR****1. METODA**

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 104 (2004).

1.1 ÚVOD

Tato přepracovaná verze metody A.4 (1) zahrnuje jednu doplňkovou metodu, a to metodu efusní: isotermální termogravimetrii určenou pro látky s velmi nízkými tlaky (až 10^{-10} Pa). Vzhledem k tomu, že je zapotřebí postupů, zejména v souvislosti se stanovením tlaku par u látek s nízkou tenzí par, další postupy se přehodnocují v rámci této metody s ohledem na další rozmezí použitelnosti.

Při termodynamické rovnováze je tlak par čisté látky pouze funkcí teploty. Základní principy jsou popsány v literatuře (2, 3).

Neexistuje žádný postup vhodný pro celý rozsah tlaku par od méně než 10^{-10} do 10^5 Pa. Do této metody spadá osm metod měření tlaku par, které lze používat v různých rozmezích tlaku par. Jednotlivé metody jsou srovnány z hlediska použití a rozsahu měření v tabulce 1. Tyto metody lze použít pouze u sloučenin, které se za podmínek zkoušky nerozkládají. V případě, kdy nelze experimentální metody z technických důvodů použít, lze tlak par rovněž odhadnout, přičemž doporučená metoda odhadu je uvedena v dodatku.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Tlak par látky je definován jako tlak nasycené páry nad pevnou nebo kapalnou látkou.

Měla by být používána jednotka tlaku v soustavě SI, tj. pascal (Pa). Dále jsou uvedeny některé dříve používané jednotky s odpovídajícími přepočítávacími faktory:

$$\begin{aligned}
 1 \text{ torr} &= 1 \text{ mm Hg} = 1,333 \times 10^2 \text{ Pa} \\
 1 \text{ fyzikální atmosféra (atm)} &= 1,013 \times 10^5 \text{ Pa} \\
 1 \text{ bar} &= 10^5 \text{ Pa}
 \end{aligned}$$

Jednotkou termodynamické teploty v soustavě SI je kelvin (K). Převod stupňů Celsia na kelviny se provádí podle vzorce:

$$T = t + 273,15$$

kde T je teplota v kelvinech, neboli termodynamická teplota, a t je teplota ve stupních Celsia.

▼ **M1**

Tabulka 1

Metoda měření	Látky		Odhad opakova- telnosti	Odhad reprodu- kovatelnosti	Doporučená oblast
	pevné	kapalné			
Dynamická metoda	s nízkým bodem tání	ano	do 25 % 1 až 5 %	do 25 % 1 až 5 %	10 ³ Pa až 2 × 10 ³ Pa 2 × 10 ³ Pa až 10 ⁵ Pa
Statická metoda	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10 Pa až 10 ⁵ Pa 10 ⁻² Pa až 10 ⁵ Pa ⁽¹⁾
Metoda za použití isoteniskopu	ano	ano	5 až 10 %	5 až 10 %	10 ² Pa až 10 ⁵ Pa
Efusní metoda: váhy pro měření tlaku par	ano	ano	5 až 20 %	do 50 %	10 ⁻³ Pa až 1 Pa
Efusní metoda: Knudsenova komůrka	ano	ano	10 až 30 %	—	10 ⁻¹⁰ Pa až 1 Pa
Efusní metoda: isotermální termo- gravimetrie	ano	ano	5 až 30 %	do 50 %	10 ⁻¹⁰ Pa až 1 Pa
Metoda sycení plynu	ano	ano	10 až 30 %	do 50 %	10 ⁻¹⁰ Pa až 10 ³ Pa
Metoda rotujícího tělíska	ano	ano	10 až 20 %	—	10 ⁻⁴ Pa až 0,5 Pa

⁽¹⁾ Při použití kapacitního manometru.

1.3 PODSTATA ZKOUŠKY

Obecně se tlak par stanovuje při různých teplotách. V omezeném rozsahu teplot je logaritmus tlaku par čisté látky nepřímo úměrný termodynamické teplotě podle zjednodušené Clapeyronovy-Clausiovovy rovnice:

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

kde:

p = tlak par v pascalech,

ΔH_v = výparné teplo v J mol⁻¹,

R = univerzální molární plynová konstanta (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹),

T = termodynamická teplota v K.

▼ **M1**

1.4 REFERENČNÍ LÁTKY

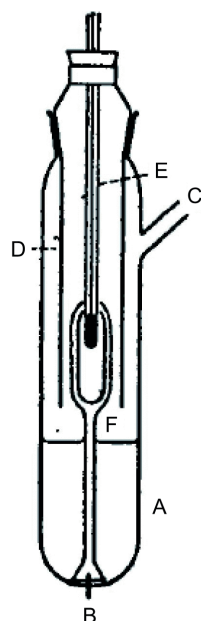
Referenční látky není nutné vždy používat. Slouží v první řadě k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.5 POPIS METODY

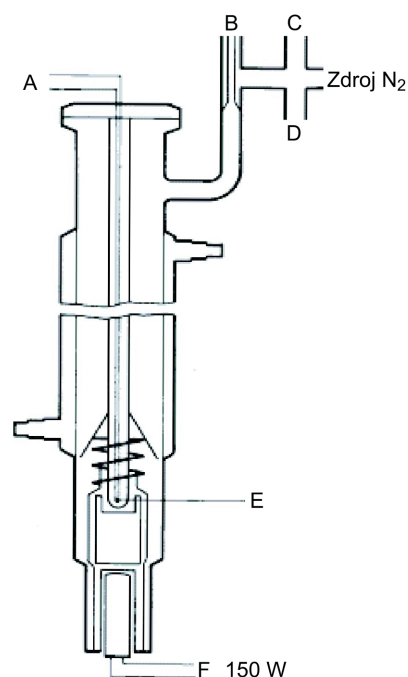
1.5.1 **Dynamická metoda (Cottrellova metoda)**1.5.1.1 *Podstata*

Pro stanovení tlaku par látky se měří její teplota varu při různých specifikovaných tlacích mezi asi 10^3 a 10^5 Pa. Tato metoda se rovněž doporučuje pro stanovení bodu varu. K tomuto účelu je metoda vhodná až do teploty 600 K. Teploty varu kapalin jsou v hloubce 3 až 4 cm přibližně o 0,1 °C vyšší než na povrchu, a to kvůli hydrostatickému tlaku sloupce kapaliny. Při Cottrellově metodě (4) je teploměr umístěn do páry nad povrch kapaliny a vroucí kapalina se nepřetržitě čerpá okolo baňky teploměru. Baňku teploměru pokrývá tenká vrstva kapaliny, která je v rovnováze s párou při atmosférickém tlaku. Teploměr tak odečítá skutečnou teplotu varu bez chyb způsobených přehřátím nebo hydrostatickým tlakem. Vývěva původně používaná Cottrellem je zachycena na obrázku 1. Vroucí kapalina se nachází ve zkumavce A. Platinový drátek B zatavený do dna usnadňuje jednotný průběh vření. Boční trubička C vede do kondenzátoru a pouzdro D brání styku studeného kondenzátu a teploměru E. Když kapalina v A vře, bubliny a kapalina zachycená nálevkou se přelévá přes baňku teploměru prostřednictvím dvou ramen vývěvy F.

Obrázek 1



Obrázek 2



▼ **M1**

Cottrellova vývěva (4)

- A: Termočlánek
- B: Vyrovnávací prostor vakua
- C: Manometr
- D: Vakuum
- E: Měřicí bod
- F: Topný článek asi 150 W

1.5.1.2 *Aparatura*

Velmi přesná aparatura využívající Cottrellův princip je zachycena na obrázku 2. Sestává se z trubice s varnou částí ve spodní části, chladiče ve střední části a výpusti a příruby v horní části. Cottrellova vývěva je umístěna ve varné části, která je ohřívána elektrickou topnou vložkou. Teplota se měří plášťovým termočlánkem nebo odporovým teploměrem zasunutým přes přírubu v horní části. Výpusť je připojena na systém regulace tlaku. Systém pro regulaci tlaku se skládá z vývěvy, vyrovnávacího objemu vakua, manostatu pro připouštění dusíku k ovládní tlaku a manometru.

1.5.1.3 *Postup měření*

Látka se umístí do varné části. Při plnění pevných látek, které nejsou ve formě prášku, může dojít k problémům, kterým se však lze někdy vyhnout zahřátím chladičeho pláště. Aparatura se uzavře přírubou a látka se odplyní. Touto metodou nelze měřit látky, které pění.

Poté se nastaví nejnižší požadovaný tlak a zapne se ohřev. Současně se teplotní čidlo připojí k zapisovači.

Rovnováhy je dosaženo, je-li při konstantním tlaku zaznamenána konstantní teplota varu. Je třeba věnovat zvláštní pozornost tomu, aby se zabránilo prudkému uvolňování par během varu. Navíc musí dojít k úplné kondenzaci v chladiči. Při stanovování tlaku par u nízkotajících pevných látek je třeba dbát na to, aby nedošlo k ucpání chladiče.

Po zaznamenání naměřeného rovnovážného teplotního bodu se nastaví vyšší tlak. Takto se pokračuje, dokud se nedosáhne tlaku 10^5 Pa (celkem asi 5 až 10 bodů měření). Pro kontrolu se musí stanovení rovnovážných bodů opakovat při klesajících hodnotách tlaku.

1.5.2 **Statická metoda**1.5.2.1 *Podstata*

Statickou metodou (5) se měří tlak par, který se ustaví při termodynamické rovnováze při dané teplotě. Tato metoda je vhodná pro látky a vícesložkové kapaliny a pevné látky v rozsahu od 10^{-1} do 10^5 Pa a při potřebné pečlivosti lze tuto metodu použít také pro oblast od 1 do 10 Pa.

▼ M1

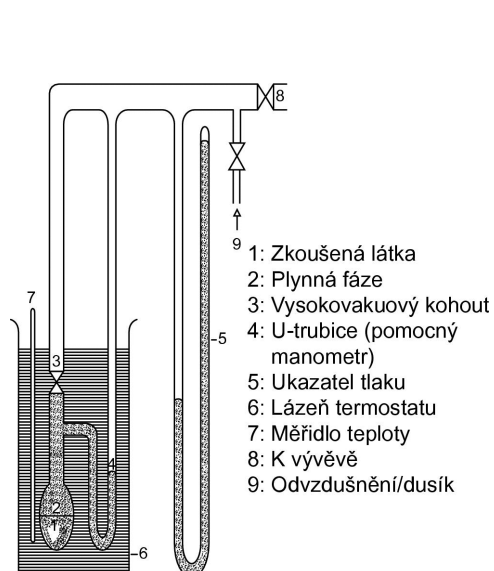
1.5.2.2 *Aparatura*

Zařízení se skládá z lázně o konstantní teplotě (preciznost $\pm 0,2$ K), zásobníku vzorku připojenému k podtlakovému potrubí, manometru a soustavy k regulaci tlaku. Baňka na vzorek (obrázek 3a) je připojena k podtlakovému potrubí přes ventil a diferenciální manometr (U-trubice obsahující vhodnou manometrickou kapalinu), který slouží jako ukazatel nuly. V závislosti na rozsahu tlaků a v závislosti na chemickém chování zkoušené látky jsou k použití v diferenciálním manometru vhodné rtuť, silikonové oleje a ftaláty. Avšak s ohledem na životní prostředí je třeba se vyvarovat použití rtuti, bude-li to možné. Zkoušená látka se nesmí značně rozpouštět ani nesmí reagovat s kapalinou v U-trubici. Namísto U-trubice lze použít manometr (obrázek 3b). V rozsahu od normálního tlaku do 10^2 Pa lze v manometru používat rtuť, zatímco silikonové oleje a ftaláty je vhodné používat pro tlaky pod 10^2 Pa až do 10 Pa. Existují též jiná měřidla tlaku, která lze použít pro tlak nižší než 10^2 Pa, a ohřívatelé membránové kapacitní manometry lze dokonce používat pro tlak nižší než 10^{-1} Pa. Teplota se měří na vnější stěně baňky se vzorkem nebo v baňce samotné.

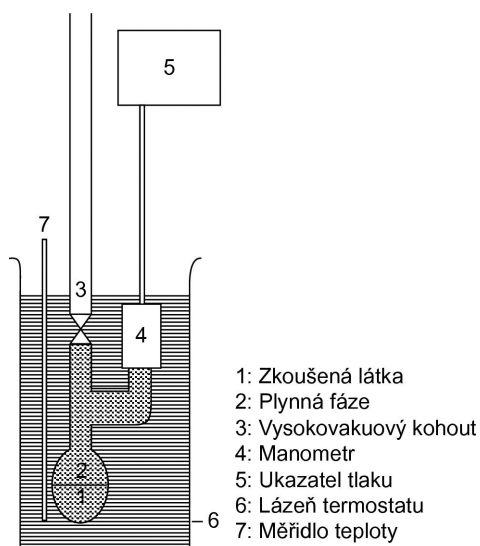
1.5.2.3 *Postup měření*

Při použití aparatury popsané na obrázku 3a se U-trubice naplní zvolenou kapalinou, která musí být před použitím odplyněna za zvýšené teploty. Zkoušená látka se vloží do aparatury a odplyní se za snížené teploty. V případě vícesložkového vzorku musí být teplota dostatečně nízká, aby se zajistilo, že se složení materiálu nezmění. Rovnováhy lze rychleji dosáhnout mícháním. Vzorek může být podchlazen kapalným dusíkem nebo suchým ledem, je ale nutno zabránit kondenzaci vzduchu nebo kapaliny z vývěvy. Při otevřeném ventilu nádoby se vzorkem se připojí na několik minut odsávání, aby se odstranil vzduch. Je-li to nutné, odplyňovací postup se několikrát opakuje.

Obrázek 3a



Obrázek 3b



▼ M1

Při zahřívání vzorku za uzavřeného ventilu roste tlak par. To mění rovnováhu kapaliny v U-trubicí. Aby se změna kompenzovala, připouští se ventilem dusík nebo vzduch do té doby, dokud není indikátor rozdílu tlaku opět na nule. Tlak potřebný k ustavení nulové hodnoty může být odečten přesným manometrem nebo přístrojem o vyšší preciznosti. Tento tlak odpovídá tenzi par látky při teplotě měření. Při použití aparatury popsané na obrázku 3b se tlak páry odečítá přímo.

Tlak par se stanoví ve vhodných krátkých intervalech teplot (celkem asi 5 až 10 bodů měření) až do požadovaného teplotního maxima.

Odečty při nízkých teplotách se musí pro kontrolu opakovat. Neleželi hodnoty zjištěné z opakovaných odečtů na křivce zjištěné pro zvyšující se teplotu, může to být způsobeno jednou z těchto příčin:

- i) vzorek stále obsahuje vzduch (např. u vysoce viskózních materiálů) nebo obsahuje látky s nízkým bodem varu, které jsou při zahřátí uvolňovány,
- ii) v látce probíhá ve vyšetřovaném teplotní rozsahu chemická reakce (např. rozklad, polymerace).

1.5.3 **Metoda za použití isoteniskopu**

1.5.3.1 *Podstata*

Isoteniskop (6) vychází z podstaty statické metody. Metoda spočívá v uložení vzorku do baňky udržované při konstantní teplotě a připojené k manometru a vývěvě. Odplyněním za sníženého tlaku se odstraní nečistoty těkavější než vyšetřovaná látka. Tlak par vzorku při zvolených teplotách je vyrovnáván známým tlakem interního plynu. Isoteniskop byl vyvinut k měření tlaku par určitých kapalných uhlovodíků, ale hodí se rovněž k vyšetřování pevných látek. Metoda obvykle není vhodná pro vícesložkové systémy. U vzorků obsahujících netěkavé nečistoty jsou výsledky zatíženy pouze mírnými chybami. Doporučený rozsah je od 10^2 do 10^5 Pa.

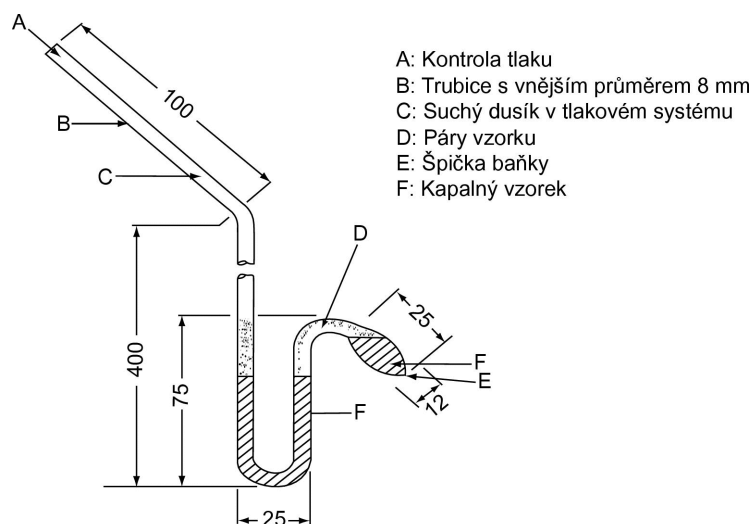
1.5.3.2 *Aparatura*

Příklad měřicího zařízení je zachycen na obrázku 4. Úplný popis lze nalézt v ASTM D 2879–86 (6).

▼ **M1**1.5.3.3 *Postup měření*

V případě kapalin slouží látka samotná jako indikační sloupec v diferenciálním manometru. Do isoteniskopu se odměří množství kapaliny postačující k naplnění baňky a krátkého ramene manometru. Isoteniskop se připojí k vakuovému systému, evakuuje se a poté se naplní dusíkem. Evakuace a výplach systému se opakuje dvakrát, aby se odstranil veškerý zbytkový kyslík. Naplněný isoteniskop se umístí do horizontální polohy, aby se vzorek rozprostřel v tenké vrstvě v baňce se vzorkem a v manometru. Tlak v systému se sníží na 133 Pa a vzorek se opatrně zahřeje právě k varu (odstranění rozpuštěných plynů). Poté se isoteniskop vrátí do původní polohy tak, aby se vzorek vrátil do baňky a krátkého ramene manometru. Tlak se udržuje na 133 Pa. Špička baňky se vzorkem se ohřívá malým plamenem, dokud uvolněná pára vzorku neexpanduje natolik, že přetlačí část vzorku z horní části baňky a ramene manometru do manometru, přičemž se vytvoří prostor bez dusíku naplněný výhradně parami. Isoteniskop se poté vloží do lázně se stálou teplotou a tlak dusíku se upraví tak, aby se rovnal tlaku vzorku. V rovnováze se rovná tlak dusíku tenzi par látky.

Obrázek 4



(Rozměry v mm)

U pevných látek se v závislosti na oblasti tlaku a teploty používají manometrické kapaliny, jako jsou například silikonové kapaliny nebo ftaláty. Odplyněná manometrická kapalina se naplní do rozšířené části dlouhého ramene isoteniskopu. Poté se vyšetřovaná látka naplní do baňky a odplyní se při zvýšené teplotě. Isoteniskop se poté nakloní, aby manometrická kapalina natekla do U-trubice.

▼ **M1**1.5.4 **Efusní metoda: váhy pro měření tlaku par (7)**1.5.4.1 *Podstata*

Vzorek zkoušené látky se ohřeje v malé pídce a umístí se pod evakuovaný skleněný zvon. Pídka se zakryje víkem, které má malé otvory o známém průměru. Pára látky unikající jedním z otvorů je vedena na misku vysoce citlivých vah, která je rovněž umístěna pod evakuovaným skleněným zvonem. U některých konstrukcí je miska vah uzavřena v chladicím bloku, který zajišťuje rozptyl tepla do vnějšího okolí vedením tepla, a je ochlazována vyzářováním tak, aby unikající pára na ní kondenzovala. Hybnost proudu par působí jako síla proti misce vah. Tlak par lze odvodit dvěma způsoby: přímo ze síly působící na misku vah a rovněž z rychlosti vypařování s využitím Hertzovy-Knudsenovy rovnice (2):

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

kde:

G = rychlost vypařování ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$),

M = molární hmotnost (g mol^{-1}),

T = termodynamická teplota (K),

R = univerzální molární plynová konstanta, ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$),

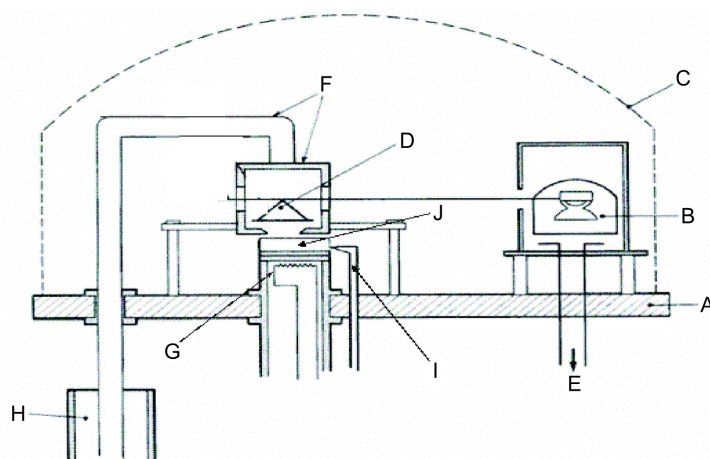
p = tlak páry (Pa).

Doporučený rozsah je od 10^{-3} do 1 Pa.

1.5.4.2 *Aparatura*

Obecný princip aparatury je znázorněn na obrázku 5.

Obrázek 5



- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| A: Základní deska | F: Chladicí blok a chladicí tyč |
| B: Přístroj s pohyblivou cívkou | G: Odpařovací pídka |
| C: Skleněný zvon | H: Dewarova nádoba s kapalným dusíkem |
| D: Miska vah se stupnicí | I: Měření teploty vzorku |
| E: Zařízení pro měření vakua | J: Zkoušená látka |

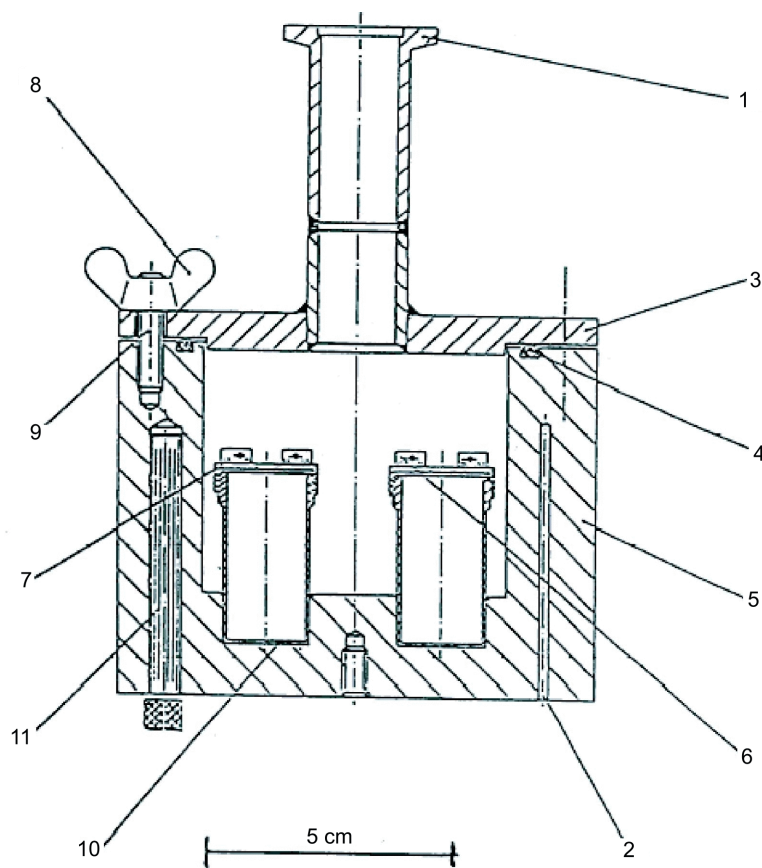
▼ **M1**1.5.5 **Efusní metoda: Knudsenova komůrka**1.5.5.1 *Podstata*

Metoda je založena na odhadu hmotnosti par zkoušené látky unikající za jednotku času z Knudsenovy komůrky (8) mikrodyzou za podmínek vysokého vakua. Hmotnost difundujících par může být zjištěna buď stanovením úbytku hmotnosti komůrky nebo kondenzací par při nízké teplotě a stanovením jejich množství chromatografickou analýzou. Tlak par se vypočte za použití Hertzovy-Knudsenovy rovnice (viz bod 1.5.4.1) pomocí korekčních faktorů, které závisí na parametrech přístroje (9). Doporučený rozsah je od 10^{-10} do 1 Pa (10, 11, 12, 13, 14).

1.5.5.2 *Aparatura*

Obecný princip aparatury je znázorněn na obrázku 6.

Obrázek 6



- | | |
|---|--|
| 1: Připojka k vakuu | 7: Šroubovací víko |
| 2: Otvory pro platinový odporový teploměr nebo pro systém měření a kontroly teploty | 8: Křídlové matice |
| 3: Víko vakuového bloku | 9: Šrouby |
| 4: O-kroužek | 10: Efusní komůrky z korozivzdorné oceli |
| 5: Hliníkový vakuový blok | 11: Topné těleso |
| 6: Zařízení pro zasouvání a vytahování efusních komůrek | |

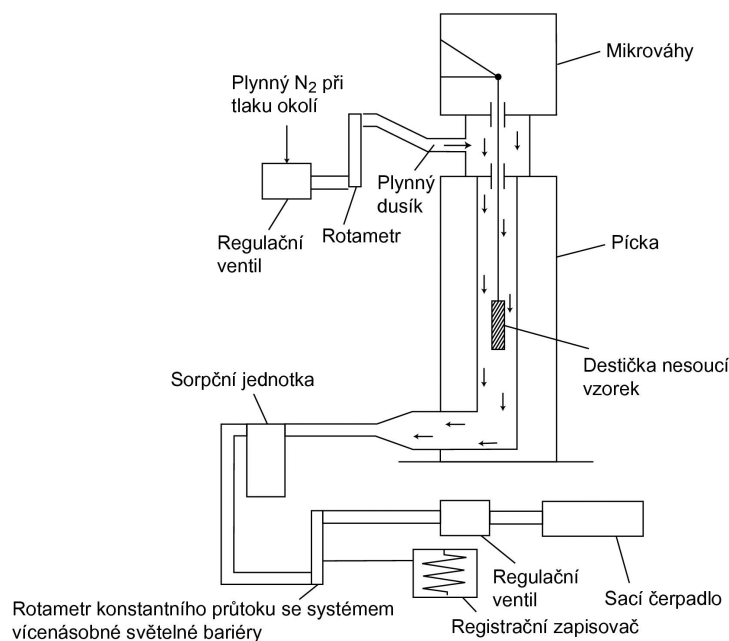
▼ **M1**1.5.6 **Efusní metoda: isotermální termogravimetrie**1.5.6.1 *Podstata*

Metoda je založena na stanovení zvýšených rychlostí vypařování zkoušené látky při zvýšených teplotách a tlaku okolí s využitím termogravimetrie (10, 15, 16, 17, 18, 19, 20). Rychlosti vypařování v_T jsou výsledkem vystavení zvolené sloučeniny působení pomalu protékajícího inertního plynu, přičemž se sleduje úbytek hmotnosti při definovaných isotermálních teplotách T v kelvinech během příslušných časových období. Tlaky par p_T se vypočítají z hodnot v_T s využitím lineární závislosti mezi logaritmem tlaku par a logaritmem rychlosti vypařování. V případě potřeby lze provést extrapolaci na teploty 20 °C a 25 °C regresní analýzou $\log p_T$ versus $1/T$. Tato metoda je vhodná pro látky s tlakem páry na úrovni 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) při čistotě co nejvíce se blížíci 100 %, aby se zabránilo chybné interpretaci naměřených hmotnostních úbytků.

1.5.6.2 *Aparatura*

Obecný princip měřicí soustavy je zachycen na obrázku 7.

Obrázek 7



Destička nesoucí vzorek, zavěšená na mikrováhách v komůrce s kontrolovanou teplotou, je vlečena proudem suchého plynného dusíku, který unáší molekuly par zkoušené látky. Po průchodu komůrkou se proud plynu čistí v sorpční jednotce.

1.5.6.3 *Postup měření*

Zkoušená látka se nanese na povrch zdrsňené skleněné destičky jako homogenní vrstva. U pevných látek se destička rovnoměrně navlhčí roztokem látky ve vhodném rozpouštědle a vysuší se v inertní atmosféře. Pro měření se pokrytá destička zavěsí na termogravimetrický analyzátor a následně se průběžně měří úbytek hmotnosti jako funkce času.

▼ **M1**

Rychlost vypařování v_T při určité teplotě se vypočítá ze ztráty hmotnosti Δm destičky se vzorkem pomocí rovnice

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

kde F je plocha povrchu pokrytého zkoušenou látkou, obvykle je to povrchová plocha destičky se vzorkem, a t je čas, během něhož dojde k úbytku hmotnosti Δm .

Tlak par p_T se vypočítá jako funkce rychlosti vypařování v_T :

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

kde C a D jsou konstanty specifické pro použité experimentální uspořádání v závislosti na průměru měřicí komůrky a rychlosti toku plynu. Tyto konstanty se musí jednorázově stanovit měřením množiny sloučenin se známým tlakem par a určit pomocí lineární regrese ze závislosti $\log p_T$ na $\log v_T$ (11, 21, 22).

Vztah mezi tlakem par p_T a teplotou T v kelvinech popisuje rovnice

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

kde A a B jsou konstanty získané lineární regresi ze závislosti $\log p_T$ na $1/T$. Pomocí této rovnice lze vypočítat tlak par extrapolací pro jakoukoliv teplotu.

1.5.7 **Metoda nasycení plynu (23)**

1.5.7.1 *Podstata*

Inertní plyn se vede při pokojové teplotě a známém průtoku přes vzorek zkoušené látky nebo nad ním, a to dostatečně pomalu, aby bylo zajištěno nasycení. Dosažení nasycení v plynné fázi je zásadně důležité. Transportovaná látka se zachytí, obvykle za použití sorbentu, a stanoví se její množství. Jako alternativní metody zachycení páry a následné analýzy mohou být ke stanovení množství hmoty transportovaného materiálu použity průtokové analytické techniky, jako je plynová chromatografie. Tlak par se vypočítá s tím, že se předpokládá platnost zákona o ideálním plynu a že celkový tlak směsi plynů je roven součtu tlaků plynných složek. Dílčí tlak zkoušené látky, tj. tlak par, se vypočítá ze známého celkového objemu plynu z hmotnosti transportovaného materiálu.

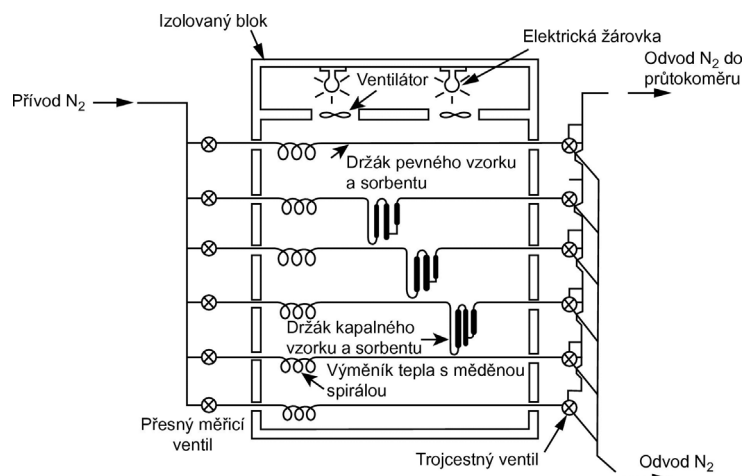
Metoda nasycení plynu je použitelná u pevných nebo kapalných látek. Lze ji použít pro tlaky par do 10^{-10} Pa (10, 11, 12, 13, 14). Metoda je nejspolehlivější pro tlaky par nižší než 10^3 Pa. Při tlaku nad 10^3 Pa jsou tlaky par všeobecně nadsazené, pravděpodobně kvůli tvorbě aerosolu. Protože se měření tlaku par provádí při pokojové teplotě, není nezbytné extrapolovat údaje získané za vysokých teplot a extrapolace vysokých teplot, která často způsobuje závažné chyby, se neprovádí.

1.5.7.2 *Aparatura*

Proces vyžaduje použití bloku s konstantní teplotou. Nákres na obrázku 8 ukazuje blok obsahující tři držáky pevných vzorků a tři držáky kapalných vzorků, které umožňují trojitou analýzu buď pevného, nebo kapalného vzorku. Teplota je regulována s precizností $\pm 0,5$ °C nebo lepší.

▼ **M1**

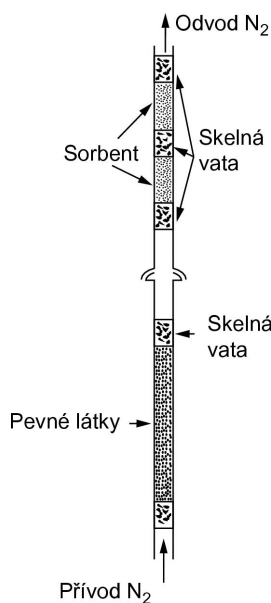
Obrázek 8



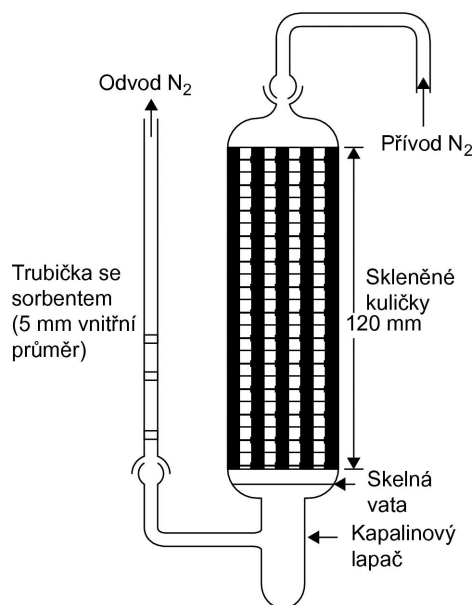
Obecně se jako inertní nosný plyn používá dusík, ale někdy může být nutno použít jiný plyn (24). Nosný plyn musí být suchý. Proud plynu se rozdělí do 6 proudů ovládaných jehlovými ventily (otvor přibližně 0,79 mm) a protéká do bloku měděnou trubicí o vnitřním průměru 3,8 mm. Po vyrovnání teplot plyn protéká okolo vzorku a sorbentovým lapačem a vychází z bloku.

Pevné vzorky se umístí do trubice o vnitřním průměru 5 mm mezi zátky ze skelné vaty (viz obrázek 9). Obrázek 10 ukazuje držák kapalného vzorku a systém se sorbentem. Metoda pro měření tlaku par kapalin s nejvyšší reprodukovatelností spočívá v nanesení kapaliny na skleněné kuličky nebo na inertní sorbent, například na oxid křemičitý, a obalení držáku těmito kuličkami. Druhou možností je nechat procházet nosný plyn hrubou fritou a probublávat sloupcem s kapalnou zkoušenou látkou.

Obrázek 9



Obrázek 10



▼ M1

Systém se sorbentem obsahuje přední a zadní část se sorbentem. Při velmi nízkých tlacích páry se na sorbentu zachytí pouze malá množství a adsorpce na skelné vatě a ve skleněném potrubí mezi vzorkem a sorbentem může představovat závažný problém.

Lapače chlazené pevným CO₂ jsou dalším účinným způsobem pro zachytávání materiálu v podobě par. Nevyvolávají žádný protitlak v sytící koloně a rovněž lze snadno kvantitativně odstranit zachycený materiál.

1.5.7.3 *Postup měření*

Průtok vytékajícího nosného plynu se měří při pokojové teplotě. Průtok se během experimentu často kontroluje, aby se zajistilo, že je přesně zjištěna hodnota celkového objemu nosného plynu. Dává se přednost nepřetržitému sledování hmotnostním průtokoměrem. Nasycení plynné fáze může vyžadovat značnou kontaktní dobu, a tím i dosti nízké průtoky plynu (25).

Po skončení experimentu se samostatně analyzují jak přední, tak zadní část se sorbentem. Sloučenina v každé části se desorbuje přidáním rozpouštědla. Výsledné roztoky se analyzují kvantitativně, aby se stanovila hmotnost desorbovaná z každé části. Volba analytické metody (rovněž volba sorbentu a desorbčního rozpouštědla) je určována povahou zkoušeného materiálu. Účinnost desorpce je stanovena vstříknutím známého množství vzorku do sorbentu, jeho desorpce a analýzou zpětně získaného množství. Je důležité kontrolovat účinnost desorpce při koncentraci vzorku za podmínek zkoušení nebo v její blízkosti.

Aby bylo zajištěno nasycení nosného plynu zkoušenou látkou, používají se tři odlišné průtoky plynu. Jestliže vypočítaný tlak par nevykazuje závislost na průtoku, předpokládá se nasycení plynu.

Tlak par se vypočítá pomocí rovnice:

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

kde:

p = tlak páry (Pa),

W = hmotnost odpařené zkoušené látky (g),

V = objem nasyceného plynu (m³),

R = univerzální molární plynová konstanta 8,314 (J mol⁻¹ K⁻¹),

T = termodynamická teplota (K),

M = molární hmotnost zkoušené látky (g mol⁻¹).

Naměřené objemy musí být korigovány v důsledku rozdílů tlaků a teplot mezi průtokoměrem a sytící kolonou.

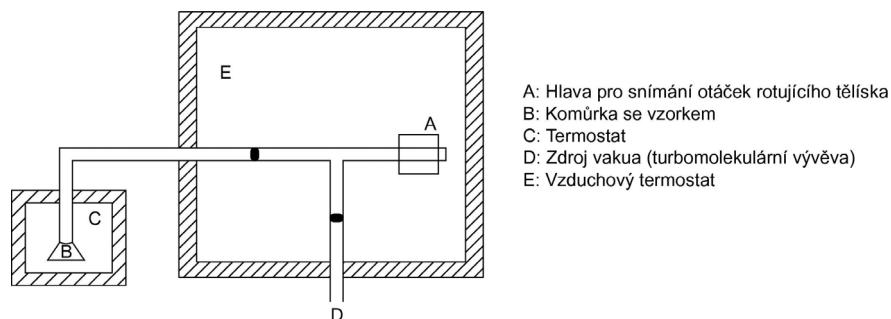
▼ **M1**1.5.8 **Metoda rotujícího tělíska**1.5.8.1 *Podstata*

Tato metoda využívá měřiče viskozity s rotujícím tělískem, kde je měřicím prvkem malá ocelová kulička zavěšená v magnetickém poli, která je uváděna do rotačního pohybu rotujícími magnetickými poli (26, 27, 28). Zvedací cívky umožňují měření rotační rychlosti. Když kulička dosáhne stanovené rotační rychlosti, obvykle přibližně 400 otáček za sekundu, zastaví se další napájení a zahájí se zpomalování vyvolané brzdícím účinkem plynu. Pokles rotační rychlosti je měřen jako funkce času. Tlak par je odvozen ze zpomalení rotující ocelové kuličky v závislosti na tlaku. Doporučený rozsah je od 10^{-4} do 0,5 Pa.

1.5.8.2 *Aparatura*

Schematický náčrt měřicí soustavy je zachycen na obrázku 11. Měřicí hlava je umístěna v prostoru s konstantní teplotou, v němž je teplota regulována s přesností na 0,1 °C. Nádobka se vzorkem je umístěna do samostatného prostoru, v němž je teplota rovněž regulována s přesností na 0,1 °C. Všechny ostatní části soustavy jsou udržovány při vyšší teplotě, aby nedocházelo ke kondenzaci. K zařízení se připojí vysokovakuová vývěva.

Obrázek 11

2. **DATA A ZPRÁVY**2.1 **DATA**

Stanovení tlaku par kteroukoli z výše popsaných metod by se mělo provést nejméně při dvou teplotách. Aby se ověřil lineární průběh křivky tlaku par v oblasti teplot od 0 °C do 50 °C, doporučuje se měření při třech nebo více teplotách. V případě efusní metody (Knudsenova komůrka a isothermální termogravimetrie) a metody nasycení plynu se jako rozsah měřicích teplot doporučuje 120 °C až 150 °C namísto 0 °C až 50 °C.

2.2 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

▼ M1

- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty) a popř. informace o provedeném předběžném čištění,
- nejméně dvě hodnoty tlaku par a teploty – pokud možno tři či více – v oblasti 0 °C až 50 °C (nebo 120 °C až 150 °C),
- nejméně jedna z teplot by měla činit 25 °C nebo méně, bude-li to technicky proveditelné při zvolené metodě,
- všechny původní údaje,
- křivka závislosti $\log p$ na $1/T$,
- odhadnutá hodnota tlaku par při 20 °C nebo 25 °C.

Zjistí-li se změna stavu (fázový přechod, rozklad), měly by být uvedeny tyto skutečnosti:

- druh změny,
- teplota při atmosférickém tlaku, při které ke změně dochází,
- hodnoty tlaku par při 10 °C a 20 °C pod teplotou přechodu a nad teplotou přechodu (s výjimkou přechodů z pevného do plynného skupenství).

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

3. LITERATURA

- (1) *Úřední věstník Evropských společenství* L 383 A, 26–47 (1992).
- (2) Ambrose, D. (1975). *Experimental Thermodynamics*, Vol. II, Le Neindre, B., Vodar, B., (eds.), Butterworths, London.
- (3) Weissberger R., (ed.) (1959). *Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry*, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.
- (4) Glasstone, S. (1946). *Textbook of Physical Chemistry*, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
- (5) NF T 20–048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^5 Pa – Static method.
- (6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
- (7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼ M1

- (8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz.*, 29, 1979; (1911), 34, 593.
- (9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.
- (10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D. P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; *Pest Management Science* 56, 521–532.
- (11) Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual*, Twelfth Edition (2000).
- (12) Friedrich, K., Stambach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. *J. Chromatog.* 16 (1964), 22–28.
- (13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., *Pesticide Science* 16 (1982), 269–278.
- (14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, *Thermochimia Acta* 112 Issue 1 (1987), 117–122.
- (15) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; *Pesticide Science* 4 (1973) 137–147.
- (16) Gückel, W., Synnatschke, G., Rittig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; *Pesticide Science* 5 (1974) 393–400.
- (17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; *Pesticide Science* 13 (1982) 161–168.
- (18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; *Pesticide Science* 45 (1995) 27–31.
- (19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); *Pesticide Science*, 53 (1998) 300–310.
- (20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; *Journal of Pharmaceutical Science* 87- (12) (1998) 1512–20.
- (21) Lide, D.R. (ed.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.
- (22) Meister, R.T. (ed.), *Farm Chemicals Handbook*, Vol. 88 (2002).
- (23) 40 CFR, 796. (1993). s. 148–153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼ M1

- (24) Rordorf B.F. (1985). *Thermochimica Acta* 85, 435.
- (25) Westcott *et al.* (1981). *Environ. Sci. Technol.* 15, 1375.
- (26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., Jitschin W. (1987). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 5(4), 2440.
- (27) Comsa G., Fremerey J.K., Lindenau, B. (1980). *J. Vac. Sci. Technol.* 17(2), 642.
- (28) Fremerey, J.K. (1985). *J. Vac. Sci. Technol. (A)*, 3(3), 1715.

▼ **M1***Dodatek***Metoda odhadu**

ÚVOD

Odhadnuté hodnoty tlaku par lze využít:

- k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná,
- k provedení odhadu nebo ke stanovení mezní hodnoty v případech, kdy nelze z technických důvodů použít experimentální metodu.

METODA ODHADU

Tlak par kapalin a pevných látek může být odhadnut pomocí modifikovaného Watsonova korelačního vztahu (a). Požaduje se pouze jeden experimentální údaj, a to teplota varu za normálního tlaku. Metoda je použitelná pro tlaky od 10^5 do 10^{-5} Pa.

Podrobné informace o metodě jsou uvedeny v příručce *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (b). Viz rovněž OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

POSTUP VÝPOČTU

Tlak par se vypočte podle vzorce:

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

kde:

- T = teplota, pro kterou je tlak par vypočítáván,
- T_b = teplota varu při normálním tlaku,
- P_{vp} = tlak par při teplotě T,
- ΔH_{vb} = výparné teplo,
- ΔZ_b = faktor stlačitelnosti (použije se hodnota 0,97),
- m = empirický faktor, jehož hodnota závisí na fyzikálním stavu při teplotě, pro níž je prováděn výpočet.

Dále

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

kde K_F je empirický součinitel zohledňující polaritu látky. V příručce (b) jsou uvedeny hodnoty faktoru K_F pro několik typů sloučenin.

▼ M1

Velmi často jsou k dispozici data o teplotě varu při sníženém tlaku. V takovém případě se tlak par vypočte podle tohoto vztahu:

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

kde T_1 je teplota varu při sníženém tlaku P_1 .

ZPRÁVA

Je-li použita metoda odhadu, musí zpráva obsahovat úplný postup výpočtu.

LITERATURA

- (a) Watson, K.M. (1943). *Ind. Eng. Chem.*, 35, 398.
- (b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods*, McGraw-Hill.
- (c) OECD Environmental Monograph No. 67. *Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment* (1993).

▼ B**A.5 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ****1. METODA**

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1).
Základní principy jsou uvedeny v literatuře (2).

1.1 ÚVOD

Popsané metody jsou určeny pro měření povrchového napětí vodných roztoků.

Před provedením těchto zkoušek je vhodné mít k dispozici předběžné informace o rozpustnosti látky ve vodě, o její struktuře, o hydrolyze a o kritické koncentraci pro tvorbu micel.

Níže uvedené metody jsou použitelné pro většinu chemických látek bez omezení z hlediska stupně jejich čistoty.

Měření povrchového napětí metodou prstencového tenziometru je omezeno na vodné roztoky s dynamickou viskozitou nižší než přibližně 200 mPa/s.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Povrchová volná enthalpie vztažená na jednotku povrchu se nazývá povrchové napětí.

Povrchové napětí se vyjadřuje těmito jednotkami:

N/m (v soustavě SI) nebo

mN/m (odvozená jednotka v soustavě SI)

1 N/m = 103 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm ve staré soustavě CGS

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Referenční látky, které pokrývají široké rozpětí hodnot povrchového napětí, jsou uvedeny v literatuře (1, 3).

1.4 PODSTATA METOD

Metody jsou založeny na měření největší síly, kterou je nutné působit ve svislém směru na třmínek nebo prsteneček, který se dotýká povrchu zkoumané kapaliny umístěné v měřicí nádobě, aby se od tohoto povrchu oddělil, nebo na destičku, která se svým okrajem dotýká povrchu, aby se vzniklý film vytáhl nahoru.

Látky, jejichž rozpustnost ve vodě dosahuje hodnoty alespoň 1 mg/l, se zkoušejí ve vodných roztocích při jedné koncentraci.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Přesnost těchto metod je pravděpodobně vyšší, než je požadováno pro účely hodnocení stavu životního prostředí.

▼B

1.6 POPIS METOD

Připraví se roztok látky v destilované vodě. Koncentrace roztoku by měla být 90 % koncentrace nasyceného roztoku látky ve vodě; pokud tato koncentrace přesáhne 1 g/l, použije se k měření roztok o koncentraci 1 g/l. Látky, jejichž rozpustnost je menší než 1 mg/l, není nutné zkoušet.

1.6.1 **Destičková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2 **Třmínková metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3 **Prstencová metoda**

Viz ISO 304 a NF T 73060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4 **Harmonizovaná prstencová metoda OECD**1.6.4.1. *Aparatura*

Pro toto měření jsou vhodné komerční tenziometry. Skládají se z těchto částí:

— pohyblivý stolek pro vzorek,

— systém měření síly,

— měřicí tělísko,

— měřicí nádoba.

1.6.4.1.1 **Pohyblivý stolek pro vzorek**

Pohyblivý stolek pro vzorek slouží jako podložka pro termostátovanou měřicí nádobu, ve které je kapalina, která má být zkoušena. Spolu se systémem měření síly je upevněn na stojanu.

1.6.4.1.2 **Systém měření síly**

Systém měření síly je umístěn nad stolem pro vzorek (viz obrázek). Chyba měření síly nemá překročit $\pm 10^{-6}$ N, což odpovídá chybě $\pm 0,1$ mg při měření hmotnosti. Ve většině případů je měřicí stupnice komerčních tenziometrů dělena v mN/m, takže je možné povrchové napětí odečítat přímo v mN/m s přesností na 0,1 mN/m.

▼ B

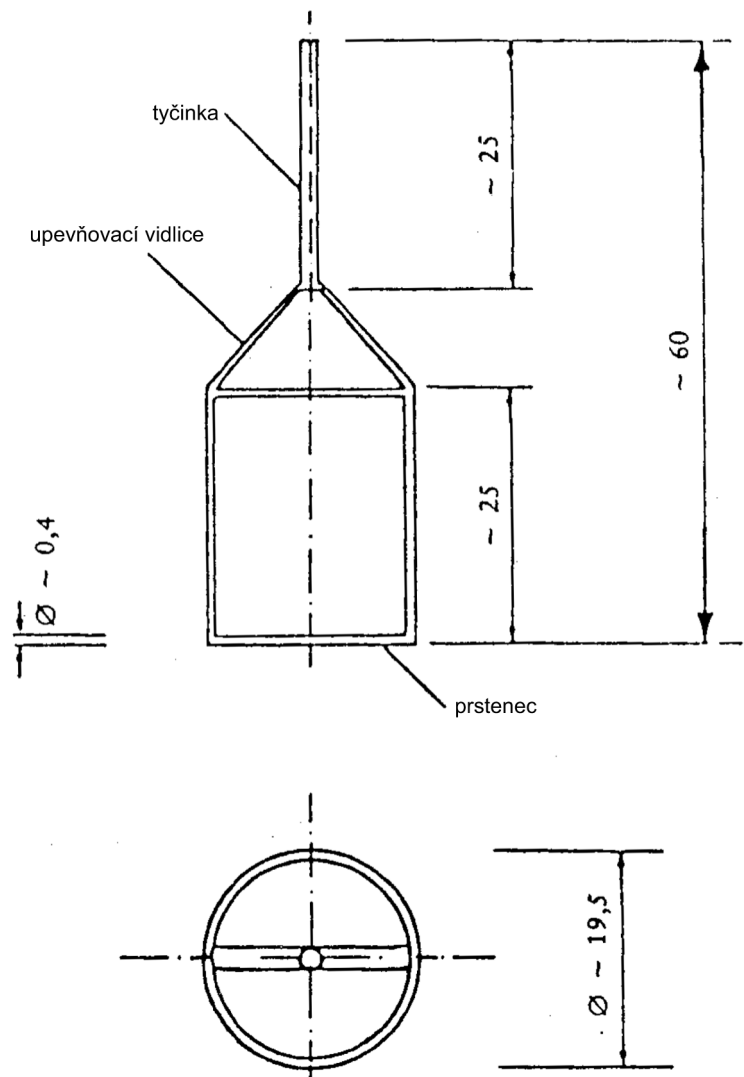
1.6.4.13 Měřicí tělísko (prstenec)

Prstenec je obvykle zhotoven z platino-iridiového drátu o průměru asi 0,4 mm a středním obvodu 60 mm. Prstenec z drátu je zavěšen vodorovně na upevňovací vidlici z drátu a na kovové tyčince, která tvoří spojení k systému měření síly (viz obrázek).

Obrázek

Měřicí tělísko

(všechny rozměry jsou uvedeny v milimetrech)



1.6.4.14 Měřicí nádoba

Měřicí nádobou pro zkušební roztok je termostátovaná skleněná nádoba. Má být konstruována tak, aby teplota zkoumané kapaliny i plynné fáze nad jejím povrchem zůstala během měření konstantní a aby se vzorek nemohl odpařovat. Vhodná je válcová skleněná nádoba o vnitřním průměru nejméně 45 mm.

▼ B1.6.4.2 *Příprava aparatury*1.6.4.2.1 *Čištění*

Skleněné nádoby je třeba pečlivě vyčistit. Pokud je to nutné, měly by se vymýt horkou kyselinou chromsírovou a následně koncentrovanou kyselinou fosforečnou (83 až 98 % hmot. H_3PO_4), pečlivě vypláchnout tekoucí vodou a nakonec omýt redestilovanou vodou do neutrální reakce a následně vysušit nebo vypláchnout vzorkem kapaliny, která má být měřena.

Prstenec je třeba nejprve pečlivě umýt vodou, aby se odstranily všechny látky rozpustné ve vodě. Poté se krátce ponoří do kyseliny chromsírové, opláchně se v redestilované vodě do neutrální reakce a nakonec se krátce ohřeje nad methanolovým plamenem.

Poznámka:

Znečištění látkami, které se nerozpouštějí ani nerozkládají kyselinou chromsírovou ani kyselinou fosforečnou, jako například silikony, je nutné odstraňovat vhodnými organickými rozpouštědly.

1.6.4.2.2 *Kalibrování aparatury*

Validace aparatury spočívá v ověření nuly a v nastavení přístroje tak, aby jeho data umožňovala spolehlivé stanovení v mN/m.

Poloha:

Přístroj musí být nastaven do vodorovné polohy, např. pomocí libely položené na základovou desku tenziometru a nastavením stavěcích šroubů základnové desky.

Nastavení nuly:

Po upevnění prstence na aparatuře a před ponořením do kapaliny je třeba nastavit nulu ukazatele tenziometru a zkontrolovat rovnoběžnost prstence s hladinou kapaliny. K tomu je možné použít hladiny kapaliny jako zrcadla.

Kalibrace:

Vlastní kalibraci před měřením je možné provést dvěma postupy:

- a) Použitím závaží: při tomto postupu se použijí jezdce o známé hmotnosti od 0,1 g do 1,0 g, které se umístí na prstenec. Kalibrační faktor Φ_a , kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (1):

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

kde:

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

m = hmotnost jezdce (g),

g = tíhové zrychlení (981 cm s^{-2} na úrovni hladiny moře),

b = střední obvod prstence (cm)

σ_a = odečtená hodnota na tenziometru po umístění jezdce na prstenec (mN/m).

▼ B

- b) Použitím vody: při tomto postupu se použije čistá voda, jejíž povrchové napětí má při 23 °C hodnotu 72,3 mN/m. Tento postup lze provést rychleji než kalibraci se závažími, ale existuje vždy nebezpečí, že povrchové napětí vody je zkresleno stopovým znečištěním povrchově aktivními látkami.

Kalibrační faktor Φ_b , kterým je třeba násobit všechny hodnoty odečtené na přístroji, je možné určit podle rovnice (2):

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

kde:

σ_o = hodnota povrchového napětí vody uvedená v literatuře (mN/m),

σ_g = naměřená hodnota povrchového napětí vody (mN/m), obě při stejné teplotě.

1.6.4.3 Příprava vzorků

Připraví se vodné roztoky zkoušených látek o požadované koncentraci, které nesmějí obsahovat nerozpuštěné složky.

Roztoky musí být udržovány při konstantní teplotě ($\pm 0,5$ °C). Protože se povrchové napětí roztoku v měřicí nádobě v čase mění, provedou se měření v různých časech a sestrojí se křivka závislosti povrchového napětí na čase. Nedochozí-li k žádným dalším změnám, bylo dosaženo rovnovážného stavu.

Měření je ovlivňováno znečištěním prachem nebo plynnými látkami. Práce musí být tedy prováděny pod ochranným krytem.

1.6.5 Zkušební podmínky

Měření se provádí přibližně při 20 °C a udržuje se tolerance $\pm 0,5$ °C.

1.6.6 Postup zkoušky

Roztoky, které mají být měřeny, se převedou do pečlivě vyčištěné měřicí nádoby, přičemž je třeba dbát na to, aby nedošlo k pění, a nádoba se poté postaví na stolek zkušební aparatury. Horní část stolku s měřicí nádobou se vysune tak vysoko, aby se prstavec ponořil pod povrch roztoku, který má být měřen. Horní část stolku se následně postupně a rovnoměrně sníží (rychlostí přibližně 0,5 cm/min), aby došlo k oddělení prstence od povrchu, a to až do dosažení maximální hodnoty síly. Film kapaliny lpící na prstenci se od něho nesmí odtrhnout. Po ukončení měření se prstavec opět ponoří pod povrch a postup se opakuje až do dosažení konstantní hodnoty povrchového napětí. Při každém stanovení se začne zaznamenávat čas v okamžiku plnění roztoku do měřicí nádoby. Odečty se provedou vždy v okamžiku, kdy je dosaženo maximální síly nutné pro oddělení prstence od povrchu kapaliny.

▼ B**2. DATA**

Za účelem výpočtu povrchového napětí se hodnota odečtená na přístroji v mN/m nejprve vynásobí kalibračním faktorem Φ_a nebo Φ_b (podle použitého postupu kalibrace). Získá se tak hodnota, která však platí pouze přibližně, a vyžaduje proto korekci.

Harkins a Jordan (4) empiricky stanovili korekční faktory pro hodnoty povrchového napětí měřeného prstencovou metodou, které závisí na rozměrech prstence, hustotě kapaliny a jejím povrchovém napětí.

Vzhledem k tomu, že je zdlouhavé stanovovat pro každé jednotlivé měření korekční faktor z tabulek Harkinse a Jordana, lze pro výpočet povrchového napětí vodných roztoků použít zjednodušenou metodu, která spočívá v odečtu korigovaných hodnot povrchového napětí přímo z tabulky. (Pro odečtené hodnoty, které leží mezi hodnotami uvedenými v tabulce, se provede interpolace.)

*Tabulka***Korekce naměřených hodnot povrchového napětí**

Pouze pro vodné roztoky $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

r	= 9,55 mm (střední poloměr prstence)
r	= 0,185 mm (poloměr drátu prstence)

Experimentální hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrace závažími (viz 1.6.4.2.2 písm. a))	Kalibrace vodou (viz 1.6.4.2.2 písm. b))
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,5
	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼ B

Experimentální hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m)	
	Kalibrace závažími (viz 1.6.4.2.2 písm. a))	Kalibrace vodou (viz 1.6.4.2.2 písm. b))
58	53,2	57
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
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

Tabulka byla sestavena na základě korekcí podle Harkinse a Jordana. Je obdobou tabulky podle normy DIN 53914 pro vodu a vodné roztoky (hustota $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$); platí pro běžný komerční prsteneček o rozměrech $R = 9,55 \text{ mm}$ (střední poloměr prstenečku) a $r = 0,185 \text{ mm}$ (poloměr drátu prstenečku). Tabulka udává korigované hodnoty pro měření povrchového napětí získané po kalibraci závažími nebo vodou.

Jiným řešením je vypočítat povrchové bez předchozí kalibrace podle rovnice:

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

kde:

F = síla udaná měřicím systémem při oddělení filmu,

R = poloměr prstenečku,

f = korekční faktor (1).

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— použitá metoda,

— druh vody nebo použitého roztoku,

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— výsledky měření: povrchové napětí (odečtené hodnoty) s uvedením jednotlivých odečtených hodnot a jejich aritmetického průměru a rovněž korigované střední hodnoty (přičemž se bere v úvahu kalibrační faktor a tabulka korekcí),

▼ B

- koncentrace roztoku,
- zkušební teplota,
- stáří použitého roztoku, zejména časový odstup mezi přípravou roztoku a měřením,
- znázornění časové závislosti povrchového napětí po převedení roztoku do měřicí nádoby,
- uvedou se všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků, zejména pokud jde o nečistoty a fyzikální stav látky.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Vzhledem k tomu, že povrchové napětí vody je 72,75 mN/m při 20°C, měly by být látky vykazující za podmínek této metody povrchové napětí menší než 60 mN/m považovány za povrchově aktivní materiály.

4. LITERATURA

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

▼ B**A.6 ROZPUSTNOST VE VODĚ****1. METODA**

Popsané metody jsou založeny na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

1.1 ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o strukturním vzorci látky, o tenzi par, disociační konstantě a o hydrolyze (jako funkci pH).

Neexistuje jediná dostupná metoda pro celý rozsah rozpustností ve vodě.

Dvě níže popsané metody pokrývají celý rozsah rozpustností, nejsou však použitelné pro těkavé látky:

— první metoda, použitelná pro v podstatě čisté látky s malou rozpustností ($< 10^{-2}$ g/l), stálé ve vodě; tato metoda se označuje jako „sloupcová eluční metoda“;

— druhá metoda, použitelná pro v podstatě čisté látky s vyšší rozpustností ($> 10^{-2}$ g/l), stálé ve vodě; tato metoda se označuje jako „banková metoda“.

Rozpustnost zkoušené látky ve vodě může být značně ovlivněna přítomností nečistot.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Rozpustnost látky ve vodě je definována hmotnostní koncentrací jejího nasyceného roztoku ve vodě při dané teplotě. Rozpustnost ve vodě se udává v jednotkách hmotnosti na objem roztoku. Jednotkou v soustavě SI je kg/m^3 (může se také používat g/l).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Přibližné množství vzorku a doba nutná pro dosažení hmotnostní koncentrace nasyceného roztoku by měly být stanoveny jednoduchou předběžnou zkouškou.

▼B**1.4.1 Sloupcová eluční metoda**

Tato metoda je založena na vymývání zkoušené látky vodou z mikrokolony, naplněné inertním nosičem, např. skleněnými kuličkami nebo pískem, pokrytým přebytkem zkoušené látky. Rozpustnost ve vodě se stanoví, jsou-li hmotnostní koncentrace eluátu konstantní. To se projeví jako plat závislosti koncentrace na čase.

1.4.2 Baňková metoda

V této metodě se látka (pevné látky musí být ve formě prášku) rozpustí ve vodě při teplotě, která je o něco vyšší než teplota měření. Po dosažení nasycení se roztok ochladí a udržuje se při teplotě měření, za stálého míchání, dokud se nedosáhne rovnováhy. Jinou možností je provést měření přímo při zkušební teplotě, pokud je vhodným vzorkováním prokázáno, že je dosaženo rovnovážného nasycení. Hmotnostní koncentrace látky ve vodném roztoku, který nesmí obsahovat žádné nerozpuštěné částice, se následně stanoví vhodnou analytickou metodou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI**1.5.1 Opakovatelnost**

Při sloupcové eluční metodě je dosažitelná opakovatelnost < 30 %; při baňkové metodě by mělo být dosaženo opakovatelnosti < 15 %.

1.5.2 Citlivost

Závisí na analytické metodě, lze však stanovit hmotnostní koncentrace až do 10^{-6} g/l.

1.6 POPIS METOD**1.6.1 Zkušební podmínky**

Zkouška se provádí pokud možno při teplotě $20 \pm 0,5$ °C. Předpokládá-li se závislost rozpustnosti ve vodě na teplotě (> 3 %/ °C), měla by být provedena měření při dvou dalších teplotách, které jsou nejméně o 10 °C vyšší a nižší než původně zvolená teplota. V tomto případě by měla být teplota udržována v toleranci $\pm 0,1$ °C. Zvolenou teplotu je třeba udržovat ve všech důležitých částech aparatury konstantní.

1.6.2 Předběžná zkouška

K přibližně 0,1 g vzorku (pevné látky musí být v práškové formě) v 10ml odměrném válci uzavíratelném skleněnou zátkou se přidává vzrůstající objem destilované vody o laboratorní teplotě podle kroků uvedených v této tabulce:

0,1 g rozpuštěno v „x“ ml vody	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Přibližná rozpustnost (g/l)	> 1 000	1 000 až 200	200 až 100	100 až 50	50 až 10	10 až 1	< 1

▼B

Po každém přidání množství vody uvedeného v tabulce se směsí intenzivně třepe po dobu 10 minut a vizuálně se kontroluje obsah nerozpuštěných částic. Zůstane-li vzorek nebo jeho část po přidání 10 ml vody nerozpuštěný, experiment je nutno opakovat ve 100ml odměrném válci s větším objemem vody. Při nízkých rozpustnostech může být doba potřebná k rozpuštění látky podstatně delší (je vhodné vyčkat alespoň 24 hodin). Přibližná rozpustnost je uvedena v tabulce pod objemem vody potřebným k úplnému rozpuštění vzorku. Není-li látka ani poté úplně rozpuštěna, je vhodné vyčkat delší dobu než 24 hodin (maximálně 96 hodin), nebo ředit dále, aby se zjistilo, zda by měla být použita sloupcová eluční metoda nebo baňková metoda.

1.6.3 Sloupcová eluční metoda**1.6.3.1 *Nosič, rozpouštědlo a eluent***

Nosič pro sloupcovou eluční metodu by měl být inertní. Vhodnými materiály, které lze použít, jsou skleněné kuličky a písek. K nanesení zkoušené látky na nosič by mělo být použito vhodné těkavé analytické čisté rozpouštědlo. Jako eluent by měla být použita voda redestilovaná ve skleněné nebo křemenné aparatuře.

Poznámka:

Nesmí se použít voda získaná přímo z organického měniče iontů.

1.6.3.2 *Nanášení na nosič*

Odváží se přibližně 600 mg nosiče a převede se do 50 ml baňky s kulatým dnem.

Přiměřené odvážené množství zkoušené látky se rozpustí ve zvoleném rozpouštědle. Dostatečný podíl tohoto roztoku se přidá k nosiči. Rozpouštědlo musí být dokonale odpařeno, např. v rotační odparce, jinak se nedosáhne úplného nasycení nosiče vodou kvůli rozdělovacím efektům na povrchu nosiče.

Nanášení zkoušené látky na nosič může být problematické (chybné výsledky), sráží-li se zkoušená látka na nosiči jako olej nebo krystalická fáze. Problém by měl být řešen experimentálně a podrobnosti by měly být zaznamenány.

Nosič s nanesenou látkou se nechá dvě hodiny bobtnat v asi 5 ml vody a suspence se poté naplní do mikrokolony. Je také možné naplnit mikrokolonu, která byla předtím naplněna vodou, suchým nosičem s nanesenou látkou a poté nechat během dvou hodin ustavit rovnováhu.

Zkušební postup:

Vymývání látky z nosiče lze provádět dvěma různými způsoby:

— oběhovým čerpadlem (viz obrázek 1),

— vyrovnávací nádobou (viz obrázek 4).

▼ B1.6.3.3 *Vymývání kolony použitím oběhového čerpadla**Aparatura*

Schematické uspořádání typického systému je znázorněno na obrázku 1. Vhodná mikrokolona je znázorněna na obrázku 2, přijatelná je ovšem i kterákoli jiná velikost za předpokladu, že budou splněna kritéria opakovatelnosti a citlivosti. Prostor hlavy kolony by měl mít obsah nejméně pěti objemů sloupce a měl by být schopný pojmout nejméně pět vzorků. Prostor hlavy kolony může být menší, pokud se počátečních pět objemů sloupce eluovaných s nečistotami nahradí čistým rozpouštědlem.

Kolona by měla být připojena k oběhovému čerpadlu, které zajišťuje konstantní průtok asi 25 ml/h. Čerpadlo se připojí hadičkami z polytetrafluorethylenu (PTFE), a/nebo skleněnými trubičkami. U aparatury složené z kolony a čerpadla musí být možnost odběru eluátu a vyrovnávání tlaku v hlavě kolony s atmosférickým tlakem. Materiál v koloně se fixuje malým (5 mm) smotkem skelné vaty, který současně slouží k odfiltrování částic. Lze použít např. peristaltické nebo membránové čerpadlo (přitom je třeba dbát na to, aby nedošlo ke znečištění materiálem hadičky a/nebo aby nedošlo k absorpci tímto materiálem.

Postup měření

Zahájí se vymývání kolony. Doporučuje se průtok asi 25 ml/h (to odpovídá u popsané kolony desetinásobku objemu sloupce za hodinu). Nejméně prvních pět objemů sloupce obsahujících nečistoty rozpustné ve vodě se odstraní. Poté se nechá běžet oběhové čerpadlo až do ustavení rovnováhy, které je dosaženo, neliší-li se koncentrace pěti po sobě následujících vzorků při náhodném výběru o více než $\pm 30\%$, přičemž rozdíly jsou nepravidelné. Tyto vzorky by se měly odebírat v intervalech, během kterých kolonou projde objem eluentu rovný nejméně desetinásobku objemu sloupce.

1.6.3.4 *Vymývání kolony pomocí vyrovnávací nádoby**Aparatura (viz obrázek 3 a 4)*

Vyrovnávací nádoba: je připojena zabroušeným spojem, který je spojen hadičkou z PTFE. Doporučuje se použít rychlost průtoku přibližně 25 ml/h. Podíly eluátu následující po sobě se shromažďují a jejich koncentrace se analyzují zvolenou metodou.

Postup měření

Pro stanovení rozpustnosti ve vodě se použijí prostřední podíly eluátu, ve kterých zůstávají koncentrace nejméně v pěti po sobě jdoucích vzorcích konstantní ($\pm 30\%$).

▼ B

V obou případech (při použití oběhového čerpadla nebo vyrovnávací nádoby) se druhé promytí provede při poloviční průtokové rychlosti. Shodují-li se výsledky obou pokusů, považuje se výsledek za uspokojivý; je-li zdánlivá rozpustnost při nižší průtokové rychlosti vyšší, je nutné průtok snižovat vždy na polovinu tak dlouho, dokud dvě po sobě následující měření neposkytnou stejnou hodnotu rozpustnosti.

V obou případech (v případě oběhového čerpadla nebo vyrovnávací nádoby) je nutné vzorky podrobit zkoušce na koloidní částice pomocí Tyndallova jevu (rozptylem světla). Přítomností takových částic je výsledek znehodnocen a zkouška by měla být opakována po zlepšení filtrační funkce kolony.

Mělo by být zaznamenáno pH každého vzorku. Druhé měření je třeba provést při stejné teplotě.

1.6.4 **Bañková metoda**

1.6.4.1 *Zařízení*

Tato metoda vyžaduje toto vybavení:

- běžné laboratorní skleněné nádoby a pomůcky,
- zařízení pro třepání roztoků při regulovaných konstantních teplotách,
- odstředivka (nejlépe termostatovaná), je-li nezbytná v případě emulzí, a
- přístroje pro analytická stanovení.

1.6.4.2 *Postup měření*

Množství materiálu potřebné pro nasycení požadovaného objemu vody se odhadne z předběžného pokusu. Potřebný objem vody závisí na analytické metodě a na rozsahu rozpustnosti. Do tří skleněných nádobek opatřených skleněnými zátkami (např. centrifugačních kyvet, baněk) se naváží asi pětinašobek odhadnutého množství materiálu. Do každé z nádobek se přidá zvolené množství vody a nádoby se těsně uzavřou. Uzavřené nádoby se poté třepou při 30 °C. (K tomuto účelu by měla být použita třepačka nebo míchačka pracující při konstantní teplotě, např. magnetické míchání v termostatované vodní lázni.) Po jednom dnu se jedna z nádobek vyjme a nechá se za občasného míchání 24 hodin stát, aby se ustálila rovnováha při teplotě měření. Poté se obsah nádoby odstředí při teplotě měření a v čiré vodné fázi se vhodnou analytickou metodou stanoví koncentrace zkoušené látky. Po dvou, resp. třech dnech se zbylé dvě nádoby po předchozím ustavení rovnováhy nasycení při 30 °C zpracují podobným způsobem. Odpovídají-li hodnoty koncentrace alespoň u posledních dvou nádobek požadované reprodukovatelnosti, je stanovení uspokojivé. Pokud hodnoty koncentrací pro nádoby 1, 2 a 3 vykazují stoupající tendenci, mělo by být celé stanovení opakováno s prodloužením doby pro ustavení rovnováhy.

Měření může být provedeno i bez předběžné inkubace při 30 °C. S cílem zjistit rychlost ustavení saturační rovnováhy se odebírají vzorky do té doby, dokud doba míchání ovlivňuje koncentraci měřeného roztoku.

▼B

Mělo by být zaznamenáno pH každého vzorku.

1.6.5 Analýza

Pro tato stanovení se upřednostňuje analytická metoda specifická pro danou látku, protože malá množství rozpuštěných nečistot mohou způsobit velké chyby při stanovení rozpustnosti ve vodě. Příklady těchto analytických metod jsou plynová nebo kapalinová chromatografie, titrační metody, fotometrické metody, voltametrické metody.

2. DATA**2.1 SLOUPCOVÁ ELUČNÍ METODA**

Pro každý pokus by měla být vypočtena střední hodnota z nejméně pěti po sobě následujících vzorků vybraných z oblasti po dosažení rovnovážného nasycení a rovněž by měla být vypočtena směrodatná odchylka. Výsledky by měly být uvedeny v jednotkách hmotnosti na jednotku objemu roztoku.

Porovnej se střední hodnoty dvou zkoušek provedených za různých rychlostí průtoku a jejich opakovatelnost by měla být menší než 30 %.

2.2 BAŇKOVÁ METODA

Výsledky pro každou ze tří baněk se uvedou samostatně a jsou-li ustálené (opakovatelnost je lepší než 15 %), zprůměrují se a vyjádří se v jednotkách hmotnosti na jednotku objemu roztoku. Je-li rozpustnost velmi vysoká (> 100 g/l), může to vyžadovat přepočtení hmotnostních jednotek na objemové jednotky s využitím hustoty roztoku.

3. ZPRÁVY**3.1 SLOUPCOVÁ ELUČNÍ METODA**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- výsledky předběžné zkoušky,
- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),
- jednotlivé koncentrace, hodnoty rychlosti průtoku a pH pro každý vzorek,
- střední hodnoty a směrodatné odchylky nejméně pro pět vzorků z rovnovážné oblasti křivky nasycení z každého pokusu,
- průměrná hodnota dvou po sobě následujících přijatelných měření,
- teplota vody během procesu tvorby nasyceného roztoku,
- použitá analytická metoda,
- druh použitého materiálu nosiče,
- způsob nanesení studované látky na nosič,
- použité rozpouštědlo,
- poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky a při použité analytické metodě,
- všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

▼B

3.2 BAŇKOVÁ METODA

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- výsledky předběžné zkoušky,
- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),
- výsledky jednotlivých analytických stanovení a průměrné hodnoty, pokud byla pro každou nádobku stanovena více než jedna hodnota,
- hodnota pH každého vzorku,
- průměrná hodnota pro dvě různé nádoby, jejichž výsledky jsou ve shodě,
- teplota při zkoušce,
- použitá analytická metoda,
- poznatky o jakékoli chemické nestálosti látky během zkoušky a při použité analytické metodě,
- všechny informace, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

4. LITERATURA

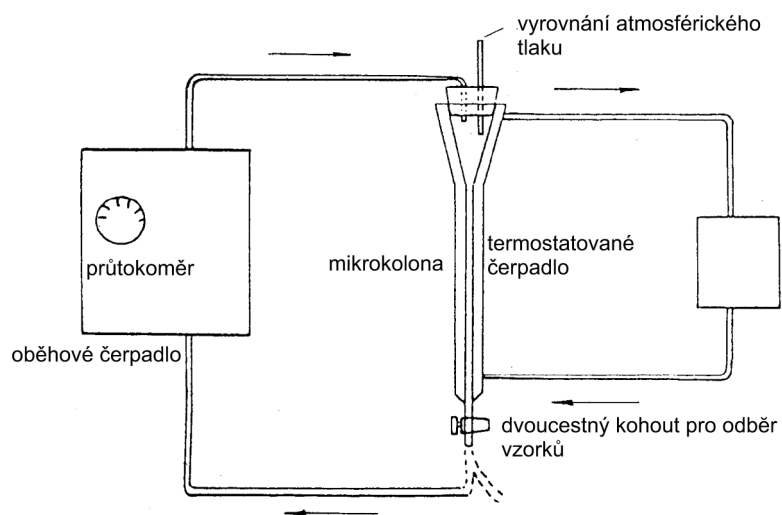
- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 105, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.
- 2) NF T 20-045 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility – Column elution method.
- 3) NF T 20-046 (AFNOR) (Sept. 85). Chemical products for industrial use – Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility – Flask method.

▼ B

Doplňěk

Obrázek 1

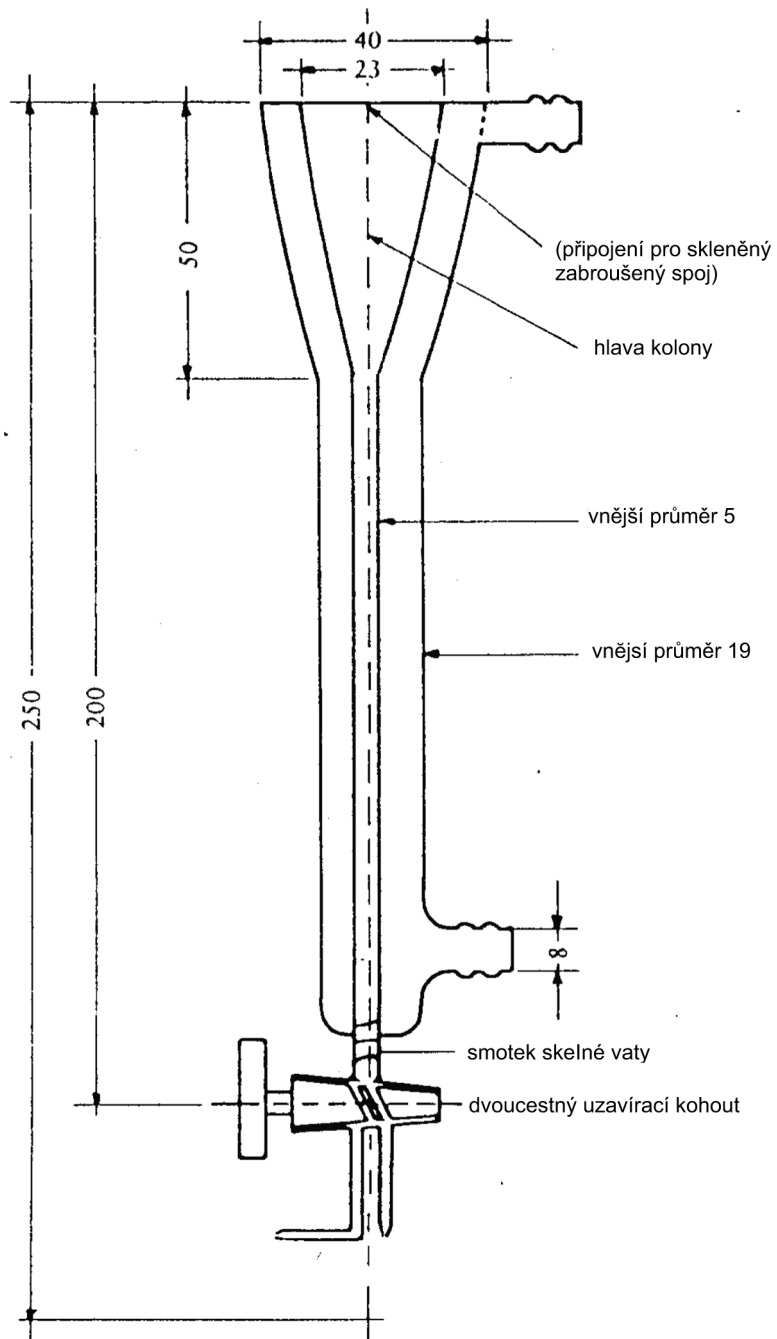
Sloupcová eluční metoda s oběhovým čerpadlem



▼B

Obrázek 2

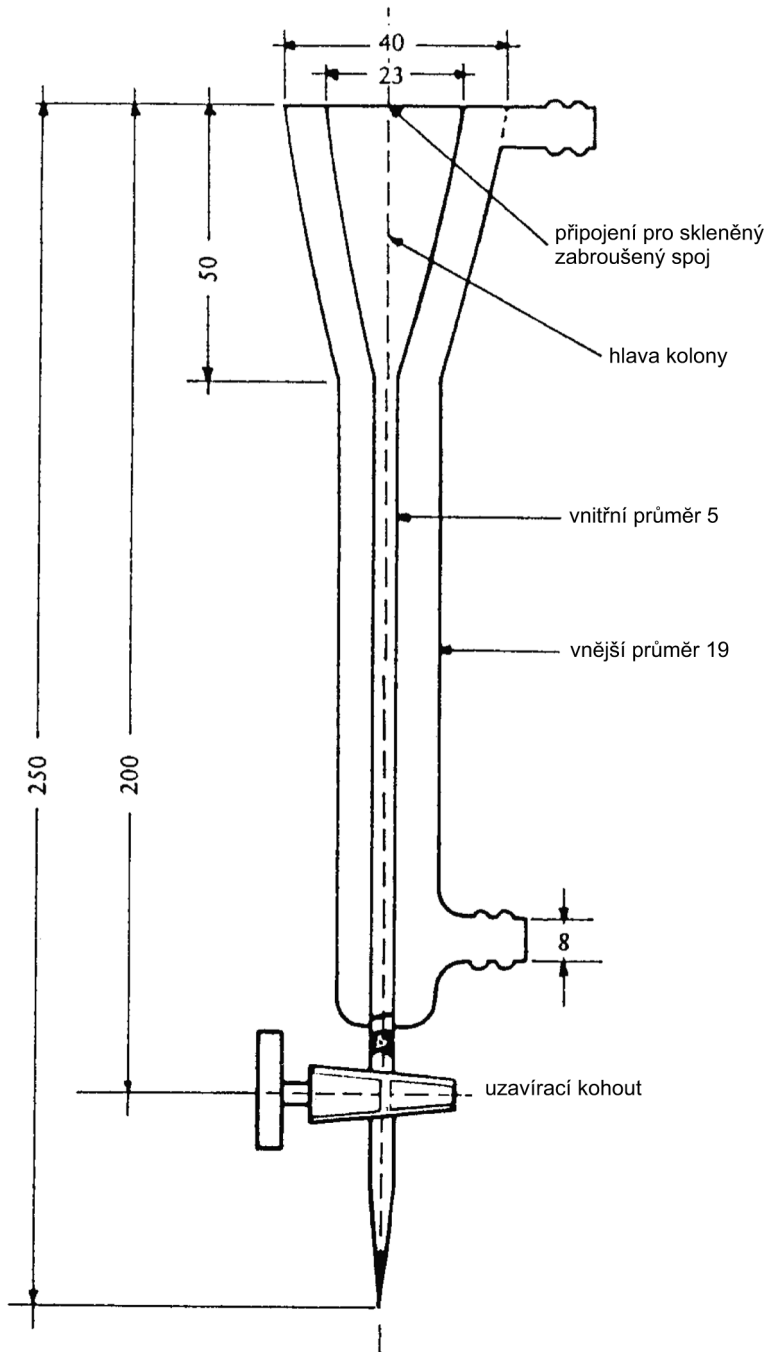
Typická mikrokolona
(všechny rozměry v mm)



▼B

Obrázek 3

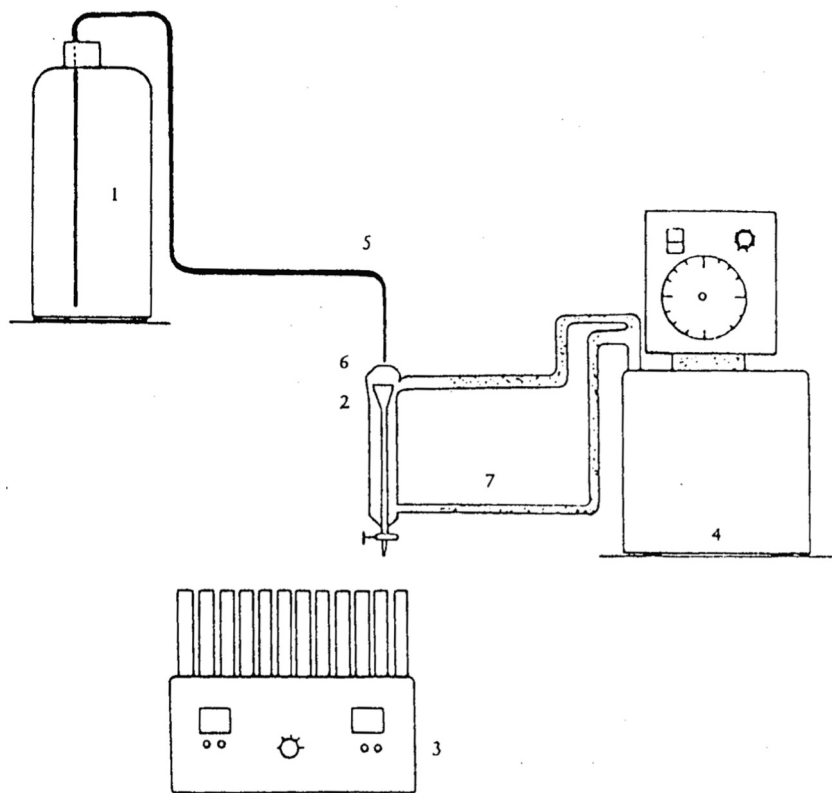
Typická mikrokolona
(všechny rozměry v mm)



▼B

Obrázek 4

Sloupcová eluční metoda s vyrovnávací nádobou



1. Vyrovnávací nádoba (např. baňka o obsahu 2,5 l)
2. Kolona (viz obrázek 3)
3. Sběrač frakcí
4. Termostat
5. Teflonová hadička
6. Skleněný zabroušený spoj
7. Hadice na vodu (mezi termostatem a kolonotí, vnitřní průměr asi 8 mm)

▼B**A.8 ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT****1. METODA**

Popsaná metoda „třepací lahve“ je založena na Pokynech OECD pro zkoušení (1).

1.1. ÚVOD

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o strukturním vzorci látky, o disociační konstantě, o rozpustnosti ve vodě, o hydrolyze, o rozpustnosti v n-oktanolu a o povrchovém napětí.

U disociujících látek by měla být měření prováděna pouze s nedisociovanou formou (volná kyselina nebo volná báze), získanou při použití vhodného pufru o pH nejméně o 1 nižším (volná kyselina) nebo vyšším (volná báze) než pK.

Tato zkušební metoda zahrnuje dva samostatné postupy: metodu třepací lahve a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). První metodu lze použít, leží-li hodnota $\log P_{ow}$ (definice viz níže) v rozmezí -2 až 4 , a druhou metodu, leží-li hodnota $\log P_{ow}$ v rozmezí 0 až 6 . Před provedením kteréhokoli z experimentálních postupů by měl být nejdříve získán předběžný odhad rozdělovacího koeficientu.

Metoda třepací lahve je použitelná pouze pro v podstatě čisté látky, které jsou rozpustné ve vodě a v n-oktanolu. Nelze ji použít pro povrchově aktivní látky (pro které by měla být uvedena hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na příslušných rozpustnostech v n-oktanolu a ve vodě).

Metoda HPLC není použitelná pro silné kyseliny a zásady, komplexní sloučeniny kovů, povrchově aktivní látky a látky, které reagují s eluentem. Pro tyto látky by měla být uvedena hodnota získaná výpočtem nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech v n-oktanolu a ve vodě.

Metoda HPLC je méně citlivá na přítomnost nečistot ve zkoušené látce než metoda třepací lahve. Někdy však mohou nečistoty ztížit interpretaci výsledků, protože přiřazení píků se stává nejistým. U směsí, které dávají nerozlišitelný pás, by měly být uvedeny spodní a horní mez hodnoty $\log P$.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Rozdělovací koeficient (P) je definován jako poměr rovnovážných koncentrací (c_i) rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému tvořeném dvěma prakticky nemísitelnými rozpouštědly. V případě n-oktanolu a vody platí:

$$P_{ow} = \frac{C_{\text{Oktan-1-ol}}}{C_{\text{voda}}}$$

Rozdělovací koeficient (P) je tedy podílem dvou koncentrací a udává se obvykle ve formě svého dekadického logaritmu ($\log P$).

▼ B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Metoda třepací lahve

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

Metoda HPLC

Za účelem korelace hodnot naměřených pro danou sloučeninu metodou HPLC s její hodnotou P je nutné sestavit kalibrační graf závislosti log P na chromatografických datech tvořený nejméně šesti referenčními body. Vhodné referenční látky zvolí uživatel. Pokud je to možné, měla by mít alespoň jedna referenční látka P_{ow} vyšší než zkoušená látka a jiná referenční látka P_{ow} nižší než zkoušená látka. U hodnot log P nižších než 4 může být kalibrace založena na datech získaných metodou třepací lahve. U hodnot log P vyšších než 4 může být kalibrace založena na ověřených hodnotách z literatury, pokud jsou v souladu s vypočtenými hodnotami. Za účelem dosažení vyšší přesnosti je vhodnější volit látky, které mají podobnou strukturu jako zkoušená látka.

Rozsáhlé seznamy hodnot P_{ow} pro mnoho skupin chemických látek jsou dostupné v literatuře (2, 3). Nejsou-li k dispozici údaje o rozdělovacích koeficientech látek s podobnou strukturou, lze použít obecnější kalibraci s jinými referenčními látkami.

Seznam doporučených referenčních látek a jejich hodnot P_{ow} je uveden v doplňku 2..

1.4 PODSTATA METODY

1.4.1 **Metoda třepací lahve**

Pro stanovení rozdělovacího koeficientu musí být dosaženo rovnováhy mezi všemi vzájemně působícími složkami systému a musí být stanoveny koncentrace látek rozpuštěných v obou fázích. Ze studia literatury vztahující se k této otázce vyplývá, že k řešení tohoto problému lze použít několik různých postupů, např. důkladné promíchání obou fází a jejich následné oddělení za účelem stanovení rovnovážných koncentrací vyšetřované látky.

1.4.2 **Metoda HPLC**

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou pevnou fází obsahující dlouhé uhlovodíkové řetězce (např. C_8 , C_{18}) chemicky vázané na oxid křemičitý. Chemické látky nastříknuté do této kolony se v ní pohybují různou rychlostí v důsledku různých stupňů rozdělení mezi mobilní fází a uhlovodíkovou stacionární fází. Směsi chemikálií se eluují v pořadí své hydrofobnosti, přičemž se látky rozpustné ve vodě eluují jako první a látky rozpustné v olejích jako poslední, úměrně svému rozdělovacímu koeficientu uhlovodíky-voda. To umožňuje určit vztah mezi retenčním časem v této koloně (s reversními fázemi) a rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda. Rozdělovací koeficient se odvodí z kapacitního faktoru k, daného výrazem:

▼ B

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

v němž, t_r = retenční čas zkoušené látky, t_0 = průměrná doba, kterou molekula rozpouštědla potřebuje k průchodu kolonou (mrtvá doba).

Kvantitativní analytické metody nejsou zapotřebí, nezbytné je pouze stanovení elučních dob.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

1.5.1 **Opakovatelnost***Metoda třepací lahve*

S cílem zaručit správnost hodnoty rozdělovacího koeficientu se provedou opakovaná stanovení při třech různých zkušebních podmínkách, přičemž lze měnit jak množství dané látky, tak poměr objemů obou rozpouštědel. Dekadické logaritmy stanovených hodnot rozdělovacího koeficientu by měly ležet v rozmezí $\pm 0,3$.

Metoda HPLC

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena opakovaná stanovení. Hodnoty $\log P$ získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí $\pm 0,1$.

1.5.2. **Citlivost***Metoda třepací lahve*

Měřicí rozsah metody je určen mezí detekce analytické metody. Ta by měla umožnit stanovení hodnot $\log P_{ow}$ v oblasti od - 2 do 4 (pokud to podmínky dovolí, lze tuto oblast rozšířit až do hodnoty $\log P_{ow}$ do 5) není-li koncentrace rozpuštěné látky v žádné z fází vyšší než 0,01 mol/l.

Metoda HPLC

Metoda HPLC umožňuje stanovení rozdělovacích koeficientů v rozsahu $\log P_{ow}$ od 0 do 6.

Obvykle je možné určit rozdělovací koeficient dané látky s přesností ± 1 řádu vzhledem k hodnotě získané metodou třepací lahve. Typické korelace lze nalézt v literatuře (4, 5, 6, 7, 8). Vyšší přesnosti lze obvykle dosáhnout, je-li korelační závislost založena na referenčních látkách podobné struktury (9).

▼ B1.5.3 **Specifičnost***Metoda třepací lahve*

Nernstův rozdělovací zákon platí pro zředěné roztoky jen při konstantní teplotě, konstantním tlaku a pH. Platí pouze pro čistou látku rozdělenou mezi dvě čistá rozpouštědla. Je-li současně v jedné nebo obou fázích přítomno více rozpuštěných látek, může tím být výsledek ovlivněn.

Disociace nebo asociace rozpuštěných molekul vede k odchylkám od Nernstova rozdělovacího zákona. Tyto odchylky se projevují tím, že se rozdělovací koeficient stává závislým na koncentraci roztoku.

V důsledku existujících mnohonásobných rozdělovacích rovnovah by tato metoda neměla být použita bez korekcí na disociovatelné sloučeniny. Pro tyto sloučeniny by mělo být zvaženo použití pufrčních roztoků namísto vody; pH pufrčního roztoku by se mělo lišit od pK_a látky nejméně o 1, přičemž se zohlední význam tohoto pH s ohledem na životní prostředí.

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu**

Hodnotu rozdělovacího koeficientu lze nejlépe odhadnout na základě výpočtu (viz doplněk 1) nebo popřípadě z poměru rozpustností zkoušené látky v čistých rozpouštědlech (10).

1.6.2 **Metoda třepací lahve**1.6.2.1 *Příprava*

n-oktanol: stanovení rozdělovacího koeficientu by mělo být provedeno s n-oktanolem čistoty p.a.

Voda: měla by být použita destilovaná voda nebo redestilovaná voda ve skleněné nebo křemenné aparatuře. V případě potřeby by měly být u disociovatelných látek použity místo vody pufrční roztoky.

Poznámka:

Neměla by být použita voda pocházející přímo z měniče iontů.

1.6.2.1.1 **Předběžné nasycení rozpouštědel**

Před stanovením rozdělovacího koeficientu se fáze rozpouštědlového systému vzájemně nasatí třepáním při teplotě experimentu. K dosažení tohoto cíle je vhodné 24 hodin třepat na mechanické třepačce ve dvou velkých zásobních lahvích vysoce čistý n-oktanol nebo vysoce čistou vodu, obojí s dostatečným množstvím druhého rozpouštědla, a poté nechat rozpouštědla stát tak dlouho, dokud se obě fáze neoddělí a dokud není dosaženo nasycení.

▼ B

1.6.2.1.2 Příprava zkoušky

Celkový objem dvoufázového systému by měl téměř naplňovat zkušební nádobu. Tím se zamezí ztrátám látek v důsledku odpařování. Poměry objemů a množství látek, které mají být použity, jsou dány:

- předběžným odhadem rozdělovacího koeficientu (viz výše),
- minimálním množstvím zkoušené látky nezbytným pro postup analýzy a
- omezením maximální koncentrace v každé fázi na 0,01 mol/l.

Provedou se tři zkoušky. Při první se použije vypočtený poměr objemů n-oktanolu a vody; při druhé se tento poměr dělí dvěma a při třetí se tento poměr násobí dvěma (např. 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3 Zkoušená látka

Připraví se zásobní roztok v n-oktanolu předem nasyceném vodou. Koncentrace tohoto zásobního roztoku by měla být před jeho použitím ke stanovení rozdělovacího koeficientu přesně stanovena. Tento roztok by měl být uchováván za podmínek, které zajistí jeho stálost.

1.6.2.2 Zkušební podmínky

Zkušební teplota by měla být konstantní (± 1 °C) a měla by ležet v rozmezí 20–25 °C.

1.6.2.3 Postup měření

1.6.2.3.1 Ustavení rovnováhy rozdělení

Pro každou ze zkušebních podmínek by měly být připraveny dvě zkušební nádoby obsahující potřebná přesně odměřená množství obou rozpouštědel spolu s nezbytným množstvím zásobního roztoku.

Fáze n-oktanolu je nutné odměřit objemově. Zkušební nádoby by měly být umístěny do vhodné třepačky, nebo by měly být třepány ručně. Při použití centrifugační kyvety spočívá doporučený postup v tom, že se kyveta rychle otáčí kolem své příčné osy o 180°, takže případný zachycený vzduch stoupá vzhůru oběma fázemi. Ze zkušenosti vyplývá, že k ustavení rovnovážného rozdělení obvykle stačí 50 takových otočení. Pro jistotu se doporučuje 100 otočení během pěti minut.

1.6.2.3.2 Oddělení fází

V případě potřeby lze oddělení fází provést odstředěním směsi. Odstředění by mělo být provedeno laboratorní odstředivkou udržovanou při laboratorní teplotě, nebo, je-li použita odstředivka bez regulace teploty, by měly být centrifugační kyvety za účelem ustavení rovnováhy udržovány alespoň jednu hodinu před analýzou při zkušební teplotě.

▼ B1.6.2.4 *Analýza*

Za účelem stanovení rozdělovacího koeficientu je nutné stanovit koncentrace zkoušené látky v obou fázích. To lze provést odebráním alikvotního podílu každé z obou fází z každé kyvety a pro každou zkušební podmínku a jejich analýzou zvoleným postupem. Celkové množství látky přítomné v obou fázích by mělo být vypočteno a porovnáno s původně dodaným množstvím látky.

Odběr vzorku z vodné fáze je nutné provést postupem minimalizujícím riziko znečištění stopami n-oktanolu: k odběru vzorků vodné fáze lze použít skleněnou injekční stříkačku s vyměnitelnou jehlou. Stříkačka se nejprve částečně naplní vzduchem. Vzduch se při průchodu jehly vrstvou n-oktanolu opatrně vypudí. Do stříkačky se natáhne dostatečný objem vodné fáze. Obsah stříkačky lze poté použít jako vzorek vodné fáze. Stříkačka se z roztoku rychle vytáhne a jehla se sejme. Koncentrace v obou od sebe oddělených fázích by měla být stanovena nejlépe metodou, která je specifická pro danou látku. Příklady možných vhodných analytických metod jsou:

- fotometrické metody,
- plynová chromatografie,
- vysokoučinná kapalinová chromatografie.

1.6.3 **Metoda HPLC**1.6.3.1 *Příprava**Aparatura*

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulzním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástřikový ventil se vstřikovacími smyčkami. Přítomnost polárních skupin ve stacionární fázi může závažně zhoršit účinnost kolony HPLC. Stacionární fáze by proto měla mít minimální podíl polárních skupin (11). Lze použít komerční mikročasticové náplně s reversními fázemi nebo hotové kolony s náplní. Mezi nástřikem a analytickou kolonou může být umístěna ochranná předkolona.

Mobilní fáze

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol čistoty pro HPLC a voda čistoty pro HPLC, které se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Doporučuje se použít směsi methanol-voda s minimálním obsahem vody 25 %. Obvykle vyhovuje pro eluci sloučenin o $\log P = 6$ během jedné hodiny při průtokové rychlosti 1 ml/min směs methanol-voda 3:1 (obj.). U sloučenin s vysokou hodnotou $\log P$ může být nutné zkrátit eluční dobu (stejně tak u referenčních látek) snížením polarity mobilní fáze nebo délky kolony.

Látky s velmi nízkou rozpustností v n-oktanolu mají tendenci při použití metody HPLC vykazovat abnormálně nízké hodnoty P_{ow} ; piky těchto sloučenin někdy doprovázejí čelo rozpouštědla. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že proces rozdělení je příliš pomalý, než aby bylo dosaženo rovnováhy za dobu, po kterou obvykle trvá dělení metodou HPLC. Pro dosažení spolehlivé hodnoty může být v takovém případě účinné snížení průtokové rychlosti nebo snížení poměru methanol-voda.

▼ B

Zkoušená i referenční látka by měly být rozpustné v mobilní fázi v dostatečných koncentracích umožňujících jejich detekci. Pouze ve výjimečných případech mohou být u směsi methanol-voda použita aditiva, neboť aditiva mění vlastnosti kolony. V případě chromatogramů získaných při použití aditiv, musí být použita samostatná kolona téhož typu. Nevyhovuje-li směs methanol-voda, lze použít směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. ethanol-voda nebo acetonitril-voda.

Pro disociovatelné látky je kritické pH eluentu. Mělo by ležet v pracovní oblasti pH kolony, která je obvykle 2 až 8. Doporučuje se použití pufrálních roztoků. Je nezbytné dbát na to, aby nedošlo ke srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsí organické fáze s pufrálním roztokem. Měření pomocí HPLC se stacionárními fázemi na bázi oxidu křemičitého při pH vyšším než 8 se nedoporučuje, neboť použití alkalické mobilní fáze může způsobit rychlé narušení činnosti kolony.

Rozpouštěné látky

Referenční sloučeniny by měly mít nejvyšší dostupnou čistotu. Sloučeniny, které se mají používat pro zkoušení nebo kalibraci, se pokud možno rozpustí v mobilní fázi.

Zkušební podmínky

Teplota by během měření neměla kolísat o více než ± 2 K.

1.6.3.2 **Měření***Výpočet mrtvé doby t_0*

Mrtvou dobu t_0 je možné stanovit buď pomocí homologické řady (např. nalkylmethylketonů) nebo nezadržovaných organických sloučenin (např. thiomocoviny nebo formamidu). Pro výpočet mrtvé doby t_0 s použitím homologické řady se nastříkne sada alespoň sedmi členů homologické řady a stanoví se příslušné retenční časy. Neupravené retenční časy $t_r(n_c + 1)$ se vynesou jako funkce $t_r(n_c)$ a stanoví se absolutní člen a a směrnice b regresní rovnice:

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

(n_c = počet atomů uhlíku). Mrtvá doba t_0 je dána vztahem:

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

▼ B*Kalibrační křivka*

Následujícím krokem je sestrojení korelační závislosti hodnot $\log k$ na $\log P$ pro příslušné referenční sloučeniny. V praxi se současně nastříkne soubor 5 až 10 standardních referenčních sloučenin, jejichž $\log P$ leží v očekávané oblasti, a stanoví se retenční časy, nejlépe zapisovacím integrátořem napojeným na detekční systém. Vypočtou se příslušné logaritmy kapacitních faktorů, $\log k$, a vynesou se jako funkce hodnot $\log P$ stanovených metodou třepací lahve. Kalibrace se provádí v pravidelných intervalech nejméně jednou denně, aby bylo možné zohlednit případné změny činnosti kolony.

Stanovení kapacitního faktoru zkoušené látky

Zkoušená látka se nastříkne v co nejmenším množství mobilní fáze. Stanoví se retenční čas (dvakrát), umožňující výpočet kapacitního faktoru k . Z korelační křivky referenčních sloučenin je možné interpolací získat rozdělovací koeficient zkoušené látky. U velmi nízkých a velmi vysokých rozdělovacích koeficientů je nutná extrapolace. V těchto případech je nutno věnovat zvláštní pozornost intervalům spolehlivosti regresní křivky.

2. **DATA***Metoda třepací lahve*

Spolehlivost stanovených hodnot P je možné prověřit srovnáním středních hodnot z opakovaných stanovení s celkovou střední hodnotou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty)
- nejsou-li metody použitelné (např. u povrchově aktivní látky), měla by být uvedena vypočtená hodnota nebo odhad založený na individuálních rozpustnostech látky v n -oktanolu a ve vodě,
- všechny informace a poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, zvláště s ohledem na nečistoty a fyzikální stav látky.

Pro metodu třepací lahve:

- výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,
- teplotu stanovení,
- údaje o analytických postupech použitých ke stanovení koncentrací,
- dobu a rychlost odstředování, pokud se použilo,

▼ B

- koncentrace naměřené při každém stanovení v obou fázích (tzn. uvede se celkem 12 koncentrací),
- hmotnost zkoušené látky, objem každé fáze použité v každé zkušební nádobě a vypočtené celkové množství zkoušené látky, obsažené v jednotlivých fázích po dosažení rovnováhy,
- vypočtené hodnoty rozdělovacího koeficientu (P) a střední hodnotu je nutné uvést pro každý soubor zkušebních podmínek, stejně tak střední hodnotu ze všech stanovení. Pokud existují náznaky závislosti rozdělovacího koeficientu na koncentraci, mělo by to být uvedeno ve zprávě,
- měla by být uvedena směrodatná odchylka jednotlivých hodnot P od střední hodnoty,
- měl by být také uveden dekadický logaritmus střední hodnoty P ze všech stanovení,
- vypočtená teoretická hodnota P_{ow} byla-li stanovena nebo je-li naměřená hodnota $> 10^4$,
- pH použité vody a vodné fáze během experimentu,
- pokud byly použity pufry, zdůvodnění jejich použití místo vody, jejich složení, koncentrace a pH, pH vodné fáze před a po experimentu.

Pro metodu HPLC:

- výsledek předběžného odhadu, pokud existuje,
- zkoušená látka a referenční látky, jejich čistota,
- teplotní rozmezí při stanoveních,
- pH, při kterém se prováděla stanovení,
- podrobnosti o analytické a ochranné koloně, o mobilní fázi a o způsobu detekce
- retenční data a hodnoty $\log P$ z literatury pro referenční sloučeniny použité ke kalibraci,
- podrobnosti o proložené regresní přímce ($\log k$ versus $\log P$),
- průměrná retenční data a interpolovaná hodnota $\log P$ pro zkušební sloučeninu,
- popis zařízení a pracovních podmínek,
- eluční křivky,
- množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,
- mrtvý čas a způsob jeho měření.

▼B4. **LITERATURA**

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 107, rozhodnutí Rady C (81) 30 v konečném znění.
- 2) C. Hansch and A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York 1979.
- 3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman, A.J. Leo, dir.) -Available from Pomona College Medical Chemistry Project 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.
- 4) L. Renberg, G. Sundström and K. Sundh-Nygård, Chemosphere, 1980, vol. 80, 683.
- 5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 219 (1981).
- 6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.
- 7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.
- 8) J.E. Haky and A.M. Young, J. Liq. Chromat, 1984, vol. 7, 675.
- 9) S. Fujisawa and E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.
- 10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumspraxis (edited by E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223–339.
- 11) R.F. Rekker and H.M. de Kort, Euro. J. Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.
- 12) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- 13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Elsevier, Amsterdam, 1977.
- 14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use – Determination of partition coefficient – Flask shaking method.
- 15) C.V. Eadsforth and P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.
- 16) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- 17) C. Hansch, A. Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani and E. J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1207.
- 18) W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1113.
- 19) D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual, 1981, vol. 10, 382.
- 20) J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

- 21) R. Franke, *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam 1984,
- 22) Y.C. Martin, *Quantitative Drug Design*, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.
- 23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; *J. Med. Chem.*, 1976, vol. 19, 615.

▼ B*Doplněk 1***Metody výpočtu nebo odhadu****ÚVOD**

Obecný úvod do výpočtových metod, data a příklady jsou uvedeny v příručce Handbook of Chemical Property Estimation Methods (a).

Vypočtené hodnoty $P_{o/v}$ lze použít:

- k rozhodnutí, která z experimentálních metod je vhodná (rozsah u třepací lahve: $\log P_{o/v}$: -2 až 4, rozsah u HPLC: $\log P_{o/v}$: 0 až 6),
- k volbě vhodných zkušebních podmínek (např. referenčních látek pro postupy HPLC, poměr objemů n-oktanol/voda pro metodu třepací lahve),
- jako vnitřní laboratorní kontrolu možných experimentálních chyb,
- k získání odhadu $P_{o/v}$ případech, kdy zkušební metody nelze z technických důvodů použít.

METODA ODHADU*Předběžný odhad rozdělovacího koeficientu*

Hodnotu rozdělovacího koeficientu je možné odhadnout s použitím rozpustnosti zkoušené látky v čistých rozpouštědlech:

$$P_{\text{odhad}} = \frac{\text{nasycení}_{\text{oktan-1-ol}}}{\text{nasycení}_{\text{voda}}}$$

VÝPOČTOVÉ METODY*Podstata výpočtových metod*

Všechny výpočtové metody jsou založeny na formálním dělení molekul do vhodných podstruktur, pro něž jsou známy spolehlivé hodnoty přírůstků $\log P_{o/v}$. Hodnota $\log P_{o/v}$ celé molekuly se poté vypočte jako součet hodnot pro příslušné fragmenty plus součet korekčních členů pro intramolekulární interakce.

Existují seznamy konstant fragmentů a korekčních členů (b, c, d, e). Některé se pravidelně aktualizují (b).

Kritéria jakosti

Spolehlivost výpočtové metody obecně klesá s rostoucí složitostí zkoumané sloučeniny. V případě jednoduchých molekul s nízkou molekulovou hmotností a jednou nebo dvěma funkčními skupinami lze očekávat, že odchylky hodnot $\log P_{o/v}$ získaných různými fragmentačními metodami od naměřené hodnoty budou v rozmezí od 0,1 do 0,3. U složitějších molekul může být rozpětí chyby větší. Závisí to na spolehlivosti a dostupnosti konstant pro fragmenty a rovněž na schopnosti zjistit intramolekulární interakce (např. vodíkové vazby) a na správném používání korekčních členů (což není obtížné při použití počítačového programu CLOGP-3) (b). V případě disociujících látek je důležité správně zohlednit náboj nebo stupeň disociace.

▼ B**Postupy výpočtu***Hanschova π -metoda*

Původní konstanta hydrofobnosti substituentu n , zavedená Fujitou et al. (f) je definována jako

$$\pi_x = \log P_{o/v}(\text{PhX}) - \log P_{o/v}(\text{PhH})$$

kde $P_{o/v}(\text{PhX})$ je rozdělovací koeficient aromatického derivátu a $P_{o/v}(\text{PhH})$ rozdělovací koeficient výchozí sloučeniny

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

rozdělovací koeficient výchozí sloučeniny Z e své definice je π -metoda použitelná především u aromatických substituentů. Hodnoty π byly pro velký počet substituentů uspořádány do tabulek (b, c, d). Používají se k výpočtu $\log P_{o/v}$ aromatických molekul nebo substruktur.

Rekkerova metoda

Podle Rekkera (g) se hodnota $\log P_{o/v}$ vypočte takto:

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

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů a a_i četnost jejich výskytu ve vyšetřované molekule. Korekční členy je možné vyjádřit jako souhrnný násobek jediné konstanty C_m (tzv. „magické konstanty“). Konstanty pro molekulární fragmenty f_i a C_m byly stanoveny ze seznamu 1 054 experimentálních hodnot $P_{o/v}$ (pro 825 sloučenin) pomocí vícenásobné regresní analýzy (c, h). Interakční členy se určí podle stanovených pravidel popsanych v literatuře (e, h, i).

Hanschova-Leova metoda

Podle Hansche a Lea (c) se hodnota $\log P_{o/v}$ vypočte z výrazu:

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

kde f_i představuje konstanty různých molekulárních fragmentů, F_j korekční členy a_i , b_j odpovídající četnosti výskytů. Na základě experimentálních hodnot $P_{o/v}$ byl pokusně sestaven seznam hodnot pro atomové a skupinové fragmenty a seznam korekčních členů F_j (tzv. „faktorů“). Korekční členy byly seříděny do několika různých tříd (a, c). Zohlednění všech pravidel a korekčních členů je poměrně složité a časově náročné. Byly vyvinuty sady softwaru (b).

Kombinovaná metoda

Výpočet $\log P_{o/v}$ složitých molekul lze značně zdokonalit, jestliže se molekula rozdělí do větších podstruktur, pro něž existují spolehlivé hodnoty pocházející buď z tabulek (b, c), nebo z vlastních měření. Tyto fragmenty (např. heterocykly, antrachinon, azobenzen) lze poté kombinovat s Hanschovými π -hodnotami nebo s Rekkerovými nebo Leovými konstantami pro fragmenty.

Poznámky

- i) Výpočetní metody lze použít pro částečně nebo úplně disociované sloučeniny pouze tehdy, lze-li vzít v úvahu nezbytné korekční faktory.

▼B

- ii) Pokud lze předpokládat přítomnost intramolekulárních vodíkových vazeb, je nutné přičíst odpovídající korekční členy (přibližně 0,6 až 1,0 logaritmu hodnot $P_{o/w}$) (a). O přítomnosti těchto vazeb lze usuzovat z prostorových modelů nebo ze spektroskopických dat molekuly.
- iii) Může-li existovat několik tautomerních forem, měla by být jako základ pro výpočet použita nejpravděpodobnější forma.
- iv) Pečlivě by měly být sledovány přepracované seznamy konstant fragmentů.

Protokol o zkoušce

Při použití výpočtové metody nebo metody odhadu by měl protokol o zkoušce pokud možno obsahovat tyto údaje:

- popis látky (směs, nečistoty atd.),
- známky přítomnosti intramolekulárních vodíkových vazeb, disociace, nábojů a dalších neobvyklých efektů (např. tautomerie),
- popis výpočtové metody,
- označení nebo uvedení databáze,
- zvláštnosti při volbě fragmentů,
- vyčerpávající dokumentaci výpočtů.

LITERATURA

- a) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York, 1983.
- b) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York, 1979.
- d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.
- e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. -Chill. Ther. 1979, vol. 14, 479.
- f) T. Fujita, J. Iwasa and C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175.
- g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, 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.

▼B

Doplňk 2

Doporučené referenční látky pro metodu HPLC

Číslo	referenční látka	log P _{ow}	pKa
1	butan2on	0,3	
2	4acetylpyridin	0,5	
3	anilin	0,9	
4	acetanilid	1,0	
5	benzylalkohol	1,1	
6	4-methoxyfenol	1,3	pKa = 10,26
7	kyselina fenoxyoctová	1,4	pKa = 3,12
8	fenol	1,5	pKa = 9,92
9	2,4dinitrofenol	1,5	pKa = 3,96
10	benzonitril	1,6	
11	fenylacetonitril	1,6	
12	4methylbenzylalkohol	1,6	
13	acetofenon	1,7	
14	2nitrofenol	1,8	pKa = 7,17
15	kyselina 3nitrobenzoová	1,8	pKa = 3,47
16	4chloranilin	1,8	pKa = 4,15
17	nitroben	1,9	
18	3fenylpropan2ol	1,9	
19	kyselina benzoová	1,9	pKa = 4,19
20	pkresol	1,9	pKa = 10,17
21	kyselina skořicová	2,1	pKa = 3,89 cis 4,44 trans
22	anisol	2,1	
23	methylbenzoát	2,1	
24	benzen	2,1	
25	kyselina 3methylbenzoová	2,4	pKa = 4,27
26	4chlorfenol	2,4	pKa = 9,1
27	trichlorethylen	2,4	
28	atrazin	2,6	
29	ethylbenzoát	2,6	
30	2,6dichlorbenzonitril	2,6	
31	kyselina 3chlorbenzoová	2,7	pKa = 3,82
32	toluen	2,7	
33	naftalenol	2,7	pKa = 9,34
34	2,3dichloranilin	2,8	
35	chlorbenzen	2,8	
36	allylfenylether	2,9	
37	brombenzen	3,0	

▼ B

Číslo	referenční látka	log P _{ow}	pKa
38	ethylbenzen	3,2	
39	benzofenon	3,2	
40	4fenylfenol	3,2	pKa = 9,54
41	thymol	3,3	
42	1,4dichlorbenzen	3,4	
43	difenylamin	3,4	pKa = 0,79
44	naftalen	3,6	
45	fenylbenzoát	3,6	
46	isopropylbenzen	3,7	
47	2,4,6trichlorfenol	3,7	pKa = 6
48	bifenylyl	4,0	
49	benzylbenzoát	4,0	
50	2,4dinitro6selebutylfenol	4,1	
51	1,2,4trichlorbenzen	4,2	
52	kyselina dodekanová	4,2	
53	difenyylether	4,2	
54	nbutylbenzen	4,5	
55	fenanthren	4,5	
56	fluoranthren	4,7	
57	dibenzyl	4,8	
58	2,6difenylpyridin	4,9	
59	trifenylamin	5,7	
60	DDT	6,2	
Jiné referenční látky s nízkou hodnotou log P _{ow}			
1	kyselina nikotinová	-0,7	

▼B**A.9 BOD VZPLANUTÍ****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o hořlavosti látky. Zkušební postup je použitelný pro kapaliny, jejichž páry lze zapálit zdroji zapálení. Zkušební metody uvedené v tomto textu jsou spolehlivé pouze v rozsahu bodu vzplanutí, který je specifikován v jednotlivých metodách.

Při výběru metody, která má být použita, by mělo být zvaženo, zda nemůže dojít k chemickým reakcím mezi látkou a zkušebním kelímkem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod vzplanutí je nejnižší teplota přepočtená k tlaku 101,325 kPa, při které kapalina uvolňuje za podmínek definovaných ve zkušební metodě páry v takovém množství, že se z nich ve zkušební nádobce vytvoří hořlavá směs se vzduchem.

Jednotky teploty: °C

$$t = T - 273,15$$

(t je ve °C a T je v K)

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se vpraví do zkušební nádoby, ve které je zahřívána nebo chlazena na zkušební teplotu podle postupu popsaného v dané zkušební metodě. Zkoušky vzplanutí se provádějí za účelem zjištění, zda vzorek vzplane či nevzplane při zkušební teplotě.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI**1.5.1 Opakovatelnost**

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodu vzplanutí a použité zkušební metodě; maximální tolerance je 2 °C.

1.5.2 Citlivost

Citlivost závisí na použité zkušební metodě.

1.5.3 Specifičnost

Specifičnost některých metod je omezena na určitý rozsah bodu vzplanutí a závisí na vlastnostech látky (např. na vysoké viskozitě).

▼ B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**

Vzorek zkoušené látky se vloží do zkušebního zařízení podle bodů 1.6.3.1 a/nebo 1.6.3.2.

Kvůli bezpečnosti se doporučuje, aby byla v případě toxických látek nebo látek s vysokým energetickým potenciálem použita metoda, při níž se pracuje s malým množstvím vzorku, přibližně 2 cm.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Je-li to v souladu s podmínkami bezpečnosti, umístí se zkušební zařízení na místo, kde nedochází k nadměrnému proudění vzduchu.

1.6.3 **Provedení zkoušky**1.6.3.1 *Rovnovážná metoda*

Viz ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2 *Nerovnovážná metoda*

Zkušební zařízení podle Abela:

Viz BS 2000 – část 170, NF M07-011, NF T66-009.

Zkušební zařízení podle Abela-Penskyho:

Viz EN 57, DIN 51755 – část 1 (pro teploty od 5 do 65 °C), DIN 51755 – část 2 (pro teploty pod 5 °C), NF M07-036.

Zkušební zařízení TAG:

Viz ASTM D 56.

Zkušební zařízení podle Penskyho-Martense:

Viz ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 a NF M 07-019.

Poznámky:

Pokud se hodnota bodu vzplanutí stanovená nerovnovážnou metodou podle bodu 1.6.3.2 nachází v rozmezí 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C nebo 55 ± 2 °C, měla by být potvrzena rovnovážnou metodou pomocí stejného zkušebního zařízení.

Pro oznámení mohou být použity pouze ty metody, kterými lze bod vzplanutí stanovit.

Ke stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin obsahujících rozpouštědla (barvy, lepidla apod.) mohou být použity pouze zkušební zařízení a zkušební metody vhodné pro stanovení bodu vzplanutí viskózních kapalin.

Viz ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 a DIN 53213 – část 1.

▼B

2. **DATA**

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),
- odkaz na použitou metodu a na všechny případné odchylky,
- výsledky a všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

Není uvedena.

▼B**A.10 HOŘLAVOST (PEVNÉ LÁTKY)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Před provedením této zkoušky je vhodné mít k dispozici předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška by měla být použita pouze pro práškové, zrnité nebo pastovité látky.

Aby se mezi vysoce hořlavé látky nezahrnovaly všechny látky, které lze zapálit, nýbrž pouze ty, které hoří rychle nebo jejichž chování je při hoření nějakým způsobem zvláště nebezpečné, jsou za vysoce hořlavé považovány jen ty látky, u nichž rychlost hoření překročí určitou mezní hodnotu.

Zvláště nebezpečné může být hoření doutnáním, šíří-li se kovovým prachem, a to pro jeho obtížné hašení. Kovové prachy se považují za vysoce hořlavé, pokud podporují šíření doutnáním celou hmotou za specifikovanou dobu.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření se vyjadřuje v sekundách.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Látka se zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm a provede se předběžná screeningová zkouška s cílem stanovit, zda nastane po zapálení plamenem plynového hořáku šíření plamenem nebo doutnáním. Pokud se hoření za předepsanou dobu rozšíří na více než 200 mm délky prachové housenky, provede se úplná zkouška pro stanovení rychlosti hoření.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

▼B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Předběžná screeningová zkouška**

Látka se na nehořlavé, neporézní a málo tepelně vodivé podkladové desce zformuje do tvaru neporušeného pásku nebo prachové housenky o délce přibližně 250 mm, šířce 20 mm a výšce 10 mm. Na jeden konec prachové housenky se působí plamenem plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm), dokud se prach nevznítí, nebo maximálně 2 minuty (5 minut u prachů kovů nebo kovových slitin). Zjišťuje se, zda se hoření rozšíří na 200 mm délky prachové housenky v průběhu zkušební doby 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů). Jestliže se látka nevznítí a hoření se buď plamenem, nebo doutnáním nerozšíří na 200 mm délky prachové housenky do zkušební doby 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů), nepovažuje se látka za vysoce hořlavou a další zkouška se nepožaduje. Jestliže se látka zapálí a hoření se rozšíří plamenem na 200 mm délky prachové housenky za zkušební dobu méně než 4 minuty (nebo 40 minut u kovových prachů), provede se postup uvedený níže (bod 1.6.2 dále).

1.6.2 **Zkouška rychlosti hoření**1.6.2.1 *Příprava*

Práškovité nebo zrnité látky se volně nasypou do formy s trojúhelníkovým příčným průřezem o délce 250 mm o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní 2 kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnivají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se poté třikrát spustí z výšky 2 cm na pevný povrch. Podle potřeby se forma doplní. Bočnice se sejmou a přebytek látky se seškrábne. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma se odstraní.

Pastovité látky se rozetřou na nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou desku do tvaru provazce o délce 250 mm a příčném průřezu přibližně 1 cm.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

V případě látky, která je citlivá na vlhkost, se zkouška provede co nejrychleji po vyjmutí látky z nádoby.

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Zformovaný vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení se postaví ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

K zapálení zformovaného zkoušeného vzorku na jeho jednom konci se použije plamen plynového hořáku o průměru minimálně 5 mm. Po vyhoření 80 mm délky zformovaného zkoušeného vzorku se měří rychlost hoření na dalších 100 mm.

▼B

Zkouška se provede šestkrát, vždy s pomocí čisté a vychladlé desky, pokud není pozorován pozitivní výsledek dříve.

2. DATA

Pro vyhodnocení jsou důležité doba hoření z předběžné screeningové zkoušky (1.6.1) a nejkratší doba hoření ze šesti zkoušek (1.6.2.3).

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),
- popis zkoušené látky, její fyzikální stav, včetně obsahu vlhkosti,
- výsledky předběžné screeningové zkoušky a zkoušky rychlosti hoření, je-li provedena,
- všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

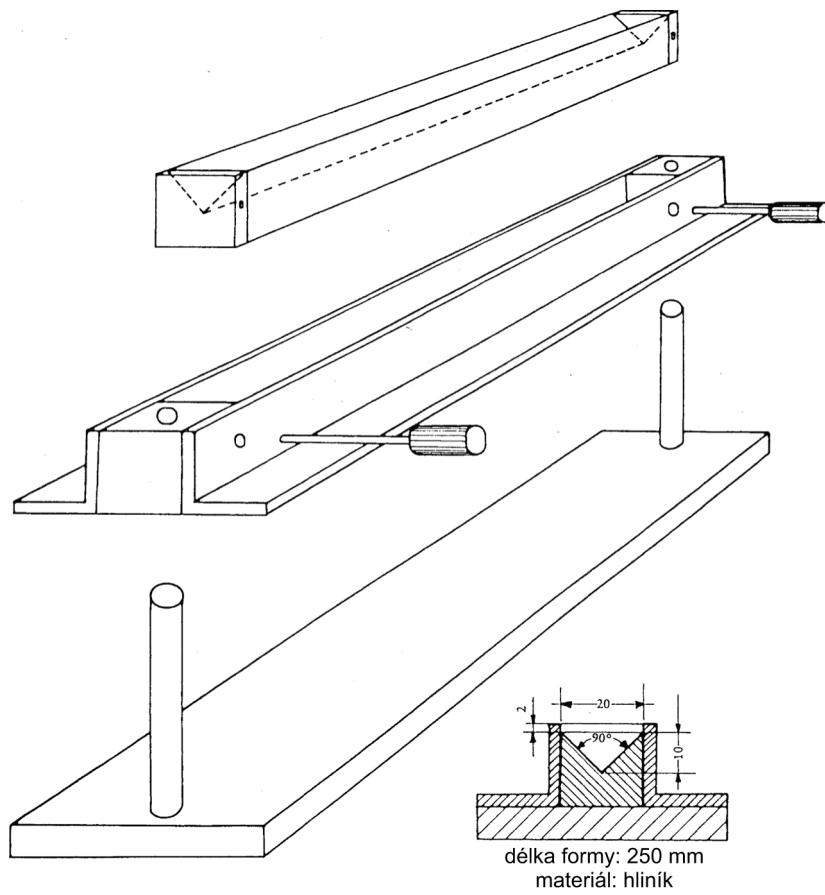
Práškovité, zrnité nebo pastovité látky se považují za vysoce hořlavé, je-li doba hoření v každé zkoušce provedené podle zkušebního postupu popsaného v bodě 1.6.2 menší než 45 sekund. Prach kovů nebo kovových slitin se považuje za vysoce hořlavý, pokud jej lze zapálit a plamen nebo reakční zóna se rozšíří po celém zkoušeném vzorku za 10 minut nebo za kratší dobu.

4. LITERATURA

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

▼B*Doplňěk**Obrázek***Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku**

(Všechny rozměry jsou v milimetrech)



▼ B**A.11 HOŘLAVOST PLYNŮ****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Tato metoda umožňuje stanovit, zda jsou plyny ve směsi se vzduchem při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) a atmosférickém tlaku hořlavé, a jsou-li hořlavé, v jakém rozmezí koncentrací. Směsi se vzduchem, u nichž se postupně zvyšuje koncentrace zkušební plynu, jsou zapalovány elektrickou jiskrou a sleduje se, zda dojde k zapálení.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Oblast hořlavosti je rozpětí koncentrace mezi dolní a horní mezí výbušnosti. Dolní a horní meze výbušnosti jsou takové mezní koncentrace hořlavého plynu ve směsi se vzduchem, za nimiž nedojde k šíření plamene.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Koncentrace plynu ve vzduchu je postupně zvyšována a v každém stupni se směs zapaluje elektrickou jiskrou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY**1.6.1 Aparatura**

Zkušební nádobu tvoří svislý skleněný válec s vnitřním průměrem nejméně 50 mm a výškou nejméně 300 mm. Zapalovací elektrody jsou od sebe vzdáleny 3 až 5 mm a jsou umístěny ve výšce 60 mm nad dnem válce. Válec je opatřen přetlakovou bezpečnostní pojistkou. Aparatura musí být opatřena krytem, aby se zamezilo jakémukoli poškození výbuchem.

Jako zdroj zapálení se používá statický indukční výboj trvající 0,5 sekundy generovaný vysokonapětovým transformátorem o výstupním napětí od 10 kV do 15 kV (maximální příkon je 300 W). Příklad vhodné aparatury je popsán v literatuře (2).

1.6.2 Zkušební podmínky

Zkouška musí být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

▼ B**1.6.3 Provedení zkoušky**

Pomocí dávkovacích čerpadel se do skleněného válce vhná směs plynu se vzduchem o známé koncentraci. Vyvolá se jiskra a sleduje se, zda se plamen oddělí od zdroje zapálení a zda se samovolně šíří. Koncentrace plynu se postupně zvyšuje o 1 %, dokud nedojde k výše popsanému zapálení.

Jestliže z chemické struktury plynu vyplývá, že by mohl být nehořlavý, a lze-li vypočítat stechiometrické složení směsi se vzduchem, postačuje zkoušet směsi pouze v rozmezí od koncentrace o 10 % nižší, než je stechiometrické složení, do koncentrace o 10 % vyšší, než je stechiometrické složení, a to postupně po 1 %.

2. DATA

Výskyt šíření plamene je jediná relevantní informace pro stanovení této vlastnosti.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),
- popis použité aparatury s rozměry,
- teplota, při které byla zkouška provedena,
- zkušební koncentrace a získané výsledky,
- výsledek zkoušky: nehořlavý plyn nebo vysoce hořlavý plyn,
- jestliže byl učiněn závěr, že je plyn nehořlavý, uvede se koncentrační rozpětí, které bylo zkoušeno v krocích po 1 %,
- musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků.

4. LITERATURA

- 1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.
- 2) W.Berthold, D.Conrad, T.Grewer, H.Grosse- einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen'. Chem.-Ing.-Tech. 1984, vol. 56, 2, 126–127. Wortmann, T.Redeker und H.Schacke. 'Entwicklung.

▼B**A.12 HOŘLAVOST (PŘI STYKU S VODOU)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Tuto zkušební metodu lze použít pro zjištění, zda reakce látky s vodou nebo vzdušnou vlhkostí vede k vývinu nebezpečného množství plynu nebo plynů, které mohou být vysoce hořlavé.

Tuto zkušební metodu lze použít pro pevné látky a pro kapaliny. Nelze ji použít pro látky, které se spontánně vznítí ve styku se vzduchem.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Vysoce hořlavé látky: látky, které při kontaktu s vodou nebo vzdušnou vlhkostí uvolňují vysoce hořlavé plyny v nebezpečném množství rychlostí nejméně 1 litr na kg látky za hodinu.

1.3 PODSTATA METODY

Látka je zkoušena postupně, jak je uvedeno níže; dojde-li v některém stupni ke vznícení, není další zkoušení potřebné. Je-li známo, že látka s vodou nereaguje prudce, pokračuje se čtvrtým stupněm (bod 1.3.4).

1.3.1 Stupeň 1

Zkoušená látka se vnese do vaničky s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.2 Stupeň 2

Zkoušená látka se položí na filtrační papír plovoucí v misce s destilovanou vodou o teplotě 20 °C na vodní hladině a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli. Filtrační papír slouží pouze k tomu, aby byla látka položena na jedno místo a tím se zvýšila možnost vznícení.

1.3.3 Stupeň 3

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm. Přidá se do ní několik kapek vody a sleduje se, zda se uvolňovaný plyn vznítí, či nikoli.

1.3.4 Stupeň 4

Zkoušená látka se smíchá s destilovanou vodou o teplotě 20 °C a v jednohodinových intervalech se měří rychlost vývinu plynu po dobu 7 hodin. Je-li po sedmi hodinách rychlost vývinu plynu nepravidelná nebo narůstá, doba měření by se měla prodloužit na maximálně pět dnů. Zkoušku lze přerušit, jestliže rychlost vývinu plynu v průběhu měření převyší 1 litr na kg látky za hodinu.

▼ B

1.4 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METOD

1.6.1 **Stupeň 1**1.6.1.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.1.2 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se vnese do misky s destilovanou vodou. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.2 **Stupeň 2**1.6.2.1 *Aparatura*

Ve vhodné nádobě, např. v odpařovací misce o průměru přibližně 100 mm se na hladinu destilované vody umístí filtrační papír.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.2.3 *Provedení zkoušky*

Malé množství zkoušené látky (přibližně o průměru 2 mm) se umístí do středu filtračního papíru. Sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

1.6.3 **Stupeň 3**1.6.3.1 *Zkušební podmínky*

Zkouška se provede při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C).

1.6.3.2 *Provedení zkoušky*

Zkoušená látka se zformuje do tvaru hranice o výšce přibližně 2 cm a průměru 3 cm s jamkou v horní části. Do jamky se přidá několik kapek vody a sleduje se, i) zda se uvolňuje nějaký plyn a ii) zda dojde k jeho vznícení. Dojde-li ke vznícení, nejsou další zkoušky potřebné, neboť látka je považována za nebezpečnou.

▼ B1.6.4 **Stupeň 4**1.6.4.1 *Aparatura*

Aparatura se sestaví způsobem uvedeným na obrázku.

1.6.4.2 *Zkušební podmínky*

Nádoba se zkoušenou látkou se prohlédne, zda neobsahuje prach o velikosti částic < 500 um. Tvoří-li prach více než 1 % hmot. celkového množství nebo drobí-li se vzorek, veškerá látka se před zkoušením rozemele na prach, aby se zmenšila velikost částic během skladování a manipulace; v opačném případě se látka zkouší v původním stavu. Zkouška by měla být provedena při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) a atmosférickém tlaku.

1.6.4.3 *Provedení zkoušky*

Přikapávací nálevka aparatury se naplní 10 až 20 ml vody a do Erlenmeyerovy baňky se vpraví 10 g látky. Objem uvolňovaného plynu se měří jakýmkoli vhodným způsobem. Kohout přikapávací nálevky se otevře, aby voda natekla do Erlenmeyerovy baňky, a současně se spustí stopky. Objem vzniklého plynu se měří každou hodinu po dobu sedmi hodin. Je-li vývin plynu během této doby nepravidelný nebo narůstá-li na konci této doby rychlost vývinu, prodlouží se doba měření na maximálně pět dnů. Překročí-li rychlost vývinu plynu v průběhu měření 1 litr na kg látky za hodinu, může být zkouška přerušena. Zkouška se provede třikrát.

Není-li chemická identifikace plynu známa, měl by být analyzován. Obsahuje-li plyn vysoce hořlavé složky a není-li známo, zda není celá směs vysoce hořlavá, připraví se směs stejného složení a provede se zkouška podle metody A.11.

2. **DATA**

Látka se považuje za nebezpečnou, jestliže:

— na kterémkoli stupni zkušebního postupu dojde k jejímu samovolnému vznícení,

nebo

— dojde-li k vývinu hořlavého plynu rychlostí vyšší než 1 litr na kg látky za hodinu.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),

— podrobnosti o jakékoli počáteční přípravě látky,

▼B

- výsledky zkoušek (stupně 1, 2, 3 a 4),
- chemická identifikace uvolňovaného plynu,
- rychlost vývinu plynu, pokud se provádí stupeň 4 (1.6.4),
- všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. LITERATURA

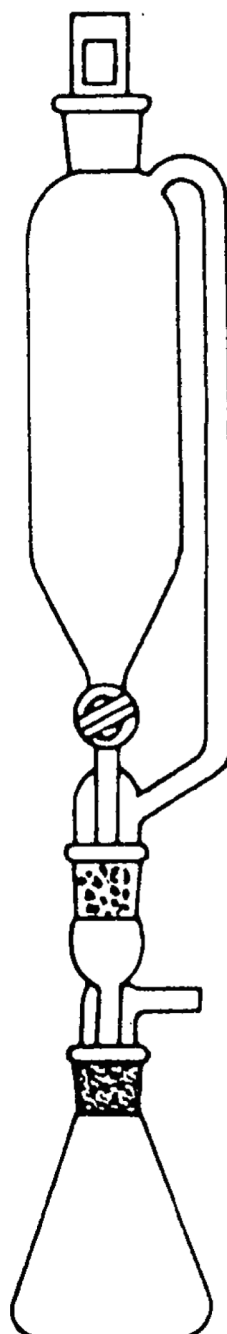
- 1) Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
- 2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼ B

Doplňěk

Obrázek

Aparatura



▼B**A.13 PYROFORICKÉ VLASTNOSTI PEVNÝCH LÁTEK A KAPALIN****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Zkušební postup je použitelný pro pevné látky nebo kapaliny, které se již v malých množstvích samovolně vznítí krátce poté, co při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) přijdou do styku se vzduchem.

Tato metoda se nevztahuje na látky, které se na vzduchu při laboratorní teplotě nebo při zvýšené teplotě vznítí teprve po několika hodinách nebo dnech.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Látky mají pyroforické vlastnosti, pokud se samovolně vznítí nebo vykazují zuhelnatění za podmínek, které jsou popsány v bodě 1.6.

Může být nezbytné provést zkoušku teploty samozápalu podle metody A.15. Bod samozápalu (kapaliny a plyny).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou specifikovány.

1.4 PODSTATA METODY

Pevná nebo kapalná látka se nanese na inertní nosič a uvede se při teplotě okolí na dobu pěti minut do styku se vzduchem. Pokud se kapaliny nevznítí, jsou absorbovány do filtračního papíru a vystaví se působení vzduchu po dobu pěti minut při teplotě okolí (přibližně 20 °C). Pokud se pevná látka nebo kapalina vznítí nebo pokud kapalina zapálí či zuhelnatí filtrační papír, považuje se za pyroforickou.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost: vzhledem k závažnosti z hlediska bezpečnosti stačí jediný pozitivní výsledek k tomu, aby byla látka považována za pyroforickou.

1.6 POPIS METODY**1.6.1 Aparatura**

Porcelánový kelímek o průměru přibližně 10 cm se při laboratorní teplotě (přibližně 20 °C) naplní do výšky asi 5 mm infuzoriovou hlinkou.

Poznámka:

Infuzoriová hlínka nebo jiná srovnatelná běžně dosažitelná inertní látka se považuje za reprezentativní materiál pro zeminu, do které může zkoušená látka proniknout v případě havárie.

Pro zkoušení kapalin, které se při kontaktu se vzduchem na inertním nosiči samovolně nevznítí, se požaduje suchý filtrační papír.

▼B1.6.2 **Provedení zkoušky**a) *Práškovité pevné látky*

1 až 2 cm³ práškovité látky, která má být zkoušena, se sype z výšky přibližně 1 m na nehořlavý povrch a sleduje se, zda se látka při pádu nebo v průběhu dalších pěti minut po dopadu vznítí.

Zkouška se provede šestkrát, pokud ke vznícení nedojde dříve.

b) *Kapaliny*

Přibližně 5 cm³ kapaliny, která má být zkoušena, se nalije do připraveného porcelánového kelímku a sleduje se, zda se v průběhu pěti minut vznítí.

Pokud při šesti zkouškách nedojde ke vznícení, provede se tato zkouška:

0,5 ml zkoušeného vzorku se vpraví pomocí injekční stříkačky na zprohýbaný filtrační papír a sleduje se, zda do 5 minut od přidání kapaliny dojde ke vznícení nebo zuhelnatění filtračního papíru. Zkouška se provede třikrát, nedojde-li ke vznícení nebo zuhelnatění dříve.

2. **DATA**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Zkoušky lze přerušit, jakmile je dosaženo pozitivního výsledku v kterékoli zkoušce.

2.2 VYHODNOCENÍ

Jestliže se látka v průběhu 5 minut po nanesení na inertní nosič a vystavení působení vzduchu vznítí nebo pokud kapalná látka zuhelnatí či zapálí filtrační papír do pěti minut po nanesení a vystavení vzduchu, považuje se za pyroforickou.

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),
- výsledky zkoušek,
- všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. **LITERATURA**

- 1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.
- 2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼ B**A.14 VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Tato metoda umožňuje stanovit, zda u pevné nebo pastovité látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene (citlivost na působení tepla), nárazu nebo tření (citlivost na mechanické podněty), a zda u kapalně látky existuje nebezpečí výbuchu, je-li podrobena působení plamene nebo nárazu.

Metoda sestává ze tří částí:

- a) zkouška citlivosti na působení tepla (1);
- b) zkouška mechanické citlivosti na náraz (1);
- c) zkouška mechanické citlivosti na tření (1).

Metoda poskytuje data pro stanovení pravděpodobnosti vyvolání výbuchu určitými běžnými podněty. Metoda neslouží ke zjištění, zda je látka schopna vybuchnout za jakýchkoli podmínek.

Metoda je vhodná pro zjištění, zda u látky existuje nebezpečí výbuchu (citlivost na působení tepla a mechanická citlivost) za určitých podmínek specifikovaných ve směrnici. Je založena na řadě typů zařízení, která jsou široce používána v mezinárodním měřítku (1) a která obvykle poskytují vypovídající výsledky. Připouští se, že tato metoda není definitivní. Lze použít jiné než specifikované zařízení, za předpokladu, že je mezinárodně uznané a že lze výsledky vhodným způsobem srovnat s výsledky poskytnutými specifikovaným zařízením.

Zkouška nemusí být provedena, jestliže z dostupných termodynamických informací (např. ze slučovacího tepla nebo disociačního tepla) a/nebo z nepřítomnosti určitých reakčních skupin (2) ve struktuře s jistotou vyplývá, že látka nemá schopnost rychle se rozkládat za vývoje plynů nebo za uvolňování tepla (tzn. materiál nepředstavuje žádné riziko výbuchu). Zkouška mechanické citlivosti na tření se nevyžaduje u kapalin.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Výbušná látka:

Látka, která může vybuchnout působením plamene nebo která je citlivá na náraz nebo tření ve specifikovaném zařízení (nebo je mechanicky citlivější než 1,3-dinitrobenzen v alternativním zařízení).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

1,3-dinitrobenzen, technický krystalický výrobek, prosetý na sítu o velikosti oka 0,5 mm, pro metody citlivosti na tření a na náraz.

Perhydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (označovaný jako RDX nebo hexogen nebo cyklonit – CAS 121-82-4) rekrystalizovaný z vodného cyklohexanonu, prosetý za mokra na síte 250 µm a zachycený na síte 150 µm, sušený 4 hodiny při 103 ± 2 °C pro druhou sérii zkoušek citlivosti na tření a na náraz.

▼ B1.4 **PODSTATA METODY**

Pro zjištění bezpečných podmínek pro provedení tří zkoušek citlivosti jsou nezbytné předběžné zkoušky.

1.4.1 **Zkoušky bezpečného zacházení (3)**

Z bezpečnostních důvodů se před provedením hlavních zkoušek podrobí velmi malé neuzavřené vzorky látky (přibližně 10 mg) zahřívání v plameni plynového hořáku, nárazu v jakémkoli vhodném zařízení a tření za použití paličky proti podložce nebo jiného zařízení pro zkoušení citlivosti natření. Účelem předběžných zkoušek je zjistit, zda je látka tak citlivá a výbušná, že by měly být předepsané zkoušky citlivosti, zvláště zkouška citlivosti na působení tepla, prováděny za zvláštních bezpečnostních opatření, aby nedošlo k poranění osoby provádějící zkoušky.

1.4.2 **Citlivost na působení tepla**

Metoda spočívá v zahřívání látky v ocelové trubce uzavřené clonami s různými průměry otvorů s cílem zjistit, zda může za podmínek intenzivního zahřívání a při definovaném utěsnění vybuchnout.

1.4.3 **Mechanická citlivost (na náraz)**

Metoda spočívá ve vystavení látky nárazu specifikovaným závažím puštěným ze specifikované výšky.

1.4.4 **Mechanická citlivost (na tření)**

Metoda spočívá ve vystavení pevných nebo pastovitých látek tření mezi standardními povrchy za specifikovaných podmínek zatížení a vzájemného pohybu.

1.5 **KRITÉRIA JAKOSTI**

Nejsou stanoveny.

1.6 **POPIS METODY**1.6.1 **Citlivost na působení tepla (na působení plamene)**1.6.1.1 *Zařízení*

Zařízení je tvořeno ocelovou trubkou na jedno použití s opakovaně použitelným uzavíracím zařízením (obrázek 1), instalovanou v ohřívacím a ochranném zařízení. Každá trubka je hlubokotažená z ocelového plechu (viz doplněk) a má vnitřní průměr 24 mm, délku 75 mm a tloušťku stěny 0,5 mm. Na otevřeném konci trubky je příruba sloužící k uzavření trubky sestavou clony. Sestava je tvořena clonou se středovým otvorem odolnou vůči tlaku, připevněnou k trubce pomocí dvoudílného šroubového spoje (matice a závitové příruby). Matice a závitová příruba jsou zhotoveny z chrommanganové oceli (viz doplněk), která je do 800 °C nejiskřivá. Clony mají tloušťku 6 mm, jsou vyrobeny ze žáruvzdorné oceli a tvoří řadu podle velikosti otvorů.

▼B1.6.1.2 *Zkušební podmínky*

Látka se obvykle zkouší ve stavu, v jakém byla obdržena, ačkoliv v některých případech, např. je-li lisovaná, litá nebo jiným způsobem zhutněná, může být nezbytné ji před provedením zkoušky rozdrtit.

U pevných látek se hmotnost látky, která má být použita v každé zkoušce, stanoví zkouškou ve dvou etapách. Zvážená trubka se naplní 9 cm látky a látka se po celém průřezu trubky stlačí silou 80 N. Z bezpečnostních důvodů nebo v případech, kdy může stlačováním dojít ke změně fyzikální formy vzorku, lze použít jiný způsob plnění, například je-li látka velmi citlivá na tření, není vhodné ji stlačovat. Je-li látka stlačitelná, přidá se a stlačuje další množství látky, dokud není trubka zaplněna do úrovně 55 mm od horního okraje. Stanoví se celkové množství látky použité pro naplnění do úrovně 55 mm od horního okraje a přidají se další dva podíly látky, přičemž se každý stlačí silou 80 N. Látka se poté podle potřeby buď přidá a stlačí, nebo se odebere tak, aby byla trubka naplněna do úrovně 15 mm od horního okraje. Proveďte se druhá zkouška, přičemž se začne s třetinou hmotnosti po stlačení zjištěné v první etapě. Přidají se další dva podíly, stlačí se silou 80 N a podle potřeby se látka přidá nebo odebere do úrovně 15 mm od horního okraje trubky. Množství pevné látky zjištěné ve druhé etapě se použije pro každý pokus; naplnění se provede se třemi stejnými množstvími a každé z nich se stlačí na objem 9 cm bez ohledu na potřebnou sílu (pro usnadnění lze k tomuto účelu použít rozpěrné kroužky).

Kapaliny a gely se naplní do trubky do výšky 60 mm, přičemž je třeba věnovat zvláštní pozornost gelům, aby se v nich netvořily dutiny. Na trubku se zdola navleče závitová příruba, vloží se vhodná clona a po nanesení maziva na bázi disulfidu molybděničitého se matice utáhne. Je důležité se přesvědčit, zda nějaká látka nezůstala zachycena mezi přírubou a clonou nebo v závitech.

K zahřívání se použije propan odebíraný z průmyslové tlakové lahve s regulátorem tlaku (60 až 70 mbar) přes průtokoměr a rovnoměrně rozdělený rozdělovacím potrubím do čtyř hořáků (ověří se vizuálně pozorováním plamenů hořáků). Hořáky se umístí kolem zkušební komory, jak je znázorněno na obrázku 1. Čtyři hořáky mají celkovou spotřebu přibližně asi 3,2 litru propanu za minutu. Lze použít jiné palivo a hořáky, avšak rychlost ohřevu musí být taková, jak je uvedeno na obrázku 3. Rychlost ohřevu se musí u všech zařízení pravidelně kontrolovat za použití trubek naplněných dibutylftalátem, jak je znázorněno na obrázku 3.

1.6.1.3 *Provedení zkoušek*

Každá zkouška se provádí do roztržení trubky nebo dokud doba ohřevu nedosáhne 5 minut. Výsledek zkoušky, při níž došlo k roztržení trubky na tři nebo více úlomků, z nichž některé mohou být vzájemně spojeny úzkými proužky kovu, jak je znázorněno na obrázku 2, se hodnotí jako výbuch. Výsledek zkoušky, při níž vzniklo méně úlomků nebo k roztržení nedošlo, se nehodnotí jako výbuch.

▼B

Nejprve se provede série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 6,0 mm, a pokud nedojde k výbuchu, provede se druhá série tří zkoušek s clonou o průměru otvoru 2,0 mm. Dojde-li k výbuchu u kterékoli zkušební série, nevyžadují se další zkoušky.

1.6.1.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, dojde-li k výbuchu při jedné z výše uvedených zkušebních sérií.

1.6.2 **Mechanická citlivost (na náraz)**1.6.2.1 *Zařízení (obrázek 4)*

Základními částmi typických zařízení s padacím kladivem je blok z lité oceli s podstavcem, kovadlina, sloup, vodící lišty, padací závaží, uvolňovací zařízení a držák vzorku. Ocelová kovadlina o průměru 100 mm a výšce 70 mm je přišroubována k horní straně bloku z lité oceli o délce 230 mm, šířce 250 mm a výšce 200 mm se základovou litinovou deskou o délce 450 mm, šířce 450 mm a výšce 60 mm. Sloup tvořený bezešvou taženou ocelovou trubkou je připevněn držákem přišroubovaným na zadní stranu bloku z lité oceli. Čtyři šrouby ukotvují zařízení k betonovému bloku o rozměrech 60 × 60 × 60 cm takovým způsobem, že jsou vodící lišty dokonale svislé a padací závaží padá volně. Používá se závaží o hmotnosti 5 a 10 kg z pevné oceli. Úderová hlava každého závaží je z tvrzené oceli HRC 60 až 63 a má minimální průměr 25 mm.

Zkoušený vzorek se uzavře do zkušebního zařízení tvořeného dvěma plnými sousými válci umístěnými nad sebou a vodícím pouzdrem tvořeným dutým ocelovým válcem. Plné ocelové válce o průměru 10 (−0,003, −0,005) mm a výšce 10 mm mají vyleštěné plochy, zaku-lacené hrany (s poloměrem zakřivení 0,5 mm) a tvrdost HRC 58 až 65. Dutý válec musí mít vnější průměr 16 mm, vyleštěný vyvrtaný otvor o průměru 10 (+ 0,005, + 0,010) mm a výšku 13 mm. Sesta-vené zkušební zařízení se umístí na výměnnou ocelovou mezipod-ložku (o průměru 26 mm a výšce 26 mm), která je vystředěna kroužkem s otvory pro odvod dýmů.

1.6.2.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 40 mm³ nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení. Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

- a) práškové látky se prosejí sítem (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítem;
- b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosetý podíl o velikosti částic od 0,5 do 1 mm, který by měl být reprezenta-tivní pro původní látku.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu nebo po odstranění maximálního možného množství ředidla. Kapalné látky se zkoušejí při mezeře 1 mm mezi horním a dolním ocelovým válcem.

▼B1.6.2.3 *Provedení zkoušek*

Provede se série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 10 kg z výšky 0,40 m (40 J). Dojde-li během těchto šesti zkoušek při 40 J k výbuchu, musí se provést další série šesti zkoušek spuštěním závaží o hmotnosti 5 kg z výšky 0,15 m (7,5 J). U jiných zařízení se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou up-and-down atd).

1.6.2.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (vzplanutí nebo třesk jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením nebo je-li vzorek citlivější než 1,3-dinitrobenzen nebo RDX v alternativní zkoušce citlivosti na náraz.

1.6.3 **Mechanická citlivost (na tření)**1.6.3.1 *Zařízení (obrázek 5)*

Třecí zařízení je tvořeno základovou deskou z lité oceli, na které je upevněno třecí zařízení. To je tvořeno nepohyblivým porcelánovým kolíkem a pohyblivou porcelánovou destičkou. Porcelánová destička je upevněna na saních vedených dvěma vodicími lištami. Saně jsou připojeny k elektromotoru ojnicí, excentrickou vačkou a vhodným ozubeným převodem tak, že porcelánová destička vykonává pod porcelánovým kolíkem pohyb tam a zpět na dráze o délce 10 mm. Porcelánový kolík lze zatížit silou buď 120 N, nebo 360 N.

Rovné porcelánové destičky jsou vyrobeny z bílého technického porcelánu (o drsnosti 9 až 32 um) a mají délku 25 mm, šířku 25 mm a výšku 5 mm. Válcový porcelánový kolík je rovněž vyroben z bílého technického porcelánu, má délku 15 mm, průměr 10 mm a zdrsňené kulové plochy s poloměrem zakřivení 10 mm.

1.6.3.2 *Zkušební podmínky*

Objem vzorku by měl být 10 mm³ nebo by měl být vhodný pro alternativní zařízení.

Pevné látky se zkoušejí v suchém stavu a připravují se tímto způsobem:

- a) práškové látky se prosejí sítím (o velikosti oka 0,5 mm); ke zkoušení se použije veškerý podíl, který projde sítím;
- b) lisované, lité nebo jiným způsobem zhutněné látky se rozdrtí na malé kousky a prosejí; ke zkoušení se použije prosetý podíl o velikosti částic < 0,5 mm.

Látky dodávané obvykle ve formě pasty se zkoušejí pokud možno v suchém stavu. Nelze-li látku připravit v suchém stavu, zkouší se pasta (po odstranění maximálního možného množství ředidla) ve formě proužku o tloušťce 0,5 mm, šířce 2 mm a délce 10 mm připraveného v tvarovací formě.

▼ B1.6.3.3 *Provedení zkoušek*

Porcelánový kolík se přiloží na zkoušený vzorek a zatíží se. Při provádění zkoušky musí být rýhy v porcelánové destičce orientovány příčně ke směru pohybu. Je nutné dbát na to, aby kolík spočíval na vzorku, aby pod kolíkem leželo dostatečné množství zkoušeného materiálu a také aby se destička pohybovala pod kolíkem správně. U pastovitých látek se pro nanesení látky na destičku používá měrka o tloušťce 0,5 mm s otvorem 2 × 10 mm. Porcelánová destička se musí pohybovat pod porcelánovým kolíkem po dráze 10 mm tam a zpět za 0,44 s. Každá část povrchu destičky a kolíku se smí použít pouze jednou; dva konce každého kolíku slouží pro dva pokusy a každá ze dvou stran destičky slouží pro tři pokusy.

Série šesti zkoušek se provede se zatížením 360 N. Získá-li se během těchto šesti zkoušek pozitivní výsledek, musí se provést další série šesti zkoušek se zatížením 120 N. U jiných zařízeních se vzorek porovnává se zvolenou referenční látkou za použití stanoveného postupu (např. technikou up-and-down atd).

1.6.3.4 *Hodnocení*

Výsledek zkoušky se považuje za pozitivní, jestliže dojde k výbuchu (praskání, třesk nebo vzplanutí jsou rovnocenné výbuchu) alespoň jednou při kterékoli zkoušce se specifikovaným zařízením pro stanovení citlivosti na tření nebo splňuje-li ekvivalentní kritéria alternativní zkoušky citlivosti na tření.

2. **DATA**

Látka se v zásadě považuje ve smyslu této směrnice za nebezpečnou z hlediska výbuchu, jestliže jsou získány pozitivní výsledky ve zkoušce citlivosti na působení tepla, ve zkoušce citlivosti na náraz nebo na tření.

3. **ZPRÁVY**3.1 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, obsah vlhkosti atd.,
- fyzikální forma vzorku, zda se vzorek drtil, mlel nebo proséval,
- údaje zjištěné při zkoušce citlivosti na působení tepla (např. hmotnost vzorku a počet úlomků atd.),
- pozorované jevy při zkoušce mechanické citlivosti (např. tvorba značného množství dýmu nebo úplný rozklad bez třesku, plameny, jiskry, třesk, praskání atd.),
- výsledky každého typu zkoušky,
- bylo-li použito alternativní zařízení, musí být uvedeno vědecké zdůvodnění použití a důkaz srovnatelnosti výsledků získaných se specifikovaným zařízením a výsledků získaných s rovnocenným zařízením,

▼B

- všechny užitečné poznámky, například odkaz na zkoušky podobných látek, které by mohly mít význam pro správné hodnocení výsledků,
- všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

V protokolu o zkoušce by měly být uvedeny všechny výsledky, které jsou považovány za chybné, anomální nebo nereprezentativní. Má-li být kterýkoli z těchto výsledků vyloučen, mělo by být uvedeno vysvětlení a výsledky jakéhokoli alternativního nebo doplňkového zkoušení. Pokud nelze anomální výsledek vysvětlit, musí být přijat tak, jak byl dosažen, a musí být použit k odpovídající klasifikaci látky.

4. LITERATURA

- 1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, United Nations, New York.
- 2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, London, ISBN 0-750-60103-5, 1990.
- 3) Koenen, H., Ide, K.H. and Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol.3, 6–13 and 30–42.
- (4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use - Determination of explosion risk.

▼ **B**

Doplňěk

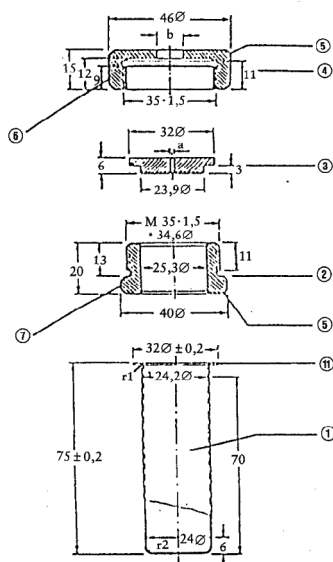
příklad materiálové specifikace pro zkoušku citlivosti na působení tepla (viz DIN 1623)

- 1) Trubka: materiálová specifikace č. 1.0336.505 g
- 2) Clona s otvorem: materiálová specifikace č. 1.4873
- 3) Závitová příruba a matice: materiálová specifikace č. 1.3817

Obrázek 1

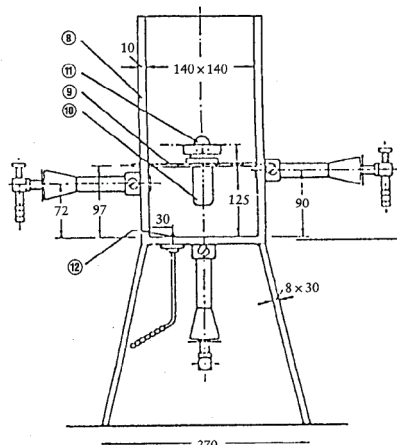
Zařízení pro zkoušku citlivosti na působení tepla

(všechny rozměry v mm)



Obr. 1a Ocelová trubka a příslušenství

1. Trubka
- 1a. Vnější příruba
2. Prstenec se závitem (závit s nízkým třením)
3. Clona s otvorem o průměru $a = 2,0$ nebo $6,0$ mm
4. Matice s otvorem o průměru $b = 10$ mm
5. Zkosená hrana
6. Dvě rovné plošky pro klíč 41



Obr. 1b Ohřívací ochranné zařízení

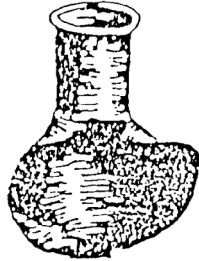
7. Dvě rovné plošky pro klíč 36
8. Ochranný kryt odolný vůči střepinám
9. Dvě opěrné tyče pro trubku
10. Sestavená trubka
11. Poloha zadního hořáku: ostatní hořáky jsou vidět
12. Zapalovací hořáček

▼B

Obrázek 2

Zkouška citlivosti na působení tepla

(příklady roztržení trubky)



Nehodnotí se jako výbuch



Nehodnotí se jako výbuch



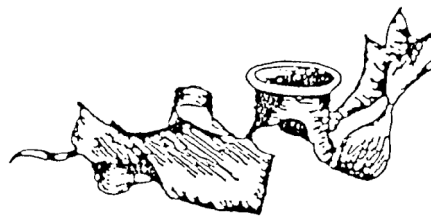
Výbuch



Výbuch



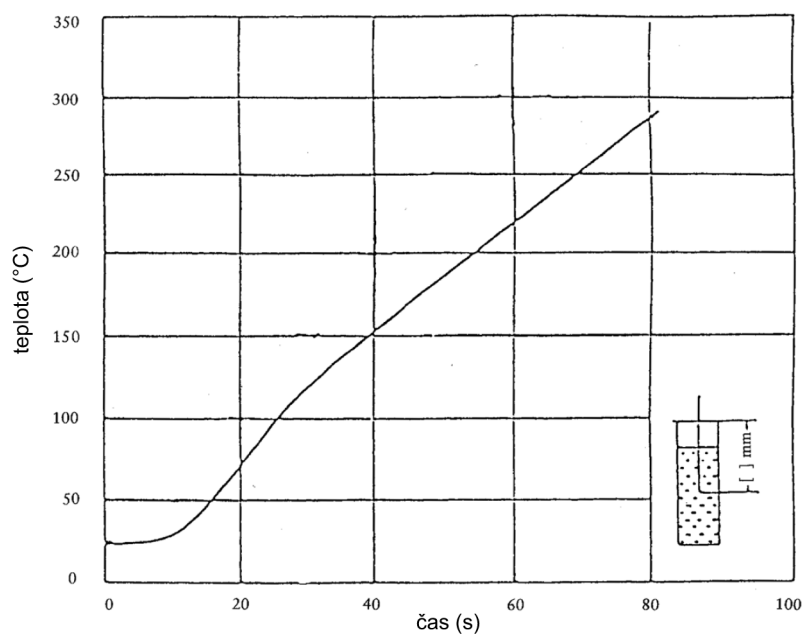
Výbuch



Výbuch

▼B

Obrázek 3

Kalibrace rychlosti ohřevu pro zkoušku citlivosti na působení tepla

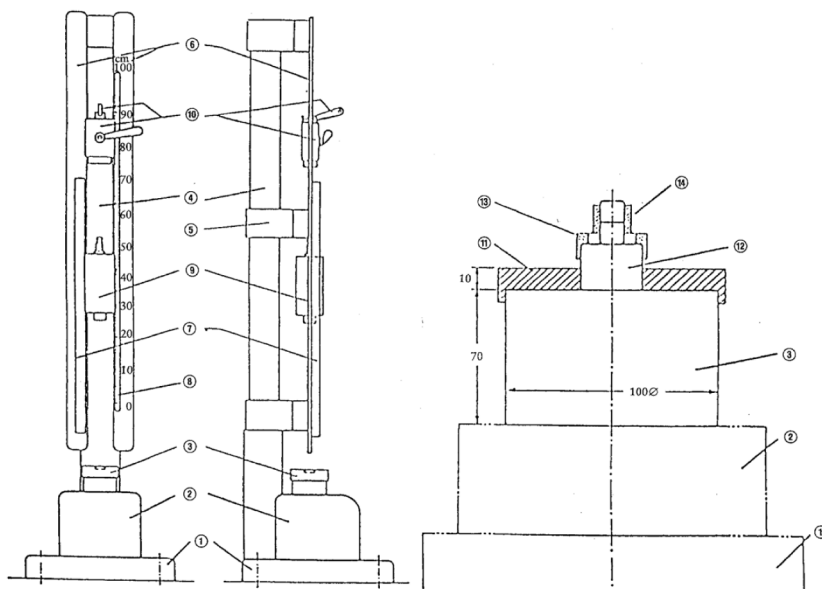
Křivka závislosti teploty na čase získaná při zahřívání dibutyl-ftalátu (27 cm^3) v uzavřené trubce (s clonou $1,5 \text{ mm}$) při průtoku propanu $3,2$ litry za minutu. Teplota byla měřena chromel/alumelovým termočlánkem o průměru 1 mm , zapouzdřeným v korozivzdorné oceli a umístěným 43 mm pod okrajem trubky. Rychlost zahřívání mezi 135 °C a 285 °C by měla být 185 až 215 K/min .

▼B

Obrázek 4

Zařízení pro zkoušku citlivosti na mráz

(všechny rozměry v mm)



Obr. 4a Padací kladivo, čelní a boční celkový pohled

Obr. 4b Padací kladivo, spodní část

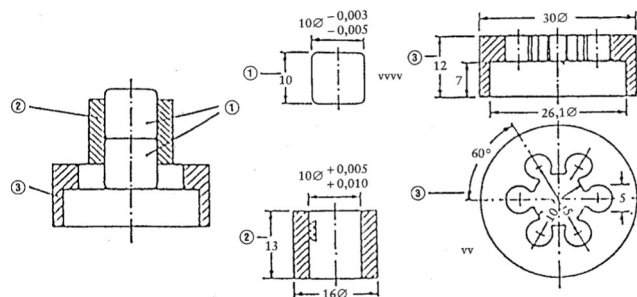
1. Základová deska 450 × 450 × 60
2. Blok z oceli 230 × 250 × 200
3. Kovadlina, průměr 100 × 70
4. Sloup
5. Střední nosník
6. Dvě vodící lišty
7. Ozubená tyč

8. Měřitko
9. Padací kladivo
10. Zadržovací a uvolňovací zařízení
11. Středící objímka
12. (Výměnná) mezipodložka o průměru 26 × 26
13. Středící kroužek s otvory
14. Nárazové zařízení

▼B

Obrázek 4

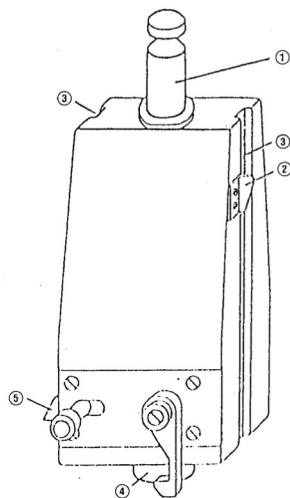
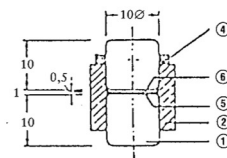
Pokračování



Obr. 4c Zařízení pro zkoušku citlivosti práškových a pastových látek na náraz

Obr. 4d Zařízení pro zkoušku citlivosti kapalných látek na náraz

1. Ocelové válečky
2. Vodicí pouzdro pro ocelové válečky
3. Středící kroužek s otvory
 - a) svislý řez
 - b) průřez
4. Pryžový prstenec
5. Kapalná látka (40 mm³)
6. Prostor bez kapaliny



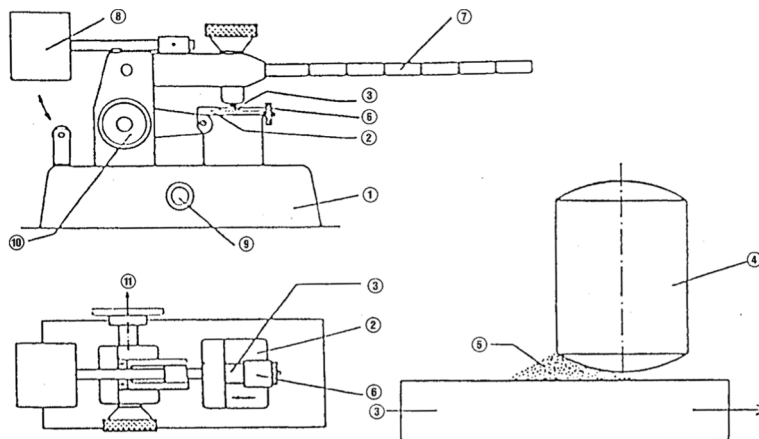
Obr. 4e Kladivo (závaží 5 kg)

1. Upínací čep
2. Polohová značka
3. Vodicí drážky
4. Úderník
5. Aretační zařízení

▼B

Obrázek 5

Zařízení pro zkoušku citlivosti na tření



Obr. 5a Třecí zařízení, boční a půdorysný pohled

Obr. 5b Výchozí poloha válečku a vzorku

- | | |
|---|---|
| 1. Ocelový podstavec | 6. Držák kolíku |
| 2. Pohyblivé sáně | 7. Zatěžovací rameno |
| 3. Porcelánová destička, 25 × 25 × 25 mm,
upevněná na saních | 8. Protižávaží |
| 4. Upevněný porcelánový kolík 10 × 15 mm | 9. Kolečko pro nastavení saní do výchozí polohy |
| 5. Zkoušený vzorek, přibližně 10 mm ³ | 10. Směr k elektromotoru |

▼B**A.15 BOD SAMOZÁPALU (KAPALINY A PLYNY)****METODA****1.1 ÚVOD**

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky. Zkušební postup je použitelný pro plyny, kapaliny a páry, které se mohou za přítomnosti vzduchu vznítit na horkém povrchu.

Bod samozápalu může být značně snížen vlivem katalytických nečistot, materiálu povrchu nebo většího objemu zkušební nádoby.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Míra schopnosti látky samovolně se vznítit se vyjadřuje teplotou samozápalu. Bod samozápalu je nejnižší teplota, při které se zkoušená látka smíchaná se vzduchem za podmínek stanovených v této zkušební metodě vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky jsou uvedeny v normách (viz 1.6.3). Měly by především sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4 PODSTATA METODY

Metodou se stanoví minimální teplota vnitřního povrchu uzavřeného prostoru, která způsobí vznícení plynu, páry nebo kapaliny vpravených do tohoto prostoru.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost se mění v závislosti na rozpětí bodů samozápalu a na použité zkušební metodě.

Citlivost a specifická závislost závisí na použité zkušební metodě.

1.6 POPIS METODY**1.6.1 Aparatura**

Aparatura je popsána v metodě uvedené v bodě 1.6.3.

1.6.2 Zkušební podmínky

Vzorek zkoušené látky se zkouší metodou uvedenou v bodě 1.6.3.

1.6.3 Provedení zkoušky

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

▼B**2. DATA**

Zaznamená se zkušební teplota, atmosférický tlak, množství použitého zkoušeného vzorku a časová prodleva před vznícením.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- přesná specifikace látky (identifikace a nečistoty),
- použité množství vzorku, atmosférický tlak,
- použitá aparatura,
- výsledky měření (zkušební teploty, výsledky týkající se vznícení, příslušná časová prodleva),
- všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

4. LITERATURA

Není uvedena.

▼B**A.16 RELATIVNÍ TEPLOTA SAMOZÁPALU PEVNÝCH LÁTEK****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Výbušné látky a látky, které se spontánně vznítí při styku se vzduchem při teplotě okolí, by neměly být předmětem této zkoušky.

Účelem této zkoušky je poskytnout předběžnou informaci o schopnosti pevných látek samovolně se vznítit za zvýšených teplot.

Pokud teplo uvolňované buď reakcí látky s kyslíkem, nebo exotermním rozkladem není dostatečně rychle odváděno do okolí, nastává samovolné zahřívání látky, které může vést až k jejímu samozápalu. K samozápalu tedy dojde, je-li rychlost vývinu tepla vyšší než rychlost odvádění tepla.

Zkušební postup je užitečný jako předběžná screeningová zkouška pro pevné látky. Z hlediska složitosti povahy vznícení a hoření pevných látek by měl být bod samozápalu stanovený touto metodou použit pouze ke srovnávacím účelům.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Bod samozápalu získaný touto metodou je minimální teplota okolí látky vyjádřená ve °C, při které se určité množství látky za definovaných podmínek vznítí.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PODSTATA METODY

Určité množství vzorku zkoušené látky se za teploty okolí vloží do pece; zatímco se teplota pece zvyšuje rychlostí 0,5 °C/min na 400 °C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší, zaznamenává se křivka závislosti teploty ve středu zkoušeného vzorku na čase. Pro účely této zkoušky se za bod samozápalu látky považuje teplota pece, při které dosáhne teplota zkoušeného vzorku samovolným zahříváním 400 °C.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Žádná.

1.6 POPIS METODY**1.6.1 Aparatura****1.6.1.1 Pec**

Laboratorní pec (o obsahu přibližně 2 litry) vybavená programovatelnou regulací teploty, přirozenou cirkulací vzduchu a pojistným přetlakovým zařízením. Aby se předešlo možnému riziku výbuchu, nesmí přijít rozkladné plyny do styku s elektrickými topnými elementy.

▼ B1.6.1.2 *Krychle z drátěného pletiva*

Podle šablony na obrázku 1 se vystřihne kus z drátěného korozi vzdorného pletiva o velikosti otvorů 0,045 mm. Vystřížený kus se složí do formy nahoře otevřené krychle a zajistí se drátkem.

1.6.1.3 *Termočlánky*

Vhodné termočlánky.

1.6.1.4 *Zapisovač*

Jakýkoli dvoukanálový zapisovač kalibrováný pro teploty od 0 °C do 600 °C nebo jim odpovídající napětí.

1.6.2 **Zkušební podmínky**

Látky se zkouší ve stavu, v jakém byly obdrženy.

1.6.3 **Provedení zkoušky**

Drátěná krychle se naplní zkoušenou látkou, jemně se poklepe a přidá se tolik látky, aby byla krychle zcela naplněna. Krychle se poté při laboratorní teplotě zavěsí do středu pece. Jeden termočlánek se umístí do středu krychle a druhý mezi krychli a stěnu pece pro záznam teploty pece.

Teploty pece a vzorku se nepřetržitě zaznamenávají, zatímco se teplota pece plynule zvyšuje rychlostí 0,5 °C/min až do teploty 400 °C nebo do bodu tání vzorku, je-li nižší.

Když se látka vznítí, termočlánky zaznamenají velmi prudký nárůst teploty nad teplotou pece.

2. **DATA**

Pro hodnocení je důležitá teplota pece, při které dosáhla teplota vzorku samovolným zahříváním 400 °C (viz obrázek 2).

3. **ZPRÁVY**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- popis zkoušené látky,
- výsledky měření včetně křivky závislosti teploty na čase,
- všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků.

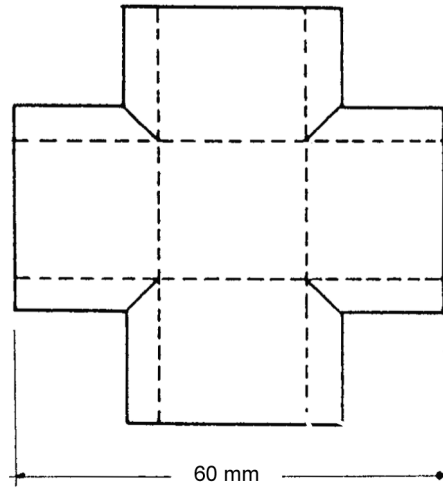
4. **LITERATURA**

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

▼B

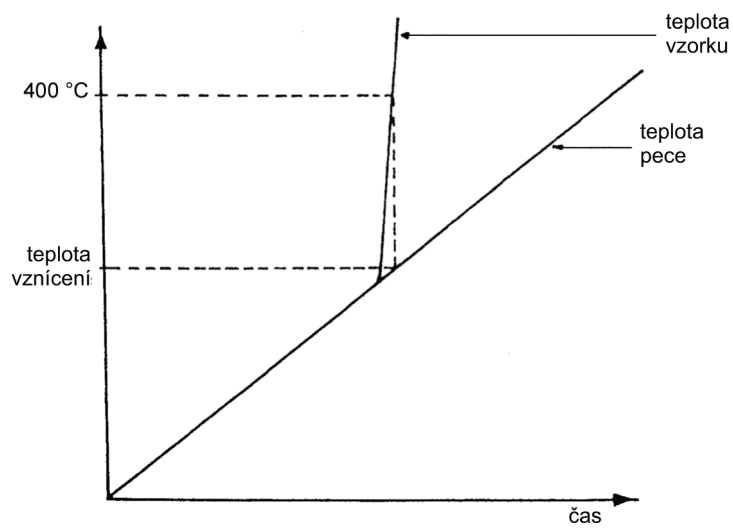
Obrázek 1

Šablona krychle o délce strany 20 mm



Obrázek 2

Typická křivka závislosti teploty na čase



▼B**A.17 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (PEVNÉ LÁTKY)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Před provedením této zkoušky je vhodné mít předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška není použitelná pro kapaliny, plyny, výbušné nebo vysoce hořlavé látky nebo pro organické peroxidy.

Zkouška se neprovádí, jestliže ze strukturního vzorce bez pochyby vyplývá, že tato látka nemá schopnost exotermně reagovat s hořlavým materiálem.

Ke zjištění, zda by se zkouška neměla provádět za speciálních bezpečnostních opatření, je třeba provést předběžnou zkoušku.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Doba hoření: doba reakce v sekundách potřebná k průchodu reakční zóny prachovou housenkou podle postupu popsaného v bodě 1.6.

Rychlost hoření: vyjadřuje se v mm/s.

Maximální rychlost hoření: nejvyšší hodnota rychlosti hoření, která byla naměřena pro směsi obsahující 10 až 90 % hmot. oxidující látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Pro zkoušku a pro předběžnou zkoušku se jako referenční látka používá dusičnan barnatý čistoty p.a.

Referenční směs je směs dusičnanu barnatého a práškové celulosy připravená podle bodu 1.6, která má maximální rychlost hoření (obvykle jde o směs obsahující 60 % hmot. dusičnanu barnatého).

1.4 PODSTATA METODY

V zájmu bezpečnosti se provede předběžná zkouška. Jestliže předběžná zkouška jasně prokáže, že látka má oxidační vlastnosti, žádné další zkoušky se nevyžadují. Není-li tomu tak, podrobí se látka úplné zkoušce.

Při úplné zkoušce se látka, která má být zkoušena, a definovaná hořlavá látka smísí v různých poměrech. Každá směs je poté upravena do tvaru prachové housenky a ta se na jednom konci zapálí. Stanovená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Vhodná je každá technika mletí a mísení, pro niž se neliší maximální rychlosti hoření v šesti samostatných zkouškách od aritmetického průměru o více než 10 %.

▼ B

1.6 POPIS METODY

1.6.1 **Příprava**1.6.1.1 *Zkoušená látka*

Velikost částic zkoušeného vzorku se sníží na < 0,125 mm následujícím postupem: zkoušená látka se proseje, podíl zachycený na síti se drtí a celý postup se opakuje, dokud celá zkoušená dávka neprojde sítím.

Lze použít jakoukoli techniku mletí a prosévání, která vyhoví kritériím jakosti.

Před přípravou směsi se látka suší při 105 °C do konstantní hmotnosti. Pokud se zkoušená látka rozkládá při teplotě nižší než 105 °C, musí se látka sušit při vhodné nižší teplotě.

1.6.1.2 *Hořlavá látka*

Jako hořlavá látka se používá prášková celulóza. Doporučuje se typ celulosy používaný pro chromatografii na tenké vrstvě nebo pro sloupcovou chromatografii. Jako vhodný se prokázal typ, který má délku více než 85 % vláken od 0,020 mm a 0,075 mm. Celulosový prášek se proseje sítím o velikosti oka 0,125 mm. V průběhu zkoušky se používá tatáž šarže celulosy.

Před přípravou směsi se prášková celulóza suší při 105 °C do konstantní hmotnosti.

Pokud se při předběžné zkoušce použije dřevitá moučka, připraví se z měkkého dřeva shromážděním podílu, který projde sítím o velikosti oka 1,6 mm, důkladným promícháním a následným sušením čtyři hodiny při teplotě 105 °C ve vrstvě o tloušťce nepřesahující 25 mm. Ochladí se a do okamžiku použití, ke kterému by mělo dojít nejlépe do 24 hodin, se uchovává v co nejvíce naplněné vzduchotěsné nádobě.

1.6.1.3 *Zdroj zapálení*

Jako zdroj zapálení se použije plamen plynového hořáku (o minimálním průměru 5 mm). Použije-li se jiný zdroj zapálení (např. při zkoušce v inertní atmosféře), uvede se popis a zdůvodnění.

1.6.2 **Provedení zkoušky***Poznámka:*

Směsi oxidantů a celulosy nebo dřevité moučky se musí považovat za potenciálně výbušné a musí se s nimi zacházet s náležitou opatrností.

1.6.2.1 *Předběžná zkouška*

Vysušená látka se důkladně promíchá s vysušenou celulosou nebo dřevitou moučkou v poměru 2 hmotnostní díly zkoušené látky a 1 hmotnostní díl celulosy nebo dřevité moučky a směs se upraví do tvaru malého kužele o rozměrech 3,5 cm (průměr základny) × 2,5 cm (výška) naplněním bez pěchování do kuželové formy (např. do laboratorní skleněné nálevky s utěsněným stonkem).

▼ B

Zkoušený vzorek se položí na chladnou, nehořlavou, neporézní a málo tepelně vodivou podkladovou desku. Zkouška se provede v digestoři podle bodu 1.6.2.2.

Zdroj zapálení se přiloží ke kuželu. Sleduje se a zaznamená se prudkost a doba trvání výsledné reakce.

Látka se považuje za oxidující, je-li reakce prudká.

V případě, že výsledek vzbuzuje pochybnosti, je nezbytné vykonat úplnou níže popsanou zkoušku s prachovou housenkou.

1.6.2.2 *Zkouška s prachovou housenkou*

Připraví se směs oxidantu s celulosou obsahující 10 až 90 % hmot. oxidantu, po 10 % přírůstcích. Přesnější hodnota maximální rychlosti hoření se v mezních případech získá použitím mezilehlé směsi oxidantu s celulosou.

Zkoušený vzorek se upraví pomocí formy. Kovová forma je 250 mm dlouhá a má trojúhelníkový příčný průřez o vnitřní výšce 10 mm a šířce 20 mm. Na obě podélné strany formy se upevní dvě kovové desky se základnou jako bočnice, které přečnívají o 2 mm nad horní okraj trojúhelníkové formy (obrázek). Forma se bez zhutnění naplní mírným přebytkem směsi. Po spuštění formy z výšky 2 cm na pevný povrch se přebytek látky seškrábne stěrkou. Bočnice se odstraní a zbývající prášek se uhladí válečkem. Na horní část formy se položí nehořlavá, neporézní a málo tepelně vodivá deska, sestava se převrátí a forma odstraní.

Zkoušený vzorek se umístí v digestoři kolmo na směr odtahu.

Rychlost proudění odsávaného vzduchu by měla stačit k zamezení úniku dýmu do laboratoře a neměla by se v průběhu zkoušky měnit. Kolem zkušebního zařízení by se měly postavit ochranné clony proti nadměrnému proudění vzduchu.

Zkouška se provede co nejrychleji s ohledem na hygroskopičnost celulosy a některých zkoušených látek.

Jeden konec prachové housenky se zapálí plamenem hořáku.

Poté, co reakční zóna dosáhne vzdálenosti 30 mm, měří se doba, za kterou se reakce rozšíří na vzdálenost 200 mm.

Zkouška se provede s referenční látkou a alespoň jednou s každou z řady směsí zkoušené látky s celulosou.

Pokud se zjistí, že maximální rychlost hoření je značně vyšší, než rychlost hoření referenční směsí, lze zkoušku ukončit; v opačném případě se zkouška opakuje pětkrát s každou ze tří směsí s nejvyššími rychlostmi hoření.

▼B

Existuje-li podezření, že je výsledek falešně pozitivní, opakuje se zkouška s inertní látkou se stejnou velikostí částic, např. s křemelinou, namísto celulosy. Směs zkoušené látky s celulosou s nejvyšší rychlostí hoření by měla být eventuálně znovu zkoušena v inertní atmosféře (s obsahem kyslíku < 2 % obj.).

2. DATA

Z bezpečnostních důvodů se považuje za charakteristickou oxidační vlastnost zkoušené látky maximální rychlost hoření, nikoli průměrná hodnota.

Pro vyhodnocení je důležitá nejvyšší hodnota rychlosti hoření zjištěná v šesti zkouškách dané směsi.

Do grafu se vynesou nejvyšší hodnoty rychlosti hoření pro každou směs proti koncentraci oxidantu. Z grafu se odečte nejvyšší rychlost hoření.

Šest hodnot rychlosti hoření naměřených pro směs s maximální rychlostí hoření se nesmí lišit od aritmetického průměru o více než 10 %; v opačném případě se musí zlepšit technika drcení a mísení.

Naměřená maximální rychlost hoření se porovná s maximální rychlostí hoření referenční směsi (viz 1.3).

Provedou-li se zkoušky v inertní atmosféře, porovná se maximální rychlost reakce s rychlostí naměřenou pro referenční směs v inertní atmosféře.

3. ZPRÁVA**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- identifikace zkoušené látky, její složení, čistota, vlhkost atd.,
- jakákoli úprava zkoušeného vzorku (např. drcení, sušení),
- zdroj zapálení použitý při zkouškách,
- výsledky měření,
- charakter reakce (např. vzplanutí na povrchu, hoření v celé hmotě, jakékoli informace o produktech hoření atd.),
- všechny další poznámky, které mají význam pro interpretaci výsledků, včetně popisu prudkosti reakce (hoření plamenem, jiskření, uvolňování dýmu, pomalé doutnání atd.) a přibližné doby trvání předběžné bezpečnostní/screeningové zkoušky jak pro zkoušenou, tak pro referenční látku,
- výsledky ze zkoušek s inertní látkou, pokud byly prováděny,
- výsledky ze zkoušek v inertní atmosféře, pokud byly prováděny.

▼B

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Látka je považována za oxidující, je-li:

- a) při předběžné zkoušce zjištěna prudká reakce;
- b) při úplné zkoušce maximální rychlost hoření zkoušených směsí vyšší nebo stejná jako maximální rychlost hoření referenční směsi celulosy a dusičnanu barnatého.

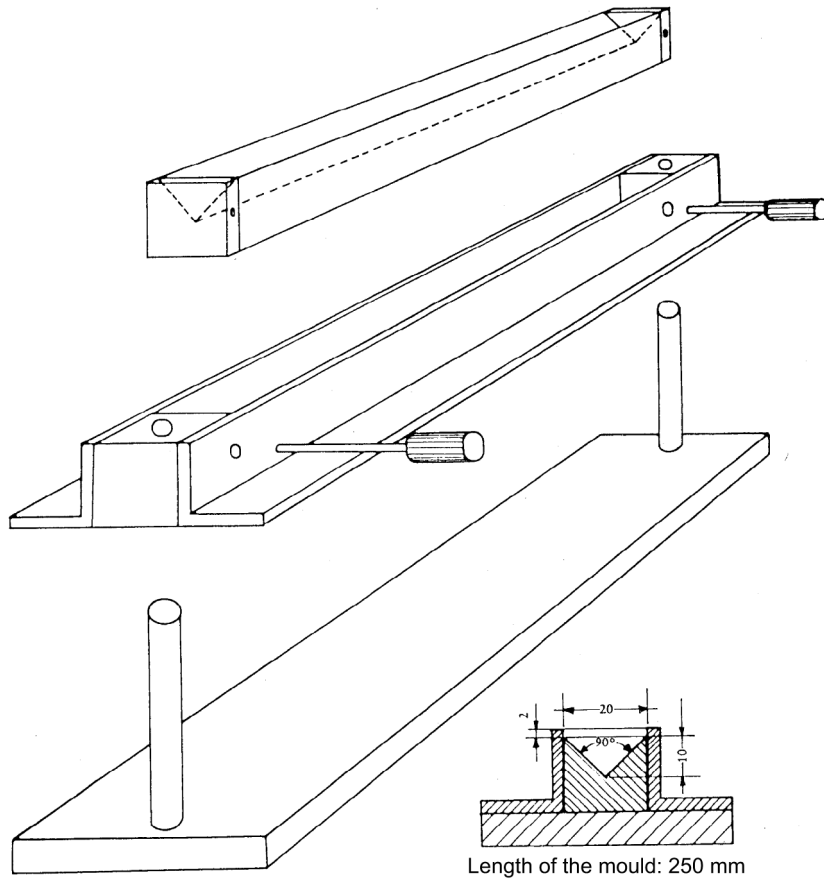
S cílem vyloučit falešně pozitivní výsledky by měly být vzaty v úvahu také výsledky získané při zkoušení látky ve směsi s inertním materiálem a/nebo při zkoušce v inertní atmosféře.

4. LITERATURA

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

▼B*Doplňěk**Obrázek***Forma a příslušenství pro přípravu zkoušeného vzorku ve tvaru prachové housenky**

(všechny rozměry jsou v milimetrech)



▼ B**A.18 POČETNĚ PRŮMĚRNÁ MOLEKULOVÁ HMOTNOST A DISTRIBUCE MOLEKULOVÉ HMOTNOSTI POLYMERŮ****1. METODA**

Tato gelově permeační chromatografická metoda je replikou metody OECD TG 118 (1996). Základní principy a další technické informace jsou uvedeny v odkaze (1).

1.1 ÚVOD

Vlastnosti polymerů jsou tak rozdílné, že není možné popsat jedinou metodu a přesně stanovit podmínky separace a hodnocení, které by pokryly všechny eventuality a specifika vyskytující se při separaci polymerů. Zejména pro složité polymerní systémy není gelově permeační chromatografie (GPC) vždy vhodná. Není-li GPC použitelná, může být molekulová hmotnost stanovena jinými metodami (viz příloha). V takových případech by měly být uvedeny veškeré podrobnosti a zdůvodnění použité metody.

Popsaná metoda je založena na normě DIN 55672 (1). Podrobné informace o provádění experimentů a o hodnocení údajů lze nalézt v uvedené normě DIN. V případě, že jsou nezbytné úpravy experimentálních podmínek, musí být změny zdůvodněny. Mohou být použity jiné normy, jsou-li na ně uvedeny úplné odkazy. V popsané metodě jsou ke kalibraci použity vzorky polystyrenu o známé polydisperzitě a metoda může být upravena tak, aby byla vhodná pro určité polymery, např. ve vodě rozpustné polymery a polymery s dlouhými větvemi.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Početně průměrná molekulová hmotnost M_n a hmotnostně průměrná molekulová hmotnost M_w se stanoví pomocí těchto rovnic:

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

kde:

H_i je výška signálu detektoru nad základní čarou pro retenční objem V_i ,

M_i je molekulová hmotnost frakce polymeru s retenčním objemem V_i a

n je počet údajů.

Šířka distribuce molekulové hmotnosti, která je mírou polydisperzity systému, je dána poměrem M_w/M_n .

▼ B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Vzhledem k tomu, že GPC je relativní metoda, musí být provedena kalibrace. k tomuto účelu se obvykle používá lineární polystyrenový standard s úzkou distribucí se známými průměrnými molekulovými hmotnostmi M_n a M_w a se známou distribucí molekulové hmotnosti. Kalibrační křivka může být pro stanovení molekulové hmotnosti neznámého vzorku použita pouze tehdy, byly-li podmínky separace vzorku a standardů identické.

Stanovený vztah mezi molekulovou hmotností a elučním objemem je platný pouze za specifických podmínek určitého experimentu. Podmínky zahrnují především teplotu, rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), chromatografické podmínky a separační kolonu nebo systém kolon.

Molekulové hmotnosti stanovené tímto způsobem jsou relativními hodnotami a označují se jako „molekulové hmotnosti ekvivalentní polystyrenu“. To znamená, že se molekulová hmotnost bude v závislosti na strukturních a chemických rozdílech mezi vzorkem a standardem od absolutní hodnoty více či méně lišit. Použijí-li se jiné standardy, např. poly(ethylenglykol), poly(ethylenoxid), poly(methyl-methakrylát), poly(akrylová kyselina), musí být použití zdůvodněno.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Distribuce molekulové hmotnosti vzorku i průměrné molekulové hmotnosti (M_n , M_w) lze stanovit metodou GPC. GPC je speciální typ kapalinové chromatografie, při němž se vzorek dělí podle hydrodynamických objemů jednotlivých složek (2).

Separace probíhá při průchodu vzorku kolonou naplněnou porézním materiálem, obvykle organickým gelem. Malé molekuly proniknou do pórů, zatímco velké molekuly nikoli. Průchod velkých molekul je tedy kratší a jsou eluovány nejdříve. Středně velké molekuly pronikají do některých pórů a jsou eluovány později. Nejmenší molekuly se středním hydrodynamickým poloměrem menším než velikost pórů gelu pronikají do všech pórů. Tyto molekuly jsou eluovány nakonec.

V ideálním případě závisí separace pouze na velikosti molekul, ale v praxi je obtížné vyhnout se alespoň některým rušivým adsorpčním jevům. Nestejnoměrné plnění kolony a mrtvé objemy mohou situaci zhoršit (2).

Detekce se provádí například měřením indexu lomu nebo UV absorpcí a výsledkem je jednoduchá distribuční křivka. Má-li být však křivce přiřazena skutečná molekulová hmotnost, je nezbytné kalibrovat kolonu polymery se známou molekulovou hmotností a v ideálním případě v podstatě podobnou strukturou, např. různými polystyrenovými standardy. Křivka má zpravidla gaussovský tvar, někdy deformovaný prodloužením na straně nízké molekulové hmotnosti, přičemž svislá osa udává hmotnostní zlomek různých molekulových hmotností a na vodorovné ose je vyneseno logaritmus molekulové hmotnosti.

▼ B

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Opakovatelnost (relativní směrodatná odchylka: RSD) elučního objemu by měla být lepší než 0,3 %. Je-li chromatogram hodnocen v závislosti na čase a neodpovídá výše uvedenému kritériu (1), musí být požadovaná opakovatelnost zajištěna korekcí vnitřním standardem. Polydisperzity jsou závislé na molekulových hmotnostech standardů. V případě polystyrenových standardů jsou typickými hodnotami:

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

(M_p je molekulová hmotnost standardu odpovídající maximu píku)

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 Příprava standardních roztoků polystyrenu

Polystyrenové standardy se rozpustí opatrným mícháním ve zvoleném eluentu. Při přípravě roztoků se musí zohlednit doporučení výrobce.

Koncentrace zvolených standardů závisí na různých faktorech, např. na vstřikovaném objemu, viskozitě roztoku a citlivosti analytického detektoru. Maximální vstřikovaný objem musí být přizpůsoben délce kolony, aby nedošlo k přesycení. Typické vstřikované objemy pro analytickou separaci pomocí GPC s kolonou o rozměrech 30 cm × 7,8 mm jsou obvykle 40 až 100 μl. Větší objemy jsou možné, ale neměly by překročit 250 μl. Optimální poměr mezi vstřikovaným objemem a koncentrací musí být stanoven před vlastní kalibrací kolony.

1.6.2 Příprava roztoku vzorku

Stejně požadavky platí v zásadě pro přípravu roztoků vzorku. Vzorek se opatrným třepáním rozpustí ve vhodném rozpouštědle, např. v tetrahydrofuranu (THF). V žádném případě by neměl být rozpuštěn pomocí ultrazvukové lázně. Je-li to nezbytné, přečistí se roztok vzorku filtrací přes membránový filtr o velikosti pórů 0,2 až 2 μm.

Přítomnost nerozpuštěných částic musí být zaznamenána v závěrečném protokolu, neboť mohou pocházet z frakcí s vysokou molekulovou hmotností. Pro stanovení hmotnostní koncentrace nerozpuštěných částic vyjádřené v procentech by měla být použita vhodná metoda. Roztoky by měly být použity do 24 hodin.

1.6.3 Přístroje a pomůcky

- zásobník rozpouštědla,
- odplynovací zařízení (podle potřeby),
- dávkovací čerpadlo,

▼B

- tlumič rázů (podle potřeby),
- vstřikovací systém,
- chromatografické kolony,
- detektor,
- průtokoměr (podle potřeby),
- zapisovač,
- nádoba na odpad.

Musí být zajištěno, aby byl systém GPC inertní k použitým rozpouštědlům (např. použitím ocelových kapilár pro THF).

1.6.4 **Vstřikování a systém dávkování rozpouštědla**

Určený objem roztoku vzorku se vnese na kolonu buď dávkovačem, nebo ručně v ostře ohraničené zóně. Příliš rychlý pohyb pístu vzad nebo vpřed (při ručním vnesení) může způsobit změny v pozorované distribuci molekulové hmotnosti. Dávkovač rozpouštědla by pokud možno neměl působit rázy a v ideálním případě by měl být opatřen tlumičem rázů. Průtok je řádově 1 ml/min.

1.6.5 **Kolona**

Podle typu vzorku se k charakterizaci polymeru použije jednoduchá kolona nebo několik za sebou řazených kolon. Komerčně je dostupná řada porézních materiálů definovaných vlastností (např. velikost pórů, vylučovací meze). Výběr separačního gelu nebo délky kolony závisí jak na vlastnostech vzorku (hydrodynamický objem, distribuce molekulové hmotnosti), tak na specifických podmínkách separace, jako jsou rozpouštědlo, teplota a průtok (1, 2, 3).

1.6.6 **Teoretická patra**

Použitá kolona nebo kombinace kolon musí být charakterizována počtem teoretických pater. Při použití THF jako eluentu to zahrnuje vnesení roztoku ethylbenzenu nebo jiné vhodné nepolární rozpuštěné látky na kolonu známé délky. Počet teoretických pater je dán touto rovnicí:

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

kde,

N = je počet pater v maximu,

V_e = je eluční objem píku,

▼ B

W = šířka píku na základní čáře,

$W_{1/2}$ = šířka píku v polovině výšky.

1.6.7 Separační účinnost

Vedle počtu teoretických pater, který je veličinou určující šířku pásu, hraje roli také separační účinnost, která se stanoví ze strmosti kalibračních křivek. Separační účinnost kolony se získá z tohoto vztahu

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{plocha průřezu kolony}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kde,

V_{e, M_x} = je eluční objem pro polystyren s molekulovou hmotností M_x ,

$V_{e,(10,M_x)}$ = je eluční objem pro polystyren s 10krát větší molekulovou hmotností.

Rozlišení systému je obecně definováno tímto vztahem:

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

kde,

V_{e1}, V_{e2} = Jsou eluční objemy dvou standardů polystyrenu v maximu píku,

W_1, W_2 = jsou šířky píků na základní čáře,

M_1, M_2 = jsou molekulové hmotnosti odpovídající maximu píků (měly by se lišit faktorem 10).

Hodnota R pro kolonový systém by měla být větší než 1,7 (4).

1.6.8 Rozpouštědla

Všechna rozpouštědla musí mít vysokou čistotu (v případě THF 99,5 % čistotu). Zásobník rozpouštědla (v případě potřeby pod inertní atmosférou) musí být dostatečně velký pro kalibraci kolony a pro několik analýz vzorku. Z rozpouštědla musí být před jeho dopravou čerpadlem na kolonu odstraněny plyny.

1.6.9 Kontrola teploty

Teplota kritických vnitřních součástí (vstřikovací smyčky, kolon, detektoru a veden) by měla být konstantní a měla by být v souladu s volbou rozpouštědla.

▼ B**1.6.10 Detektor**

Detektor slouží ke kvantitativnímu zaznamenávání koncentrace vzorku eluovaného z kolony. Nemá-li dojít ke zbytečnému rozšíření píků, musí být objem kyvety detektoru co nejmenší. Neměl by být větší než 10 μl , s výjimkou detektorů k měření rozptylu světla a viskozity. k detekci se obvykle používá diferenciálního refraktometru. Vyžadují-li to však specifické vlastnosti vzorku nebo elučního rozpouštědla, lze použít jiné typy detektorů, např. UV/vis, IR detektory a viskozitní detektory atd.

2. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRAV**2.1 ÚDAJE**

Pokud jde o podrobná kritéria hodnocení a o požadavky týkající se registrace a zpracování údajů, měla by být použita norma DIN (1).

Pro každý vzorek musí být provedeny dva nezávislé experimenty. Analýzy musí být provedeny samostatně.

Pro každé měření musí být uvedeny hodnoty M_n , M_w , M_w/M_n a M_p . Je nezbytné výslovně uvést, že naměřené hodnoty jsou relativními hodnotami odpovídajícími molekulové hmotnosti použitého standardu.

Po stanovení retenčních objemů nebo retenčních časů (případně korigovaných za použití vnitřního standardu) se proti těmto veličinám vynesou do grafu hodnoty $\log M_p$ (přičemž M_p je výška maxima píku kalibračního standardu). Pro jeden řád hodnot molekulové hmotnosti jsou nezbytné alespoň dva kalibrační body a pro celou křivku, která by měla pokrýt odhadovanou molekulovou hmotnost vzorku, se požaduje alespoň pět naměřených bodů. Poslední bod kalibrační křivky na straně nízkých molekulových hmotností se určí hexylbenzenem nebo jiným vhodným nepolárním rozpouštědlem. Početně a hmotnostně průměrné molekulové hmotnosti se obecně určí elektronickým zpracováním údajů založeným na rovnicích v bodě 1.2. Při manuálním zpracování údajů do číselné formy lze použít metodu ASTM D 3536-91 (3).

Distribuční křivka musí být znázorněna ve formě tabulky nebo graficky (diferenciální četnost nebo kumulativní četnost v procentech proti $\log M$). V grafickém znázornění by měl mít jeden řád molekulové hmotnosti délku 4 cm a výška maxima píku by měla být asi 8 cm. U integrálních distribučních křivek by měla být vzdálenost mezi 0 a 100 % na ose přibližně 10 cm.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 Zkoušená látka:

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty),

▼ B

- popis zpracování vzorku, pozorované skutečnosti, problémy.

2.2.2 Přístrojové vybavení:

- zásobník eluentu, inertní plyn, odplynění eluentu, složení eluentu, nečistoty,
- dávkovací čerpadlo, tlumič rázů, vstřikovací systém,
- separační kolony (výrobce, všechny informace o charakteristikách kolon, jako jsou velikost pórů, druh separačního materiálu atd., počet, délka a pořadí použitých kolon),
- počet teoretických pater kolony (nebo kombinace kolon), separační účinnost (rozlišení systému),
- informace o symetrii pík,
- teplota kolony, způsob řízení teploty,
- detektor (princip měření, typ, objem kyvety),
- průtokoměr, je-li použit (výrobce, princip měření),
- systém pro záznam a zpracování údajů (hardware a software).

2.2.3 Kalibrace systému:

- podrobný popis metody použité pro sestrojení kalibrační křivky,
- informace o kritériích jakosti této metody (např. korelační koeficient, součet čtverců chyb atd.),
- informace o všech extrapolacích, předpokladech a aproximacích provedených během experimentálního postupu a při hodnocení a zpracování údajů,
- všechny naměřené hodnoty použité při konstrukci kalibrační křivky musí být dokumentovány v tabulce, která musí pro každý kalibrační bod obsahovat tyto informace:
 - název vzorku,
 - výrobce vzorku,
 - charakteristické hodnoty standardů M_p , M_n , M_w , M_w/M_n , jak jsou poskytnuty výrobcem nebo jak jsou zjištěny z následných měření, společně s podrobnostmi o metodě stanovení,
 - vstříknutý objem a vstříknutá koncentrace,

▼ B

- hodnota M_p použitá po kalibraci
- eluční objem nebo korigovaný retenční čas měřený v maximu píku,
- hodnota M_p vypočtená pro maximum píku,
- chyba vypočtené hodnoty M_p a kalibrační hodnoty M_p vyjádřená v procentech.

2.2.4 Hodnocení:

- hodnocení vlivu času: metody použité pro zajištění požadované reprodukovatelnosti (metoda korekce, vnitřní standard atd.),
- informace o tom, zda bylo hodnocení provedeno na základě elučního objemu nebo retenčního času.
- informace o mezích hodnocení v případě, že pík nebyl úplně analyzován,
- popis metody vyrovnávání křivek, bylo-li použito,
- příprava a postupy předúpravy vzorku,
- popřípadě přítomnost nerozpuštěných částic,
- vstříknutý objem (μl) a vstříknutá koncentrace (mg/ml),
- pozorované skutečnosti, které vedou k odchýlkám od ideálních charakteristik metody GPC,
- podrobný popis všech změn zkušebních postupů,
- podrobnosti o rozsahu chyb,
- jakékoli další informace a pozorování relevantní pro interpretaci výsledků.

3. LITERATURA

- 1) DIN 55672 (1995) GelpermeationsChromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- 2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- 3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- 4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼ B*Doplněk***Příklady jiných metod stanovení početně průměrné molekulové hmotnosti (M_n) polymerů**

Gelově permeační chromatografie (GPC) je preferovanou metodou stanovení M_n , zejména tehdy, je-li k dispozici sada standardů, jejichž struktura je srovnatelná se strukturou polymeru. Vyskytnou-li se praktické obtíže při použití GPC nebo očekává-li se, že látka nevyhoví regulačním kritériím na M_n , (což je třeba potvrdit), jsou k dispozici alternativní metody, jako jsou:

1. Využití koligativních vlastností**1.1 Ebulioskopie/kryoskopie:**

spočívá v měření zvýšení bodu varu (ebulioskopie) nebo snížení bodu tuhnutí (kryoskopie) rozpouštědla po přidání polymeru. Metoda je založena na skutečnosti, že vliv rozpuštěného polymeru na bod varu nebo bod tuhnutí závisí na molekulové hmotnosti polymeru (1, 2).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$.

1.2 Snížení tlaku par:

spočívá v měření tlaku par zvolené referenční kapaliny před přidáním a po přidání známého množství polymeru (1, 2).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$ (teoretická; v praxi však má omezený význam).

1.3 Membránová osmometrie:

spočívá na principu osmózy, tj. přirozené snahy molekul rozpouštědla proniknout polopropustnou membránou ze zředěného do koncentrovaného roztoku a dosáhnout rovnováhy. Při zkoušce je koncentrace zředěného roztoku nulová, zatímco koncentrovaný roztok obsahuje polymer. Pronikáním rozpouštědla membránou dochází ke tlakovému rozdílu, který závisí na koncentraci a molekulové hmotnosti polymeru (1, 3, 4).

Použitelnost: M_n od 20 000 do 200 000.

1.4 Osmometrie v parní fázi:

spočívá ve srovnání rychlosti vypařování aerosolu čistého rozpouštědla s alespoň třemi aerosoly obsahujícími polymer v různých koncentracích (1, 5, 6).

Použitelnost: $M_n < 20\,000$.

▼ B**2. Analýza koncových skupin**

Použití této metody vyžaduje znalost jak celkové struktury polymeru, tak povahy koncových skupin řetězce (které musí být odlišitelné od hlavního řetězce například metodou NMR nebo titrací nebo derivatizací). Stanovení počtu koncových skupin polymeru může vést k hodnotě molekulové hmotnosti (7, 8, 9).

Použitelnost: M_n až do 50 000 (s klesající spolehlivostí).

3. Literatura

- 1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.
- 2) Glover, CA., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
- 3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- 4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25–52.
- 5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- 6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: 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.

▼ B**A.19 OBSAH NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK V POLYMERECH****1. METODA**

Tato gelově permeační chromatografická metoda je replikou metody OECD TG 119 (1996). Základní principy a další technické informace jsou uvedeny v odkazech.

1.1 ÚVOD

Vlastnosti polymerů jsou tak rozdílné, že není možné popsat jedinou metodu a přesně stanovit podmínky separace a hodnocení, které by pokryly všechny eventuality a specifika vyskytující se při separaci polymerů. Zejména pro složité polymerní systémy není gelově permeační chromatografie (GPC) vždy vhodná. Není-li GPC použitelná, může být molekulová hmotnost stanovena jinými metodami (viz příloha). V takových případech by měly být uvedeny veškeré podrobnosti a zdůvodnění použité metody.

Popsaná metoda je založena na normě DIN 55672 (1). Podrobné informace o provádění experimentů a o hodnocení údajů lze nalézt v uvedené normě DIN. V případě, že jsou nezbytné úpravy experimentálních podmínek, musí být změny zdůvodněny. Mohou být použity jiné normy, jsou-li na ně uvedeny úplné odkazy. V popsané metodě jsou ke kalibraci použity vzorky polystyrenu o známé polydisperzitě a metoda může být upravena tak, aby byla vhodná pro určité polymery, např. ve vodě rozpustné polymery a polymery s dlouhými větvemi.

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Nízká molekulová hmotnost je konvenčně definována jako molekulová hmotnost pod 1 000.

Početně průměrná molekulová hmotnost M_n a hmotnostně průměrná molekulová hmotnost M_w se stanoví pomocí těchto rovnic:

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

kde,

H_i = je výška signálu detektoru nad základní čarou pro retenční objem V_i ,

M_i = je molekulová hmotnost frakce polymeru pro retenční objem V_i a n je počet údajů.

Šířka distribuce molekulové hmotnosti, která je mírou polydisperzity systému, je dána poměrem M_w/M_n .

▼ B

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Vzhledem k tomu, že GPC je relativní metoda, musí být provedena kalibrace. K tomuto účelu se obvykle používá lineární polystyrenový standard s úzkou distribucí se známými průměrnými molekulovými hmotnostmi M_n a M_w a se známou distribucí molekulové hmotnosti. Kalibrační křivka může být pro stanovení molekulové hmotnosti neznámého vzorku použita pouze tehdy, byly-li podmínky separace vzorku a standardů identické.

Stanovený vztah mezi molekulovou hmotností a elučním objemem je platný pouze za specifických podmínek určitého experimentu. Podmínky zahrnují především teplotu, rozpouštědlo (nebo směs rozpouštědel), chromatografické podmínky a separační kolonu nebo systém kolon.

Molekulové hmotnosti stanovené tímto způsobem jsou relativními hodnotami a označují se jako „molekulové hmotnosti ekvivalentní polystyrenu“. To znamená, že se molekulová hmotnost bude v závislosti na strukturních a chemických rozdílech mezi vzorkem a standardem od absolutní hodnoty více či méně lišit. Použijí-li se jiné standardy, např. poly(ethylen glykol), poly(ethylenoxid), poly(methyl-methakrylát), poly(akrylová kyselina), musí být použití zdůvodněno.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Distribuce molekulové hmotnosti vzorku i průměrné molekulové hmotnosti (M_n , M_w) lze stanovit metodou GPC. GPC je speciální typ kapalinové chromatografie, při němž se vzorek dělí podle hydrodynamických objemů jednotlivých složek (2).

Separace probíhá při průchodu vzorku kolonou naplněnou porézním materiálem, obvykle organickým gelem. Malé molekuly proniknou do pórů, zatímco velké molekuly nikoliv. Průchod velkých molekul je tedy kratší a jsou eluovány nejdříve. Středně velké molekuly pronikají do některých pórů a jsou eluovány později. Nejmenší molekuly se středním hydrodynamickým poloměrem menším než velikost pórů gelu pronikají do všech pórů. Tyto molekuly jsou eluovány nakonec.

V ideálním případě závisí separace pouze na velikosti molekul, ale v praxi je obtížné vyhnout se alespoň některým rušivým adsorpčním jevům. Nestejnoměrné plnění kolony a mrtvé objemy mohou situaci zhoršit (2).

Detekce se provádí například měřením indexu lomu nebo UV absorpcí a výsledkem je jednoduchá distribuční křivka. Má-li být však křivce přiřazena skutečná molekulová hmotnost, je nezbytné kalibrovat kolonu polymery se známou molekulovou hmotností a v ideálním případě v podstatě podobnou strukturou, např. různé polystyrenové standardy. Křivka má zpravidla gaussovský tvar, někdy deformovaný prodloužením na straně nízké molekulové hmotnosti, přičemž svislá osa udává hmotnostní zlomek různých molekulových hmotností a na vodorovné ose je vynesena logaritmus molekulové hmotnosti.

▼ B

Obsah molekul o nízké hmotnosti se odečte z této kalibrační křivky. Výpočet může být správný pouze tehdy, je-li odezva nízkomolekulárních látek hmotnostně ekvivalentní polymeru jako celku.

1.5 KRITERIA JAKOSTI

Opakovatelnost (relativní směrodatná odchylka: RSD) elučního objemu by měla být lepší než 0,3 %. Je-li chromatogram hodnocen v závislosti na čase a neodpovídá výše uvedenému kritériu (1), musí být požadovaná opakovatelnost zajištěna korekcí vnitřním standardem. Polydisperzity jsou závislé na molekulových hmotnostech standardů. V případě polystyrenových standardů jsou typickými hodnotami:

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

(M_p je molekulová hmotnost standardu odpovídající maximu píku)

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1 Příprava standardních roztoků polystyrenu

Polystyrenové standardy se rozpustí opatrným mícháním ve zvoleném eluentu. Při přípravě roztoků se musí zohlednit doporučení výrobce.

Koncentrace zvolených standardů závisí na různých faktorech, např. na vstříkovaném objemu, viskozitě roztoku a citlivosti analytického detektoru. Maximální vstříkovaný objem musí být přizpůsoben délce kolony, aby nedošlo k přesycení. Typické vstříkované objemy pro analytickou separaci pomocí GPC s kolonou o rozměrech $30 \times 7,8$ mm jsou obvykle 40 až 100 μl . Větší objemy jsou možné, ale neměly by překročit 250 μl . Optimální poměr mezi vstříkovaným objemem a koncentrací musí být stanoven před vlastní kalibrací kolony.

1.6.2 Příprava roztoku vzorku

Stejně požadavky platí v zásadě pro přípravu roztoků vzorku. Vzorek se opatrným třepáním rozpustí ve vhodném rozpouštědle, např. v tetrahydrofuranu (THF). V žádném případě by neměl být rozpuštěn pomocí ultrazvukové lázně. Je-li to nezbytné, přečistí se roztok vzorku filtrací přes membránový filtr o velikosti pórů 0,2 až 2 μm .

Přítomnost nerozpuštěných částic musí být zaznamenána v závěrečném protokolu, neboť mohou pocházet z frakcí s vysokou molekulovou hmotností. Pro stanovení hmotnostní koncentrace nerozpuštěných částic vyjádřené v procentech by měla být použita vhodná metoda. Roztoky by měly být použity do 24 hodin.

▼ B**1.6.3 Korekce na obsah nečistot a přísad**

Korekce obsahu frakce s $M < 1\ 000$ v důsledku příspěvku od přítomných nepolymerních specifických složek (např. nečistot a/nebo přísad) je obvykle nezbytná, není-li naměřený obsah $< 1\ %$. Dosáhne se toho přímou analýzou roztoku polymeru nebo eluátu GPC.

V případech, kdy je eluát po průchodu kolonou pro další analýzu příliš zředěný, musí být zkoncentrován. Může být nezbytné odpařit eluát do sucha a opět jej rozpustit. Zkoncentrování eluátu musí být provedeno za podmínek, při nichž je zajištěno, že nedojde ke změnám v eluátu. Zpracování eluátu po GPC závisí na analytické metodě použité ke kvantitativnímu stanovení.

1.6.4 Přístroje a pomůcky

Aparatura pro GPC sestává z těchto částí:

- zásobník rozpouštědla,
- odplynovací zařízení (podle potřeby),
- dávkovací čerpadlo,
- tlumič rázů (podle potřeby),
- vstřikovací systém,
- chromatografické kolony,
- detektor,
- průtokoměr (podle potřeby),
- zapisovač,
- nádoba na odpad.

Musí být zajištěno, aby byl systém GPC inertní k použitým rozpouštědlům (např. použitím ocelových kapilár pro THF).

1.6.5 Vstřikování a systém dávkování rozpouštědla

Určený objem roztoku vzorku se vnese na kolonu buď dávkovačem nebo ručně v ostře ohraničené zóně. Příliš rychlý pohyb pístu vzad nebo vpřed (při ručním vnesení) může způsobit změny v pozorované distribuci molekulové hmotnosti. Dávkovač rozpouštědla by pokud možno neměl působit rázy a v ideálním případě by měl být opatřen tlumičem rázů. Průtok je řádově 1 ml/min.

1.6.6 Kolona

Podle typu vzorku se k charakterizaci polymeru použije jednoduchá kolona nebo několik za sebou řazených kolon. Komerčně je dostupná řada porézních materiálů definovaných vlastností (např. velikost pórů, vylučovací meze). Výběr separačního gelu nebo délky kolony závisí jak na vlastnostech vzorku (hydrodynamický objem, distribuce molekulové hmotnosti), tak na specifických podmínkách separace, jako jsou rozpouštědlo, teplota a průtok (1, 2, 3).

▼ B1.6.7 **Teoretická patra**

Použitá kolona nebo kombinace kolon musí být charakterizována počtem teoretických pater. Při použití THF jako eluentu to zahrnuje vnesení roztoku ethylbenzenu nebo jiné vhodné nepolární rozpuštěné látky na kolonu známé délky. Počet teoretických pater je dán touto rovnicí:

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

kde,

N = je počet pater v maximu,

V_e = je eluční objem píku,

W = šířka píku na základní čáře,

$W_{1/2}$ = šířka píku v polovině výšky.

1.6.8 **Separační účinnost**

Vedle počtu teoretických pater, který je veličinou určující šířku pásu, hraje rohu také separační účinnost, která se stanoví ze strmosti kalibrační křivky. Separační účinnost kolony se získá z tohoto vztahu:

$$\frac{V_{e, M_x} - V_{e, (10M_x)}}{\text{plocha průřezu kolony}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kde,

V_{e, M_x} = je eluční objem pro polystyren s molekulovou hmotností M_x

$V_{e, (10M_x)}$ = je eluční objem pro polystyren s 10krát větší molekulovou hmotností. Rozlišení systému je obecně definováno tímto vztahem:

kde,

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

kde,

V_{e1}, V_{e2} = jsou eluční objemy dvou standardů polystyrenu v maximu píku,

W_1, W_2 = jsou šířky píků na základní čáře,

M_1, M_2 = jsou molekulové hmotnosti odpovídající maximu píků (měly by se lišit faktorem 10).

Hodnota R pro kolonový systém by měla být větší než 1,7 (4).

▼ B**1.6.9 Rozpouštědla**

Všechna rozpouštědla musí mít vysokou čistotu (v případě THF 99,5 % čistotu). Zásobník rozpouštědla (v případě potřeby pod inertní atmosférou) musí být dostatečně velký pro kalibraci kolony a pro několik analýz vzorku. Z rozpouštědla musí být před jeho dopravou čerpadlem na kolonu odstraněny plyny.

1.6.10 Kontrola teploty

Teplota kritických vnitřních součástí (vstřikovací smyčky, kolon, detektoru a vedení) by měla být konstantní a měla by být v souladu s volbou rozpouštědla.

1.6.11 Detektor

Detektor slouží ke kvantitativnímu zaznamenávání koncentrace vzorku eluovaného z kolony. Nemá-li dojít ke zbytečnému rozšíření píků, musí být objem květy detektoru co nejmenší. Neměl by být větší než 10 μl , s výjimkou detektorů k měření rozptylu světla a viskozity. K detekci se obvykle používá diferenciálního refraktometru. Vyžadují-li to však specifické vlastnosti vzorku nebo elučního rozpouštědla, lze použít jiné typy detektorů, např. UV/vis, IR detektory a viskozitní detektory atd.

2. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV**2.1 ÚDAJE**

Pokud jde o podrobná kritéria hodnocení a o požadavky týkající se registrace a zpracování údajů, měla by být použita norma DIN (1).

Pro každý vzorek musí být provedeny dva nezávislé experimenty. Analýzy musí být provedeny samostatně. Ve všech případech je důležité stanovit také údaje ze slepých pokusů zpracovaných za stejných podmínek jako vzorek.

Je nezbytné výslovně uvést, že naměřené hodnoty jsou relativními hodnotami odpovídajícími molekulové hmotnosti použitého standardu.

Po stanovení retenčních objemů nebo retenčních časů (případně korigovaných za použití vnitřního standardu) se proti těmto veličinám vynesou do grafu hodnoty $\log M_p$ (přičemž M_p je výška maxima píku kalibračního standardu). Pro jeden řád hodnot molekulové hmotnosti jsou nezbytné alespoň dva kalibrační body a pro celou křivku, která by měla pokrýt odhadovanou molekulovou hmotnost vzorku, se požaduje alespoň pět naměřených bodů. Poslední bod kalibrační křivky na straně nízkých molekulových hmotností se určí hexylbenzenem nebo jiným vhodným nepolárním rozpouštědlem. Při stanovení se část křivky odpovídající molekulovým hmotnostem nižším než 1 000 podle potřeby koriguje na nečistoty a přísady. Eluční křivky se obvykle hodnotí pomocí elektronického zpracování údajů. Při manuálním zpracování údajů do číselné formy lze použít metodu ASTM D 3536-91 (3).

▼ B

Jestliže je v koloně zachycen nerozpustný polymer, je jeho molekulová hmotnost pravděpodobně vyšší než molekulová hmotnost rozpuštěné frakce, a pokud by tato skutečnost nebyla zohledněna, došlo by k nadhodnocení obsahu molekul o nízké hmotnosti. Návod na korigování obsahu molekul o nízké hmotnosti na obsah nerozpuštěného polymeru je uveden v příloze.

Distribuční křivka musí být znázorněna ve formě tabulky nebo graficky (diferenciální četnost nebo kumulativní četnost v procentech proti log M). V grafickém znázornění by měl mít jeden řád molekulové hmotnosti délku 4 cm a výška maxima píku by měla být asi 8 cm. U integrálních distribučních křivek by měla být vzdálenost mezi 0 a 100 % na ose přibližně 10 cm.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 Zkoušená látka:

- dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty),
- popis zpracování vzorku, pozorované skutečnosti, problémy.

2.2.2 Přístrojové vybavení:

- zásobník eluentu, inertní plyn, odplynění eluentu, složení eluentu, nečistoty,
- dávkovací čerpadlo, tlumič rázů, vstříkovací systém,
- separační kolony (výrobce, všechny informace o charakteristikách kolon, jako jsou velikost pórů, druh separačního materiálu atd., počet, délka a pořadí použitých kolon),
- počet teoretických pater kolony (nebo kombinace kolon), separační účinnost (rozlišení systému),
- informace o symetrii píků,
- teplota kolony, způsob řízení teploty,
- detektor (princip měření, typ, objem kyvety),
- průtokoměr, je-li použit (výrobce, princip měření),
- systém pro záznam a zpracování údajů (hardware a software).

2.2.3 Kalibrace systému:

- podrobný popis metody použité pro sestavení kalibrační křivky,

▼ B

- informace o kritériích jakosti této metody (např. korelační koeficient, součet čtverců chyb atd.),
- informace o všech extrapolacích, předpokladech a aproximacích provedených během experimentálního postupu a při hodnocení a zpracování údajů,
- všechny naměřené hodnoty použité při konstrukci kalibrační křivky musí být dokumentovány v tabulce, která musí pro každý kalibrační bod obsahovat tyto informace:
 - název vzorku,
 - výrobce vzorku,
 - charakteristické hodnoty standardů M_p , M_n , M_w , M_w/M_n , jak jsou poskytnuty výrobcem nebo jak jsou zjištěny z následných měření, společně s podrobnostmi o metodě stanovení,
 - vstříknutý objem a vstříknutá koncentrace,
 - hodnota M_p použitá po kalibraci
 - eluční objem nebo korigovaný retenční čas měřený v maximum píku,
 - hodnota M_p vypočtená pro maximum píku,
 - chyba vypočtené hodnoty M_p a kalibrační hodnoty M_p vyjádřená v procentech.

2.2.4 **Informace o obsahu podílu s nízkou molekulovou hmotností v polymeru:**

- popis metod použitých v analýze a způsobu, jakým byly experimenty provedeny,
- informace o obsahu podílu s nízkou molekulovou hmotností vyjádřeném v hmotnostních procentech celkového vzorku,
- informace o nečistotách, přísadách a jiných nepolymerních podílech vyjádřených v hmotnostních procentech celkového vzorku.

2.2.5 **Hodnocení:**

- hodnocení vlivu času: metody použité pro zajištění požadované reprodukovatelnosti (metoda korekce, vnitřní standard atd.),
- informace o tom, zda bylo hodnocení provedeno na základě elučního objemu nebo retenčního času,
- informace o mezích hodnocení v případě, že pík nebyl úplně analyzován,
- popis metody vyrovnávání křivek, bylo-li použito,
- příprava a postupy předúpravy vzorku,
- popřípadě přítomnost nerozpuštěných částic,

▼B

- vstříknutý objem (μl) a vstříknutá koncentrace (mg/ml),
- pozorované skutečnosti, které vedou k odchylkám od ideálních charakteristik metody GPC,
- podrobný popis všech změn zkušebních postupů,
- podrobnosti o rozsahu chyb,
- jakékoli další informace a pozorování relevantní pro interpretaci výsledků.

3. LITERATURA

- 1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.
- 2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.
- 3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- 4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size-Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼ B*Doplňěk***Korekce obsahu nízkomolekulárních látek na přítomnost nerozpuštěného polymeru**

Je-li ve vzorku přítomen nerozpuštěný polymer, dochází ke ztrátě hmotnosti během analýzy GPC. Nerozpuštěné polymery jsou nevratně zachyceny v koloně nebo na filtru při filtraci vzorku, zatímco rozpustný podíl vzorku kolonou projde. V případě, že lze odhadnout nebo změřit přírůstek indexu lomu (dn/dc) polymeru, lze odhadnout ztrátu hmotnosti vzorku na koloně. V takovém případě se korekce provede pomocí externí kalibrace standardními materiály o známé koncentraci a známé hodnotě dn/dc , čímž se kalibruje refraktometr. V příkladě uvedeném dále je jako standard použit poly(methyl-methakrylát) (PMMA).

Při externí kalibraci pro analýzu polyakrylátů se analyzuje metodou GPC standard PMMA známé koncentrace v tetrahydrofuranu a výsledné údaje se použijí pro nalezení konstanty refraktometru podle rovnice:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kde:

K = je konstanta refraktometru ($\mu V/s/ml$),

R = je odečet pro standard PMMA ($\mu V/s$),

C = je koncentrace standardu PMMA (mg/ml),

V = je vstříknutý objem (ml) a

dn/dc = je přírůstek indexu lomu pro PMMA v tetrahydrofuranu (ml/mg).

Pro standard PMMA jsou typické tyto údaje:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Výsledná hodnota $K = 3,05 \times 10^{11}$ se poté použije pro výpočet teoretické odezvy detektoru v případě, že detektorem prošlo 100 % vstříknutého polymeru.

▼B**A.20 CHOVÁNÍ POLYMERŮ PŘI ROZPOUŠTĚNÍ NEBO
EXTRAKCI VE VODĚ****1. METODA**

Popsaná metoda je replikou revidované verze metody OECD TG 120 (1997). Další technické informace jsou uvedeny v odkaze (1).

1.1 ÚVOD

U určitých polymerů, např. emulzních polymerů, může být před použitím dále popsané metody nezbytná předúprava. Tato metoda není použitelná pro kapalné polymery a pro polymery, které za zkušebních podmínek reagují s vodou.

Není-li metoda použitelná nebo proveditelná, je možné zkoumat chování polymerů při rozpouštění a extrakci jinými metodami. V takových případech by měly být uvedeny všechny podrobnosti použité metody a její zdůvodnění.

1.2 REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Chování polymerů při rozpouštění nebo extrakci ve vodném prostředí se zjišťuje baňkovou metodou (viz A.6 Rozpustnost ve vodě, baňková metoda) s úpravou uvedenou dále.

1.4 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.5.1 Přístroje a pomůcky**

Pro provedení metody je nezbytné toto zařízení:

- drticí zařízení, např. mlýnek pro přípravu částic o známé velikosti,
- třepačka s možností řízení teploty,
- membránový filtrační systém,
- vhodné analytické vybavení,
- normalizovaná síta.

1.5.2 Příprava vzorku

Reprezentativní vzorek musí být nejdříve omezen za použití vhodného síta na velikost částic 0,125 až 0,25 mm. Kvůli stálosti vzorku nebo kvůli procesu drcení může být nezbytné chlazení. Kaučukovité materiály mohou být drceny při teplotě kapalného dusíku (1).

Pokud není možné dosáhnout požadované velikosti částic, je třeba přijmout taková opatření, aby byla velikost částic zmenšena co nejvíce; výsledky by měly být zaznamenány. Ve zprávě je nezbytné uvést, jak byl rozdrcený vzorek uchován do provedení zkoušky.

▼ B**1.5.3 Postup**

Do každé ze tří nádob opatřených skleněnými zátkami se navází po 10 g zkoušené látky a přidá se po 1 000 ml vody. Ukáže-li se zpracování 10 g polymeru neschůdným, mělo by být použito nejbližší vyšší množství, které lze zpracovat, a objem vody by měl být podle toho upraven.

Nádoby se těsně zazátkují a poté se třepou při 20 °C. Měla by být použita třepačka nebo míchačka schopná pracovat při konstantní teplotě. Po 24 hodinách se obsah každé nádoby odstředí nebo zfiltruje a v čiré vodné fázi se vhodnou analytickou metodou stanoví koncentrace polymeru. Nejsou-li k dispozici vhodné analytické metody pro vodnou fázi, lze celkovou rozpustnost nebo extrahovatelnost zhodnotit z hmotnosti sušiny na filtru nebo odstředěné sraženiny.

Obvykle je nezbytné kvantitativně rozlišit nečistoty a přísady na jedné straně a nízkomolekulární podíly na druhé straně. V případě gravimetrického stanovení je také důležité provést slepý pokus bez použití zkoušené látky s cílem zohlednit zbytky pocházející z experimentálního postupu.

Chování při rozpouštění nebo extrakci polymerů ve vodě při 37 °C a pH 2 a 9 může být stanoveno způsobem popsáním v případě provádění experimentu při 20 °C. Hodnot pH lze dosáhnout přidáním buď vhodných pufrů, nebo vhodných kyselin nebo zásad, např. kyseliny chlorovodíkové, kyseliny octové, hydroxidu sodného nebo draselného analytické čistoty nebo NH₃.

V závislosti na použité metodě by měla být provedena jedna nebo dvě zkoušky. Jsou-li k dispozici dostatečně specifické metody pro přímou analýzu vodné fáze na obsah polymeru, měla by stačit jedna zkouška, jak je uvedena výše. Nejsou-li však takové metody k dispozici a zjištění chování polymeru při rozpouštění nebo extrakci je omezeno na nepřímou analýzu stanovením celkového obsahu organického uhlíku (TOC) ve vodném extraktu, měla by být provedena dodatečná zkouška. Tato dodatečná zkouška by měla být provedena třikrát, přičemž se použije 10krát menší množství vzorků polymeru a stejné množství vody jako v první zkoušce.

1.5.4 Analýza**1.5.4.1 Zkouška s jednou velikostí vzorku**

Metody pro přímou analýzu složek polymeru ve vodné fázi mohou být k dispozici. V opačném případě lze také zvážit nepřímou analýzu rozpuštěných nebo extrahovaných složek polymeru stanovením celkového obsahu rozpustných složek a provedením korekce na obsah nepolymerních složek.

Analýza vodné fáze na obsah celkového polymerního podílu je možná:

buď dostatečně citlivou metodou, např.

— stanovením celkového obsahu organického uhlíku (TOC) rozkladem persíranem nebo dichromanem za vzniku CO₂ a následnou IR analýzou nebo chemickou analýzou,

▼ B

- atomovou absorpční spektrometrií (AAS) nebo jejím protějškem spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP) pro silikónové polymery nebo polymery obsahující kov,
- UV absorpcí nebo spektrofluorimetrií pro aromatické polymery,
- kapalinovou chromatografií s hmotovým spektrometrem (LC-MS) pro nízkomolekulární vzorky,

nebo vakuovým odpařením vodného extraktu do sucha a spektroskopickou (IR nebo UV atd.) nebo AAS/ICP analýzou zbytku.

Není-li analýza vodné fáze jako takové možná, měl by být vodný extrakt extrahován organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou, např. chlorovaným uhlovodíkem. Rozpouštědlo se poté odpaří a zbytek se analyzuje způsobem popsáným výše pro obsah polymeru. Jakékoli složky, které jsou identifikovány jako nečistoty nebo přísady, se odečtou, aby byl stanoven stupeň rozpustnosti samotného polymeru.

Jsou-li přítomna relativně velká množství takových materiálů, může být nezbytné analyzovat zbytek například HPLC nebo GC, aby se odlišily nečistoty z přítomného monomeru nebo deriváty monomeru a aby tak mohl být stanoven skutečný obsah monomeru nebo jeho derivátů.

V některých případech může být postačující pouhé odpaření organického rozpouštědla do sucha a zvážení suchého zbytku.

1.5.4.2 *Zkouška se dvěma různými velikostmi vzorku*

Všechny vodné extrakty se analyzují na celkový obsah organického uhlíku (TOC).

Provede se gravimetrické stanovení nerozpuštěného nebo neextrahovaného podílu vzorku. Zůstávají-li po odstředění nebo filtraci obsahu každé nádoby usazené na stěnách nádoby zbytky polymeru, měla by být nádoba oplachována filtrátem, dokud není vyčištěna od všech viditelných zbytků. Poté se filtrát opět odstředí nebo zfiltruje. Zbytky, které zůstanou na filtru nebo v centrifugační kyvetě, se vysuší ve vakuu při 40 °C a zváží. Sušení se provádí do konstantní hmotnosti.

2. ÚDAJE

2.1 ZKOUŠKA S JEDNOU VELIKOSTÍ VZORKU

Pro každou ze tří nádob by měly být uvedeny jednotlivé výsledky a průměrné hodnoty vyjádřené v jednotkách hmotnosti vztahované na objem roztoku (obvykle mg/l) nebo v jednotkách hmotnosti vztahované na hmotnost vzorku polymeru (obvykle mg/g). Kromě toho by měla být uvedena ztráta hmotnosti vzorku (vypočtená jako hmotnost rozpuštěné látky dělená hmotností výchozího vzorku). Měly by být vypočteny relativní směrodatné odchylky (RSD). Měly by být uvedeny jednotlivé hodnoty pro celkovou látku (polymer + hlavní přísady atd.) a pro samotný polymer (tj. po odečtení příspěvku od těchto přísad).

▼ B**2.2 ZKOUŠKA SE DVĚMA RŮZNÝMI VELIKOSTMI VZORKU**

Pro každý experiment by měly být uvedeny jednotlivé hodnoty TOC ve vodných extraktech obou trojích experimentů a průměrné hodnoty vyjádřené v jednotkách hmotnosti vztažené na objem roztoku (obvykle mg C/l) a rovněž v jednotkách hmotnosti vztažené na hmotnost výchozího vzorku (obvykle mg C/g).

Není-li mezi výsledky pro vysoké a nízké poměry vzorek/voda rozdíl, může to znamenat, že všechny extrahovatelné složky byly skutečně vyextrahovány. V takovém případě obvykle nebývá přímá analýza nezbytná.

Měly by být uvedeny jednotlivé hmotnosti zbytků vyjádřené v procentech počátečních hmotností vzorků. Měly by být vypočteny průměrné hodnoty za celý experiment. Rozdíly mezi 100 % a zjištěnými hodnotami v procentech představují množství rozpustného a extrahovatelného materiálu v původním vzorku vyjádřené v procentech.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

3.1.1 Zkoušená látka:

— dostupné informace o zkoušené látce (identifikace, přísady, nečistoty, obsah podílu o nízké molekulové hmotnosti).

3.1.2 Experimentální podmínky:

— popis použitých postupů a experimentálních podmínek,
— popis analytických a detekčních metod.

3.1.3 Výsledky:

— výsledky rozpustnosti nebo extrahovatelnosti v mg/l; jednotlivé a střední hodnoty pro extrakční zkoušky v různých roztocích, rozepsané podle obsahu polymeru, nečistot, přísad atd.,
— výsledky rozpustnosti nebo extrahovatelnosti v mg/g polymeru,
— hodnoty TOC ve vodných extraktech, hmotnost rozpuštěné látky a vypočtené procentuální hodnoty (pokud byly stanoveny),
— hodnota pH každého vzorku,
— informace o hodnotách získaných při slepém pokusu,
— podle potřeby upozornění na chemickou nestálost zkoušené látky během zkušebních postupů a analytických postupů,
— všechny informace, které jsou důležité pro interpretaci výsledků.

4. LITERATURA

1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststoffzerzeugnissen für Prüfzwecke.

▼ B**A.21 OXIDAČNÍ VLASTNOSTI (KAPALINY)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Tato zkušební metoda slouží ke stanovení schopnosti kapalné látky zvyšovat rychlost hoření nebo intenzitu hoření hořlavé látky nebo vytvářet směs s hořlavou látkou, která se po důkladném promíslení samovolně vznítí. Je založena na zkoušce OSN pro kapaliny podporující hoření (1) a je jí rovnocenná. Vzhledem k tomu, že tato metoda A.21 byla v první řadě zavedena s ohledem na požadavky směrnice nařízení (ES) č. 1907/2006, vyžaduje se srovnání pouze s jednou referenční látkou. Další zkoušení a srovnávání s dalšími referenčními látkami bude nutné, mají-li být výsledky zkoušky použity pro jiné účely (1).

Tato zkouška nemusí být prováděna, pokud je z rozboru strukturního vzorce zcela nepochybné, že látka nemůže s jiným hořlavým materiálem reagovat exotermicky.

Před prováděním zkoušky je užitečné mít předběžné informace o možných výbušných vlastnostech látky.

Tato zkouška není použitelná pro pevné látky, plyny, výbušné nebo vysoce hořlavé látky nebo organické peroxidy.

Tato zkouška nemusí být prováděna, pokud jsou pro danou látku již k dispozici výsledky zkoušky OSN pro kapaliny podporující hoření (1).

1.2 DEFINICE A JEDNOTKY

Průměrnou dobou nárůstu tlaku se rozumí průměr naměřených časových hodnot, v jejichž průběhu dojde v testované směsi k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako referenční látka se použije 65 % (hmot.) vodný roztok kyseliny dusičné p.a. (2).

(1) Např. pro účely předpisů OSN pro přepravu.

(2) Koncentrace kyseliny by měla být před zkoušením stanovena titrací.

▼ B

Pokud experimentátor předpokládá, že výsledky zkoušky mohou být případně použity pro jiné účely ⁽¹⁾, je vhodné použít více referenčních látek ⁽¹⁾.

1.4 **PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY**

Zkoušená kapalina se smísí v poměru 1:1 (hmot.) s vláknitou celulosou a vpraví se do tlakové nádoby. Pokud dojde při mísení nebo plnění k samovolnému vznícení, není třeba ve zkoušce pokračovat.

Pokud k samovolnému vznícení nedojde, provede se celá zkouška. Směs se zahřívá v tlakové nádobě a měří se průměrná doba, za kterou dojde k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Tato hodnota se porovná s průměrnou dobou pro směs referenční látky (referenčních látek) a celulosy v poměru 1:1.

1.5 **KRITÉRIA JAKOSTI**

V sérii pěti zkoušek jedné látky by neměl být rozdíl jednotlivých výsledků a aritmetického průměru větší než 30 %. Výsledky, které se liší od aritmetického průměru o více než 30 % se nepoužijí, proces mísení a plnění se zlepší a zkoušení zopakuje.

1.6 **POPIS METODY**1.6.1 **Příprava**1.6.1.1 *Hořlavá látka*

Jako hořlavý materiál se použije usušená vláknitá celulosa s délkou vláknů od 50 do 250 μm a středním průměrem 25 μm ⁽²⁾. Suší se ve vrstvě o tloušťce nejvýše 25 mm 4 hodiny při 105 °C do konstantní hmotnosti a uchovává se v exsíkátoru nad vysoušedlem až do vychladnutí a samotného použití. Obsah vlhkosti ve vysušené celulose by měl být nižší než 0,5 %, vztaženo na suchou látku ⁽³⁾. Aby bylo této hodnoty dosaženo, doba sušení se podle potřeby prodlouží ⁽⁴⁾. Pro celou zkoušku se použije tatáž šarže celulosy.

⁽¹⁾ Např. v odkazu 1 se používají 50 % (hmot.) kyselina chloristá a 40 % (hmot.) chlorečnan sodný

⁽²⁾ Např. prášková celulosa Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalogové číslo 4021 050.

⁽³⁾ Potvrzeno např. titrací podle Karla Fishera

⁽⁴⁾ Tohoto obsahu vlhkosti lze také dosáhnout např. zahříváním při 105 °C za vakua po dobu 24 hodin.

▼B1.6.1.2 *Zkušební zařízení*1.6.1.2.1 *Tlaková nádoba*

Zkouška vyžaduje použití tlakové nádoby. Nádobou je ocelový tlakový válec o délce 89 mm a vnějším průměru 60 mm (viz obrázek 1). Válec je na dvou protilehlých stranách opracován do plochy (v těchto místech je průměr nádoby 50 mm), aby byla usnadněna manipulace při nasazování zažehovací a ventilační zátky. Nádoba má vrtání o světlosti 20 mm a na obou koncích je do hloubky 19 mm rozšířena a opatřena závitem, aby do ní mohla být zavedena trubka odpovídající 1" British Standard Pipe (BSP) nebo jejímu metrickému ekvivalentu. Ve vzdálenosti 35 mm od jednoho konce a v úhlu 90° k nezploštělým stěnám je do válcové stěny tlakové nádoby našroubováno boční rameno pro odvod tlaku. Otvor pro toto rameno je vyvrtán do hloubky 12 mm a opatřen závitem tak, aby vyhovoval závitu 1/2" BSP (nebo metrickému ekvivalentu) na konci bočního ramene. V případě potřeby se inertním těsněním zajistí plynutěsnost. Boční rameno přesahuje těleso nádoby o 55 mm a je v něm vyvrtaný kanál o průměru 6 mm. Konec bočního ramene je uvnitř rozšířen a opatřen závitem pro membránové čidlo tlaku. Lze použít jakékoli měřidlo tlaku, které je odolné proti horkým plynům a produktům rozkladu a na nárůst tlaku z 690 na 2 070 kPa reaguje nejpozději do 5 ms.

Konec tlakové nádoby vzdálenější od bočního ramene je opatřen zažehovací zátkou se dvěma elektrodami, přičemž jedna je od zátky izolovaná a druhá je přes zátku uzemněná. Druhý konec tlakové nádoby je uzavřen průtřzným diskem (průtřzný tlak přibližně 2 200 kPa), který je přidržován zátkou s vrtáním o světlosti 20 mm. V případě potřeby se inertním těsněním zajistí plynutěsnost zažehovací zátky. Podstavec (obrázek 2) drží sestavu během používání ve správné poloze. Skládá se obvykle ze základny z měkké oceli o rozměrech 235 mm × 184 mm × 6 mm a ze 185 mm dlouhého dutého hranolu o rozměrech 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Dvě protilehlé strany tělesa jsou vyříznuty tak, aby vznikl podstavec ve tvaru 86 mm dlouhého hranolu na dvou plochých nožičkách. Konce těchto plochých nožiček jsou seříznuty v úhlu 60° vzhledem k horizontální rovině a jsou přivařeny k podstavci. Na horním konci hranolu je vykrojení o šířce 22 mm a hloubce 46 mm, do něhož zapadne boční rameno tlakové nádoby, poté co je do držáku – zažehovací zátkou napřed – zasazena tlaková nádoba. Na vnitřní nižší stranu hranolového držáku je přivařen distanční ocelový kus o šířce 30 mm a tloušťce 6 mm. Tlakovou nádobu na místě zajišťují dva 7 mm postranní křídlové šrouby umístěné v otvorech na protější straně. Na boční díl dna hranolového držáku jsou navařeny dva 12 mm široké a 6 mm silné ocelové pásy, které podepírají tlakovou nádobu zespodu.

▼B

1.6.1.2.2 Zážehový systém

Zážehový systém se skládá z Ni/Cr drátu o délce 25 m, průměru 0,6 mm a odporu 3,85 Ω/m. Drát se pomocí tyčinky o průměru 5 mm navine do tvaru cívky a připojí k elektrodám v zážehové zátce. Dvě možné podoby cívky jsou uvedeny na obrázku 3. Vzdálenost spodní strany nádoby a zážehové cívky by měla být 20 mm. Pokud nelze elektrody nastavit, měly by být konce zážehového drátu mezi cívkou a dnem tlakové nádoby izolovány keramickým pláštěm. Drát se zahřívá konstantním stejnosměrným proudem nejméně 10 A.

1.6.2 Provedení zkoušky ⁽¹⁾

Zařízení vybavené snímačem tlaku a zahřívacím systémem, avšak bez průtržného disku, se vloží do stojanu zážehovou zátkou dolů. Ve skleněné kádince se pomocí skleněného míchadla smíchá 2,5 g kapaliny, která má být zkoušena, s 2,5 g usušené celulosy ⁽²⁾. Z bezpečnostních důvodů by měl stát experimentátor při mísení za ochranným štítem. Pokud se směs při mísení nebo plnění vznítí, není třeba ve zkoušce pokračovat. Směs se přidává do tlakové nádoby po malých dávkách a je pěchována poklepem, přičemž je třeba zajistit, aby směs obklopovala zážehovou cívku a byla s ní v těsném kontaktu. Je důležité, aby při plnění nedošlo k deformaci cívky, neboť by to vedlo k chybným výsledkům ⁽³⁾. Do tlakové nádoby se vloží průtržný disk a zašroubuje se přídržovací zátka. Naplněná nádoba se vloží do stojanu pro provedení zkoušky průtlakovým diskem nahoru a sestava se umístí do vhodné pancéřované digestoře nebo spalovací komory. Vnější svorky zážehové zátky se připojí ke zdroji napájení o proudu 10 A. Od zahájení mísení do vpuštění proudu do cívky by nemělo uplynout více než 10 minut.

Signál snímače tlaku se zaznamenává vhodným systémem, který umožňuje jak hodnocení, tak trvalý záznam časového průběhu tlaku (např. zapisovač přechodových dějů). Směs se zahřívá do doby, než se roztrhne průtržný disk, nebo po dobu 60 sekund. Pokud se průtržný disk neroztrhne, je třeba před opatrným rozebráním zařízení nechat směs vychladnout, přičemž je třeba dávat pozor na případné zvyšování tlaku. Proveďte se pět pokusů se zkoušenou a referenční látkou (referenčními látkami). Zaznamená se doba, za kterou dojde k nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Vypočte se průměrná doba vzestupu tlaku.

V některých případech může látka vykazovat nárůst tlaku (příliš vysoký nebo příliš nízký), který necharakterizuje oxidační vlastnosti látky, a to v důsledku chemické reakce. V takových případech může být nezbytné opakovat zkoušku s inertní látkou, např. s křemelinou (infuzoriou hlinkou), namísto celulosy, aby se vyjasnil typ reakce.

⁽¹⁾ Směsi oxidujících látek musí být považovány za látky s možným nebezpečím výbuchu a musí s nimi být nakládáno opatrně.

⁽²⁾ V praxi toho lze dosáhnout přípravou směsi látky a celulosy v poměru 1:1 v množství větším než je nezbytné pro pokus; $5 \pm 0,1$ g takové směsi se poté vpraví do tlakové nádoby. Směs se připravuje čerstvá pro každý pokus.

⁽³⁾ Zejména se nesmějí dotýkat sousední závitů cívky.

▼ B**2. ÚDAJE**

Doba nárůstu tlaku u zkoušené látky a u referenční látky (referenčních látek). Doba nárůstu tlaku při zkoušce s inertní látkou, provádí-li se.

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Vypočte se průměrná doba nárůstu tlaku u zkoušené látky a u referenční látky (referenčních látek).

Vypočte se průměrná doba nárůstu tlaku při zkoušce s inertní látkou, provádí-li se.

Příklady výsledků jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Příklady výsledků ^(a)

Látka ^(b)	Průměrná doba nárůstu tlaku pro směs s celulosou v poměru 1:1 (ms)
Dichroman amonný, nasycený vodný roztok	20 800
Dusičnan vápenatý, nasycený vodný roztok	6 700
Dusičnan železitý, nasycený vodný roztok	4 133
Chloristan lithný, nasycený vodný roztok	1 686
Chloristan horečnatý, nasycený vodný roztok	777
Dusičnan nikelnatý, nasycený vodný roztok	6 250
Kyselina dusičná, 65 %	4 767 ^(c)
Kyselina chloristá, 50 %	121 ^(c)
Kyselina chloristá, 55 %	59
Dusičnan draselný, 30 % vodný roztok	26 690
Dusičnan stříbrný, nasycený vodný roztok	^(d)
Chlorečnan sodný, 40 % vodný roztok	2 555 ^(c)
Dusičnan sodný, 45 % vodný roztok	4 133
<i>Inertní látka</i>	
Voda: celulosa	^(d)

^(a) Klasifikace pro přepravu podle ustanovení OSN je uvedena v literatuře (1).

^(b) Nasycený roztok se připraví při 20 °C.

^(c) Střední hodnota z mezilaboratorních porovnávacích pokusů.

^(d) Maximální tlak 2 070 kPa nebyl dosažen.

▼ B3. **ZPRÁVA**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

- druh, složení, čistotu atd. zkoušené látky,
- koncentraci zkoušené látky,
- postup sušení použité celulosy,
- vlhkost použité celulosy,
- výsledky měření,
- výsledky zkoušek s inertní látkou, byly-li provedeny,
- vypočtené průměrné doby nárůstu tlaku,
- jakékoli odchylky od této metody s uvedením důvodů,
- všechny další doplňující informace nebo poznámky důležité pro interpretaci výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ ⁽¹⁾

Hodnocení výsledků se zakládá na těchto skutečnostech:

- a) na tom, zda došlo k samovolnému vznícení směsi zkoušené látky a celulosy,
- b) a na porovnání průměrné doby nárůstu tlaku z 690 kPa na 2 070 kPa s dobou, kterou vykazuje referenční látka (referenční látky).

Kapalina se považuje za oxidující, pokud:

- a) se směs látky a celulosy v poměru 1:1 (hmot.) samovolně vznítí, nebo
- b) je průměrná doba nárůstu tlaku směsi látky a celulosy v poměru 1:1 (hmot.) rovna průměrné době nárůstu tlaku směsi 65 % (hmot.) vodného roztoku kyseliny dusičné a celulosy nebo kratší.

S cílem vyhnout se falešně pozitivnímu výsledku je při analýze výsledků potřeba zohlednit také výsledky zkoušení látky s inertním materiálem.

⁽¹⁾ Interpretace výsledků získaných za použití více referenčních látek podle předpisů OSN je popsána v literatuře (1).

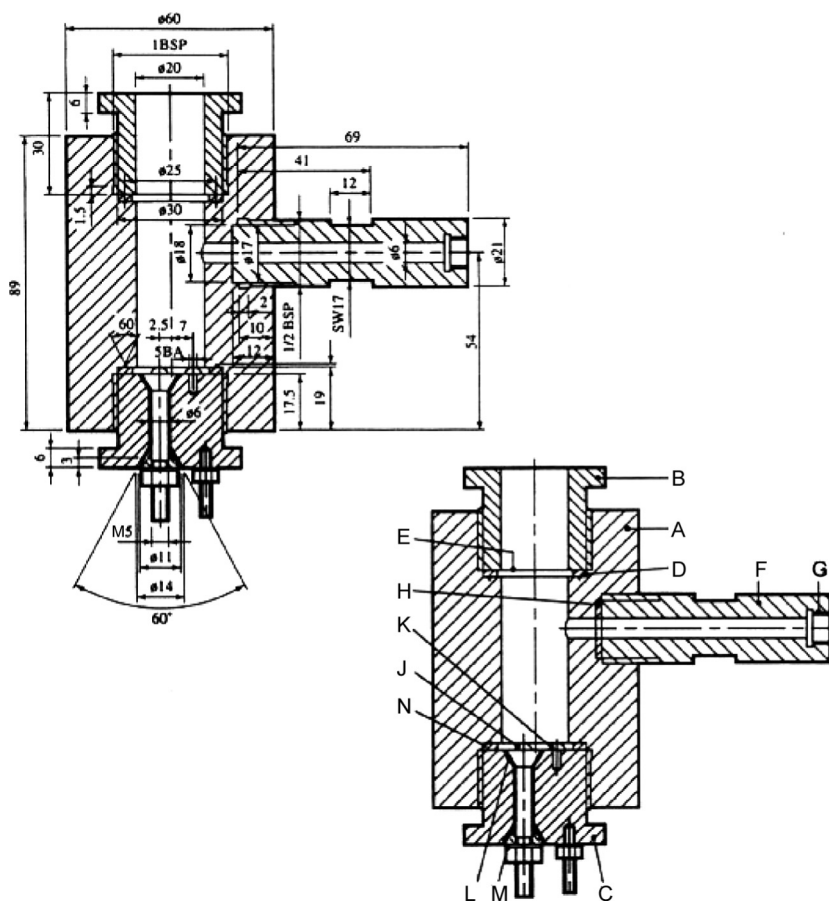
▼ B

4. LITERATURA

- 1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC. 10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Obrázek 1

Tlaková nádoba

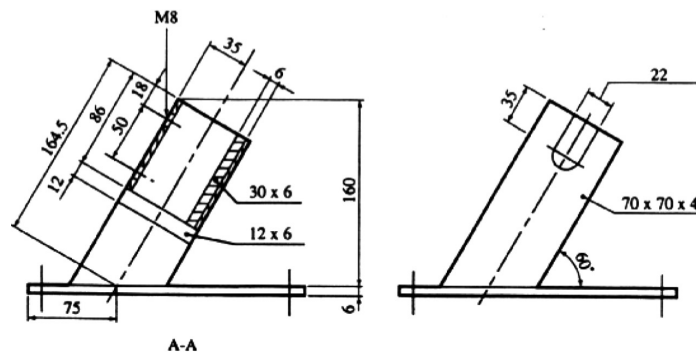
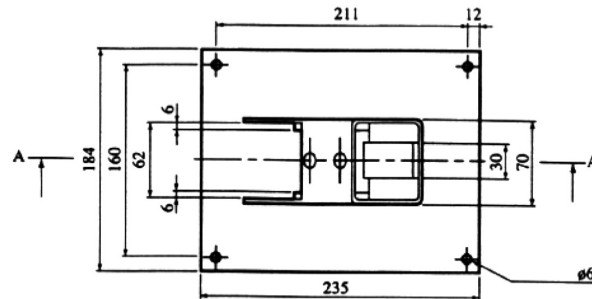


- | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| (A) Těleso tlakové nádoby | (B) Zátka přidržující průtržný disk | (C) Zažehovací zátka |
| (D) Těsnění z měkkého olova | (E) Průtržný disk | (F) Boční rameno |
| (G) Čelo čidla tlaku | (H) Těsnění | (J) Izolovaná elektroda |
| (K) Uzemňená elektroda | (L) Izolace | (M) Ocelový kužel |
| (N) Těsnicí spára | | |

▼B

Obrázek 2

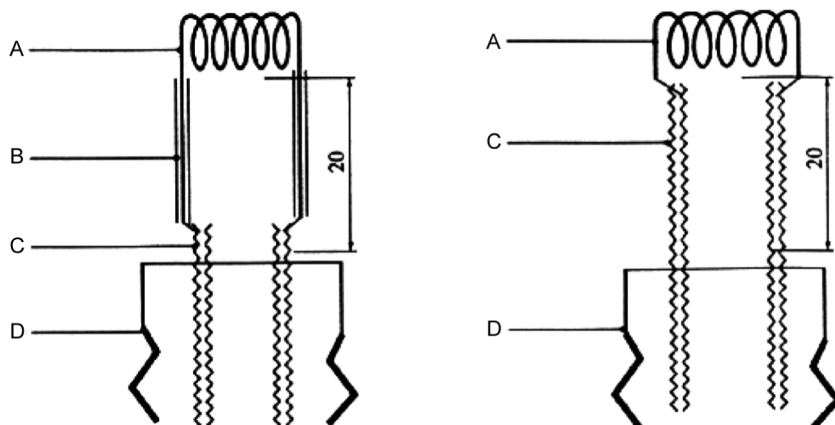
Podstavec



Obrázek 3

Zážehový systém

(A) Zážehová cívka (B) Izolace (C) Elektrody (D) Zážehová zátká



Poznámka: může být použito kterékoli z těchto dvou uspořádání.

▼ **M1****A.22 DÉLKOVĚ VÁŽENÝ STŘEDNÍ GEOMETRICKÝ PRŮMĚR VLÁKEN****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Tato metoda popisuje postup měření délkově váženého středního geometrického průměru (DVGSP) umělých minerálních vláken (UMV). Jelikož DVGSP statistického souboru bude s pravděpodobností 95 % mezi hladinami významnosti 95 % (DVGSP \pm dvě střední směrodatné chyby) vzorku, ohlášená hodnota (testová hodnota) bude nižší hladina významnosti 95 % vzorku (tj. DVGSP $- 2$ dvě střední směrodatné chyby). Metoda je založena na aktualizaci (červen 1994) návrhu průmyslového postupu HSE (Výkonný výbor pro zdraví a bezpečnost) dohodnutého na schůzce HSE a ECFIA (Evropská asociace odvětví keramických vláken) v Chesteru dne 26. září 1993 a vyvinutého druhou mezilaboratorní zkouškou (1, 2). Tato měřicí metoda může být použita pro charakterizaci průměru vláken sypkých látek či výrobků obsahujících UMV, včetně vysokotavných keramických vláken (VKV), umělých skelných vláken (USV), krystalických a polykrystalických vláken.

Délkové vážení je způsobem kompenzace vlivu rozlomení dlouhých vláken při odběru vzorků či při manipulaci s vlákny na rozložení jejich průměru. Pro měření rozložení velikosti průměrů UMV jsou použita geometrická statistická data (geometrický průměr), jelikož tyto průměry obvykle mají rozložení velikosti blízké normálnímu.

Měření délky a průměru je jak únavné, tak dlouhé, ovšem pokud se měří pouze ta vlákna, která se dotýkají nekonečně tenké čáry na zorném poli rastrovacího elektronového mikroskopu, pak je pravděpodobnost výběru daného vlákna přímo úměrná jeho délce. Jelikož tím se zohledňuje délka při délkově vážených výpočtech, jediné vyžadované měření je měření průměru a DVGSP-2SE může být vypočten uvedeným způsobem.

1.2 DEFINICE

Částice: objekt s poměrem délky k šířce menším než 3:1.

Vlákno: objekt s poměrem délky k šířce (charakteristický poměr) nejméně 3:1.

1.3 PLATNOST A OMEZENÍ

Metoda je určena pro pohled na rozdělení průměrů o středním průměru mezi 0,5 μm a 6 μm . Větší průměry mohou být měřeny pomocí menších zvětšení rastrového elektronového mikroskopu, ale tato metoda bude stále více limitována vzhledem k rozdělení jemných vláken a je-li střední průměr menší než 0,5 μm , doporučujeme měření transmisním elektronovým mikroskopem (TEM).

▼ **M1**

1.4 Princip měřicí metody

Z vláknové pokrývky či z volných sypkých vláken se odebere několik reprezentativních jádrových vzorků. Sypká vlákna jsou délkově omezena pomocí procesu drcení a reprezentativní podíl vzorku se rozpustí ve vodě. Poměrné podíly se vyloučí a přefiltrují přes polykarbonátový filtr o rozměrech pórů 0,2 µm a připraví se na pozorování pomocí technik rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM). Průměry vláken se měří při zvětšení obrazovky × 10 000 nebo vyšším ⁽¹⁾ pomocí čárové zadržovací metody, aby se získal nezaujatý odhad středního průměru. Vypočte se nižší hladina významnosti 95 % (na základě jednostranného testu), a tím se získá odhad nejnižších hodnot geometrického středního průměru vláken materiálu.

1.5 Popis měřicí metody

1.5.1 **Bezpečnostní opatření**

Je nutno minimalizovat vystavení osob zvířeným vláknům a při manipulaci se suchými vlákny je nutno používat digestoř či suchou skříň. Je nutno periodicky provádět monitoring osobní expozice pro určení efektivity kontrolních metod. Při manipulaci s UMV je nutno nosit jednorázové rukavice pro omezení podráždění kůže a pro zabránění křížové kontaminaci.

1.5.2 **Přístroje/zařízení**

- lis a lisovadla (schopná vyvinout tlak 10 MPa),
- polykarbonátové filtry s kapilárními póry o velikosti 0,2 µm (průměr 25 mm),
- membránový filtr z esteru buničiny o rozměru pórů 5 µm jako filtr záložní,
- skleněný filtrační přístroj (či použitelné filtrační systémy) pro filtry o průměru 25 cm (např. skleněná mikroanalytická sada Millipore typ XX10 025 00),
- čerstvá voda destilovaná přes filtr o rozměru pórů 0,2 µm pro odstranění mikroorganismů,
- katodový rozprašovač s anodou ze zlata či ze zlata/palladia,
- rastrovací elektronový mikroskop schopný rozlišení až 10 nm a pracující při zvětšení × 10 000,
- různé: stěrky, skalpel typu 24, pinzeta, tubusy SEM, uhlíkové lepidlo či uhlíková lepicí páska, stříbrná tyčinka,
- ultrazvuková sonda či ultrazvuková lázeň na desce laboratorního stolu,
- odběrač vzorků sedimentu či korkovrt pro odebírání jádrových vzorků z pokrývky UMV.

⁽¹⁾ Tato hodnota zvětšení je uvedena pro vlákna o průměru 3 µm, pro vlákna o průměru 6 µm je vhodnější zvětšení × 5 000.

▼ M1**1.5.3 Postup měření****1.5.3.1 Odběr vzorků**

U pokrývek a roun se používá odběrač vzorků velikosti 25 mm či korkovrt pro odebrání vzorků z řezu. Vzorky by měly být rovnoměrně rozprostřeny po šířce a z malé délky pokrývky, nebo by měly být odebrány z náhodných ploch, je-li k dispozici pokrývka o velké délce. Stejně zařízení může být použito pro odběr náhodných vzorků z volných vláken. Je-li to možné, mělo by být odebráno šest vzorků tak, aby byly zohledněny prostorové odchylky v sypkém materiálu.

Těchto šest jádrových vzorků je nutno rozdrtit v lisovadle o průměru 50 mm tlakem 10 MPa. Materiál se rozmíchá stěrkou a znovu se stlačí tlakem 10 MPa. Poté se materiál vyjme z lisovadla a umístí v utěsněné skleněné láhvi.

1.5.3.2 Příprava vzorku

Je-li to nutné, organické pojivo může být odstraněno umístěním vláken do pece o teplotě 450 °C po dobu jedné hodiny.

Vytvarujte vzorek do kužele a rozčtvrťte jej (to by mělo být provedeno uvnitř prachové skříně).

Přidejte stěrkou malé množství vzorku (< 0,5 g) do 100 ml čerstvé destilované vody, která byla přefiltrována přes membránový filtr 0,2 µm (je možno použít jiný zdroj velmi čisté vody, ukáže-li se být uspokojivý). Řádně rozmíchejte vzorek pomocí ultrazvukové sondy provozované s výkonem 100 W a vyladěné tak, aby se objevila kavitace (není-li sonda k dispozici, postupujte takto: opakovaně vzorek protřepete a otočte jej na dobu 30 sekund; po dobu pěti minut vystavte vzorek ultrazvuku v ultrazvukové lázni; poté opět několikrát protřepete a otočte vzorek po dobu dalších 30 sekund).

Ohned po promíchání vláken odeberte několik poměrných dílů (např. tři poměrné části o 3, 6 a 10 ml) pomocí široké pipety (o objemu 2–5 ml).

Vakuově přefiltrujte každý poměrný díl přes polykarbonátový filtr 0,2 µm s pomocí podpůrného filtru MEC o velikosti pórů 5 µm pomocí skleněného filtračního tunelu 25 mm s válcovou nádrží. Přibližně 5 ml filtrované destilované vody by mělo být umístěno do tunelu a poměrný díl by měl být pomalu pipetován do vody, okraj pipety se drží pod prohnutou čoučkou. Po pipetování musí být pipeta a nádrž řádně propláchnuta, jelikož tenká vlákna mají snahu ulpívat dále na povrchu.

Opatrně odstraňte filtr a oddělte jej od podpůrného filtru před jeho umístěním do obalu za účelem jeho vysušení.

▼ **M1**

Uřízněte čtvrtinu či polovinu filtrované části filtrovaného depozitu pomocí skalpelu typu 24 trhnutím. Opatrně připojte odříznutou část k bloku SEM pomocí lepicí uhlíkové pásky či uhlíkového lepidla. Je nutno použít alespoň na třech místech stříbrnou tyčinku pro zlepšení elektrického kontaktu na okrajích filtru a bloku. Je-li lepidlo/stříbrná tyčinka suchá, katodově rozprašte cca 50 nm zlata či zlata/palladia na povrch depozitu.

1.5.3.3 *Kalibrace a provoz SEM*1.5.3.3.1 *Kalibrace*

Kalibrace SEM by měla být zkontrolována minimálně jednou za týden (ideálně jednou denně) pomocí certifikované kalibrační mřížky. Kalibrace musí být kontrolována vůči certifikovanému standardu a není-li naměřená hodnota (SEM) v rozsahu $\pm 2\%$ hodnoty certifikované, potom musí být kalibrace SEM seřizena a znovu zkontrolována.

SEM by měl být schopen rozlišit alespoň minimální viditelný průměr 0,2 μm pomocí reálné vzorkovací matice při zvětšení $\times 2\,000$.

1.5.3.3.2 *Provoz*

SEM by měl být provozován při zvětšení 10 000 ⁽¹⁾ za podmínek, které dávají dobré rozlišení při přijatelném snímku při pomalých snímacích rychlostech např. 5 sekund na rámeček. I když se provozní požadavky různých SEM mohou lišit, obecně by mělo být použito urychlovací napětí 5–10 keV s nastavením malé velikosti bodu a krátkou pracovní vzdáleností; tím se získá nejlepší viditelnost a rozlišení s materiály o relativně nízkých atomových hmotnostech. Při provádění lineárního příčného pohybu musí být použit sklon 0° pro minimalizaci přeoštění, nebo má-li SEM eucentrickou fázi, musí být použita eucentrická pracovní vzdálenost. Menší zvětšení může být použito, neobsahuje-li materiál vlákna o malých průměrech a průměry vláken jsou velké ($> 5\ \mu\text{m}$)

1.5.3.4 *Třídění dle rozměrů*1.5.3.4.1 *Pozorování při malém zvětšení pro vyhodnocení vzorku*

Zpočátku by měl být vzorek pozorován při malém zvětšení pro ujištění se o rozdrčení velkých vláken a pro vyhodnocení hustoty vláken. V případě velkého rozdrčení je doporučeno připravit nový vzorek.

Kvůli statistické přesnosti je nezbytné změřit minimální počet vláken a může se zdát být výhodná vysoká hustota vláken, jelikož pozorováním prázdných polí ztrácíme čas a nijak k analýze nepřispíváme. Ovšem při přetížení filtru je obtížné změřit všechna měřitelná vlákna a jelikož malá vlákna mohou být zakryta vlákny většími, mohou být vynechána.

⁽¹⁾ U vláken 3 μm viz předchozí poznámka.

▼ **M1**

Je-li hustota vláken větší než 150 vláken na milimetr lineárního příčného posuvu, může dojít k nežádoucímu vlivu nadhodnocení DVGSP. Na druhé straně malá koncentrace vláken zvyšuje dobu analýzy a často je nákladově efektivní připravit vzorek v hustotou vláken blíže hodnotě optimální, než zůstat u počítání vláken o menších koncentracích. optimální hustota vláken by měla dávat průměrně jedno či dvě počítatelná vlákna na pole z záběru o zvětšení 5 000. Nicméně optimální hustota bude záviset na velikosti (průměru) vláken, takže je nezbytné, aby obsluha používala odborný úsudek za účelem rozhodnutí, zda je hustota vláken blízko hodnotě optimální či nikoliv.

1.5.3.4.2 **Délkové vážení průměrů vláken**

Pouze ta vlákna, která se dotýkají (nebo kříží) (nekonečně) tenkou čarou nakreslenou na obrazovce SEM, se započítávají. Z tohoto důvodu je přes střed obrazovky nakreslena horizontální (či vertikální) čára.

Alternativně může být ve středu obrazovky umístěn jediný bod a zahájí se spojitě snímání v jednom směru přes filtr. Každé vlákno o charakteristickém poměru větším než 3:1 dotýkající se při procházející tímto bodem má změřený a zaznamenaný průměr.

1.5.3.4.3 **Třídění vláken**

Doporučuje se měření minimálně 300 vláken. Každé vlákno je měřeno pouze jednou v bodě průsečíku s čarou či bodem nakresleným na snímku (nebo blízko průsečíku, jsou-li okraje vlákna zakrytá). Jestliže se objeví vlákna s nerovnoměrným průřezem, je nutno použít měření reprezentující střední průměr vlákna. Je nutno dbát na definování okraje a měřit nejkratší vzdálenost mezi okraji vláken. Třídění může být prováděno on-line, nebo off-line na uložených snímcích či fotografiích. Doporučeny jsou poloautomatické snímkovací měřicí systémy, které stahují data přímo do tabulky, jelikož šetří čas, eliminují chyby v prepisech a mohou být zautomatizovány výpočty.

Konce dlouhých vláken by měla být zkontrolovány při malém zvětšení, aby bylo zajištěno, že se nepřesunou zpět do měřicího zorného pole a že budou měřeny pouze jednou.

2. **DATA**2.1 **NAKLÁDÁNÍ S VÝSLEDKY**

Průměry vláken obvykle nemají normální rozdělení. Ovšem provedením logaritmické transformace je možno získat rozdělení, které se blíží normálnímu.

Vypočtete aritmetický průměr (střední (mean) $\ln D$) a standardní odchylku ($SD_{\ln D}$) logaritmem o základu e hodnoty ($\ln D$) průměrů vláken (D).

$$\text{mean } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

▼ M1

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{mean } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardní odchylka je dělena druhou odmocninou počtu měření (n), čímž získáme střední směrodatnou chybu ($SE_{\ln D}$).

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Odečtete od průměrné hodnoty dvojnásobek střední směrodatné chyby a vypočtete exponenciál této hodnoty (průměr minus dvě střední směrodatné chyby), což dává střední geometrickou hodnotu minus dvě geometrické směrodatné chyby.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{mean } \ln D - 2SE_{\ln D})} \quad (4)$$

3. ZPRÁVY**ZPRÁVA O MĚŘENÍ**

Zpráva o měření by měla obsahovat minimálně tyto informace:

- hodnotu DVGSP-2SE,
- veškeré odchylky a zejména ty, které mohou mít vliv na přesnost výsledků, s patřičným odůvodněním.

4. LITERATURA

- (1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Únor 1999.
- (2) G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/-07. Projekt R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼B**ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY A JINÝCH ÚČINKŮ NA ZDRAVÍ**

OBSAH

OBEČNÝ ÚVOD

- B.1.a AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA FIXNÍ DÁVKY
- B.1.b AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY
- B.2 AKUTNÍ TOXICITA (INHALAČNÍ)
- B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)
- B.4 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI
- B.5 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ/LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI
- B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE
- B.7 ORÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.8 INHALAČNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.9 DERMÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.10 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE U SAVCŮ *IN VITRO*
- B.11 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ *IN VIVO*
- B.12 MUTAGENITA – TEST SAVČÍCH ERYTROCYTÁRNÍCH MIKROJADER *IN VIVO*
- B.13/14 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA REVERZNÍ MUTACE S BAKTERIEMI
- B.15 ZKOUŠENÍ MUTAGENITY A SCREENING KARCINOGENITY – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.16 ZKOUŠKA NA MITOTICKOU REKOMBINACI U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.17 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO*
- B.18 ZKOUŠKA NA POŠKOZENÍ A REPARACI DNA – NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA – V SAVČÍCH BUŇKÁCH *IN VITRO*
- B.19 ZKOUŠKA NA VÝMĚNU SESTERSKÝCH CHROMATID *IN VITRO*
- B.20 ZKOUŠKA NA RECESIVNÍ LETÁLNÍ MUTACE VÁZANÉ NA POHLAVÍ U *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

- B.21 ZKOUŠKY NA TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK *IN VITRO*
- B.22 DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH
- B.23 ZKOUŠKA NA CHROMOSOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ
- B.24 SPOT TEST NA MYŠÍCH
- B.25 ZKOUŠKA NA DĚDIČNOU TRANSLOKACI U MYŠÍ
- B.26 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA HLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE NA HLODAVCÍCH)
- B.27 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA NEHLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.28 STUDIE SUBCHRONICKÉ DERMÁLNÍ TOXICITY (90DENNÍ OPAKOVANÁ KOŽNÍ APLIKACE NA HLODAVCÍCH)
- B.29 STUDIE SUBCHRONICKÉ INHALAČNÍ TOXICITY (90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE NA HLODAVCÍCH)
- B.30 ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY
- B.31 STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY
- B.32 ZKOUŠKA KARCINOGENITY
- B.33 KOMBINOVANÁ ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY A KARCINOGENITY
- B.34 JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI
- B.35 DVOUGENERAČNÍ STUDIE REPRODUKČNÍ TOXICITY
- B.36 STUDIE TOXIKOKINETIKY
- B.37 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU PO AKUTNÍ EXPOZICI
- B.38 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU – 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE
- B.39 ZKOUŠKA NA NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA (UDS) V JATERNÍCH BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VIVO*
- B.40 LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)
- B.40.a LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA POMOCÍ MODELU LIDSKÉ KŮŽE

▼B

- B.41 ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*
- B.42 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN
- B.43 ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVCÍCH
- B.44 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VIVO*
- B.45 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VITRO*
- B.46 DRÁŽDĚNÍ KŮŽE *IN VITRO*: ZKOUŠKA POMOCÍ MODELU REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS
- B.47 ZKUŠEBNÍ METODA PRO ZÁKAL A PROPUSTNOST ROHOVKY U SKOTU PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI
- B.48 ZKUŠEBNÍ METODA ODDĚLENÉHO KUŘECÍHO OKA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI

▼B**OBECNÝ ÚVOD****A. CHARAKTERIZACE ZKOUŠENÉ LÁTKY**

Složení zkoušené látky, včetně hlavních nečistot, a její relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti, včetně stálosti, by měly být známy před zahájením jakékoli studie toxicity.

Fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené látky poskytují důležité informace pro výběr způsobu podávání, pro návrh každé jednotlivé studie a pro manipulaci se zkoušenou látkou a její uchovávání.

Zahájení studie by měl předcházet vývoj analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení zkoušené látky (pokud možno včetně hlavních nečistot) v dávkovacím médiu a v biologickém materiálu.

Veškeré informace týkající se identifikace, fyzikálně-chemických vlastností, čistoty a chování zkoušené látky by měly být obsaženy v protokolu o zkoušce.

B. PÉČE O ZVÍŘATA

Při zkoušení toxicity jsou důležité přísná kontrola podmínek prostředí a správná péče o zvířata.

i) Podmínky chovu

Podmínky chovu v prostorech nebo klecích pro pokusná zvířata by měly vyhovovat testovacím druhům. Pro potkany, myši a morčata jsou vhodnými podmínkami teplota místnosti 22 ± 3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %; pro králíky se doporučuje teplota 20 ± 3 °C a relativní vlhkost 30 až 70 %.

Některé experimentální techniky jsou zvláště citlivé na vliv teploty a v takových případech jsou v popisu zkušební metody uvedeny podrobnosti o vhodných podmínkách. Při všech sledováních toxic-
kých účinků by měly být zaznamenávány údaje o teplotě a vlhkosti a měly by být zahrnuty do závěrečné zprávy o studii.

Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Podrobnosti o světelném režimu by měly zaznamenány a uvedeny v konečné zprávě studie.

Není-li v metodě uvedeno jinak, měla by být zvířata chována jednotlivě nebo umístěna v klecích po malých skupinách stejného pohlaví; jsou-li zvířata v klecích po skupinách, nemělo by být chováno v jedné kleci více než pět zvířat.

Ve zprávách o experimentech na zvířatech je důležité uvést typ použité klece a počet zvířat chovaných v každé kleci jak během expozice chemické látky, tak během kterékoliv další doby pozorování.

▼ Bii) *Podmínky krmení*

Strava by měla splňovat veškeré požadavky výživy pro příslušný testovací druh. Pokud jsou zkoušené látky podávány v potravě, může být nutriční hodnota snížena interakcí látky s některou složkou potravy. Možnost takové reakce by měla být zohledněna při interpretaci výsledků zkoušky. Může být použita konvenční laboratorní strava s neomezeným přístupem k pitné vodě. Výběr potravy se může řídit potřebou zajistit vhodné přimíchání zkoušené látky, pokud je podávána touto metodou.

Příměsi v potravě, jejichž vliv na toxicitu je znám, nesmí být přítomny v koncentracích, ve kterých by se vliv projevil.

C. **ALTERNATIVNÍ ZKOUŠKY**

Vědeckým cílem Evropské unie je vývoj a validace alternativních metod, které mohou poskytnout stejnou úroveň informací jako současné zkoušky na zvířatech, při nichž se však použije méně zvířat, způsobí méně utrpení nebo se v nich použití zvířat zcela vypouští.

Hned po svém uvedení do praxe musí být tyto metody použity, kdykoli je to možné, pro charakterizaci nebezpečnosti a následnou klasifikaci a označování látek z hlediska jejich nebezpečnosti.

D. **HODNOCENÍ A INTERPRETACE**

Při hodnocení a interpretaci zkoušek musí být vzaty v úvahu určité meze, nakořl lze výsledky studií na zvířatech a *in vitro* extrapolovat na člověka, a proto lze pro potvrzení výsledků zkoušení použít poznatky o nepříznivých účincích na člověka, pokud jsou k dispozici.

E. **LITERATURA**

Tyto metody jsou většinou vyvinuty v rámci programu OECD pro zkušební pokyny a měly by být prováděny v souladu s principy správné laboratorní praxe, aby bylo zajištěno co nejširší „vzájemné uznávání údajů“.

Další podobnější informace lze získat v pokynech OECD a v příslušné literatuře publikované jinde.

▼B**B.1.a AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA FIXNÍ DÁVKY****1. METODA**

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 420 (2001).

1.1 ÚVOD

Tradiční metody hodnocení akutní toxicity používají jako koncový bod uhynutí zvířat. V roce 1984 navrhla Britská toxikologická společnost nový přístup k testování akutní toxicity založený na podávání řady fixních dávek (1). Tento přístup jako koncový bod nepoužíval uhynutí zvířat, nýbrž se opíral o pozorování jasných příznaků toxicity u jedné z řady fixních dávek. Po provedení britských (2) a mezinárodních (3) validačních studií *in vivo* byl tento postup v roce 1992 přijat jako zkušební metoda. Následně byly pomocí matematických modelů v řadě studií (4, 5, 6) vyhodnoceny statistické vlastnosti metody fixní dávky. Studie *in vivo* a modelové studie společně prokázaly, že metoda je reprodukovatelná, vyžaduje méně zvířat, působí menší utrpení než tradiční metody a dokáže látky zařadit podobně jako jiné zkušební metody akutní toxicity.

Poučení týkající se výběru nejvhodnější zkušební metody k danému účelu obsahuje text Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (7). V tomto dokumentu jsou také uvedeny doplňující informace o provádění a analýze zkušební metody B.1.a.

Podstatou metody je použití pouze středně toxických dávek v hlavní studii, dávky, u nichž se očekává, že budou letální, by neměly být podávány. Také není nutné podávat dávky, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při analýze výsledků se hodnotí jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utrácení umírajících nebo značně trpících zvířat a poučení týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem samostatného dokumentu (8).

Metoda poskytuje informace o nebezpečných vlastnostech a umožňuje zařazení a klasifikaci látky podle globálně harmonizovaného systému (GHS) klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (9).

Zkušební laboratoř by před provedením studie měla vzít v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, výsledky jiných zkoušek toxicity dané látky, *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru vhodné výchozí dávky.

▼ B

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 hodin.

Opožděný úhyn: znamená, že zvíře během 48 hodin neuhyne ani nejeví známky umírání, ale uhynie později během čtrnáctidenní doby pozorování.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. mg/kg).

Zjevná toxicita: obecný pojem popisující zřetelné příznaky toxicity, které se projeví po podání zkoušené látky (příklady viz (3)), kdy při podání další vyšší fixní dávky lze u většiny pokusných zvířat očekávat značné bolesti a přetrvávající známky značného utrpení, stavu agónie (kritéria uvádí dokument Humane Endpoints Guidance (8)) nebo pravděpodobné uhynutí.

GHS: Globálně harmonizovaný systém klasifikace chemických látek a směsí. Společný projekt Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (lidské zdraví a životní prostředí), Odborného výboru OSN pro přepravu nebezpečného zboží (fyzikálně-chemické vlastnosti) a Mezinárodní organizace práce (informace o nebezpečnosti) koordinovaný Meziorganizačním programem pro řádné nakládání s chemikáliemi (IOMC).

Blížící se uhynutí: stav agónie nebo uhynutí je očekáván před další plánovanou dobou pozorování. Příznaky svědčící o tomto stavu u hlodavců mohou zahrnovat křeče, polohu na boku, polohu vleže a třes (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

LD₅₀ (střední letální dávka): statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, u níž lze očekávat, že způsobí uhynutí 50 % zvířat, jimž byla podána orální cestou. Hodnota LD₅₀ se vyjadřuje v hmotnosti zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (mg/kg).

Limitní dávka: označuje nejvyšší přípustnou dávku (2 000 nebo 5 000 mg/kg).

Stav agónie: označuje stav úhynu nebo neschopnost přežít, ani když je zvíře léčeno (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

Předvídatelný úhyn: přítomnost klinických příznaků svědčících o smrti, přičemž doba úhynu je známá a předchází plánovanému ukončení zkoušky v budoucnosti, např. neschopnost dojít k vodě nebo potravě (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (8)).

▼ B**1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY**

Skupinám zvířat stejného pohlaví se postupně podá fixní dávka 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výjimečně lze uvažovat o další fixní dávce 5 000 mg/kg, viz část 1.6.2). Výchozí úroveň dávky se zvolí na základě orientační studie jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá některé příznaky toxicity, aniž způsobí závažné toxické účinky nebo úhyn. Klinické příznaky a stavy spojené s bolestí, utrpením a blížícím se úhynem jsou podrobně popsány v samostatném dokumentu OECD (8). Dalším skupinám zvířat mohou být podány vyšší nebo nižší fixní dávky podle přítomnosti nebo nepřítomnosti příznaků toxicity nebo uhynutí. Podle tohoto postupu se pokračuje, dokud nebude zjištěna dávka vyvolávající zřejmou toxicitu nebo není pozorováno více než jedno uhynutí, anebo pokud nejsou ani při nejvyšší dávce zjištěny žádné účinky nebo pokud dochází k úhynům při nejnižší dávce.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.4.1 Výběr druhu zvířat**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice (7). Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD₅₀ ukazuje, že mezi pohlavími je obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, ale v případech, v nichž jsou rozdíly pozorovány, jsou samice obecně nepatrně citlivější (10). Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 měsíců staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu ± 20 % střední hmotnosti zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídat 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky, ale počet zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého zvířete.

1.4.3 Příprava zvířat

Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí, a chovají se v klecích minimálně pět dnů před začátkem podávání látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám.

▼B**1.4.4 Příprava dávek**

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný koncový produkt nebo směs, může však být použití nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, pro hodnocení následného rizika této látky užitečnější a je vyžadováno některými kontrolními orgány. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, avšak u vodních roztoků připadá v úvahu i dávka 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodního roztoku/suspenze/-emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/-emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP**1.5.1 Podávání dávek**

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze ji podat po menších množstvích během nejvýše 24 hodin.

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu (např. potkanům by se neměla podávat přes noc, myším 3–4 hodiny), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladování se zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu k potravě na dalších 3–4 hodin u potkanů nebo 1–2 hodiny u myši. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

1.5.2 Orientační studie

Cílem orientační studie je umožnit výběr vhodné výchozí dávky pro hlavní studii. Zkoušená látka se podává jednotlivým zvířatům postupně podle vývojového diagramu v příloze 1. Orientační studie je ukončena, jakmile lze stanovit výchozí dávku pro hlavní studii (nebo pokud je při nejnižší fixní dávce pozorován úhyn).

Výchozí dávka orientační studie se zvolí z fixních dávek ve výši 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg jako dávka, u níž se očekává, že vyvolá zřejmou toxicitu, přičemž toto očekávání je pokud možno založeno na důkazech z údajů získaných *in vivo* a *in vitro* ze stejné chemické látky a strukturně příbuzných látek. Pokud takové informace neexistují, výchozí dávka činí 300 mg/kg.

Mezi podáním dávky každému zvířeti se ponechá doba minimálně 24 hodin. Všechna zvířata se pozorují minimálně 14 dnů.

▼B

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými konkrétními předpisy, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg (viz dodatek 3). S ohledem na dobré zacházení se zvířaty se pokusy na zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000–5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takového pokusu mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví zvířat nebo životního prostředí.

V případech, kdy zvíře, u něhož je látka zkoušena v nejnižší fixní úrovni dávky (5 mg/kg), v orientační studii uhynie, obvykle se studie ukončí a látka přiřadí do kategorie 1 GHS (jak je uvedeno v příloze 1). Pokud je však vyžadováno další potvrzení klasifikace, může být proveden tento volitelný doplňkový postup: druhému zvířeti se podá dávka 5 mg/kg. Pokud toto druhé zvíře uhynie, bude kategorie 1 GHS potvrzena a studie okamžitě ukončena. Pokud druhé zvíře přežije, dávka 5 mg/kg se podá maximálně třem dalším zvířatům. Jelikož riziko úhynu bude vysoké, měla by být látka zvířatům podávána postupně, aby bylo zajištěno dobré zacházení se zvířaty. Časový interval mezi dávkami podanými jednotlivým zvířatům by měl být dostatečný na to, aby bylo možné stanovit, zda zvíře, jemuž byla látka podána dříve, pravděpodobně přežije. Pokud dojde k úhynu druhého zvířete, posloupnost podávání se okamžitě ukončí a látka nebude podána žádnému dalšímu zvířeti. Vzhledem k tomu, že výskyt druhého úhynu (bez ohledu na počet zvířat, na nichž byla látka v době ukončení zkoušena) spadá do výsledku A (2 nebo více úhynů), postupuje se podle pravidla klasifikace v příloze 2 s fixní dávkou 5 mg/kg (kategorie 1, pokud se vyskytnou dva a více úhynů nebo kategorie 2, pokud se nevyskytne více než 1 úhyn). Navíc je v příloze 4 uvedeno poučení týkající se klasifikace v rámci systému EU, dokud nebude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

1.5.3 Hlavní studie

1.5.3.1 *Počet zvířat a úrovně dávek*

Kroky, podle kterých se má postupovat po provedení zkoušek s výchozí úrovní dávky, jsou uvedeny ve vývojovém diagramu v příloze 2. Bude nutné zvolit jeden ze tří postupů: buď zkoušení ukončit a stanovit odpovídající klasifikační třídu nebezpečnosti, nebo provést zkoušky s vyšší fixní dávkou, nebo zkoušky s nižší fixní dávkou. S ohledem na ochranu zvířat se v hlavní studii znovu nepoužije úroveň dávky, která v orientační studii vedla k uhynutí (viz dodatek 2). Zkušenosti ukázaly, že nejpravděpodobnějším výsledkem u výchozí úrovně dávky bude, že látku lze klasifikovat bez nutnosti dalších zkoušek.

Obvykle se pro každou zkoumanou úroveň dávky použije celkem pět zvířat stejného pohlaví. Mezi těmito pěti zvířaty bude jedno zvíře z orientační studie, jemuž byla podána zvolená úroveň dávky, a další čtyři zvířata (kromě výjimečných případů, kdy úroveň dávky použité v hlavní studii nebyla součástí orientační studie).

Časový interval mezi podáváním jednotlivé výše dávky závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Expozice zvířat další dávkou bude odložena, dokud nebude jisté, že zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila. Mezi jednotlivými dávkami se v případě potřeby doporučuje ponechat dobu 3 nebo 4 dnů, aby bylo umožněno pozorování zpožděné toxicity. Časový interval lze podle potřeby upravit, např. v případě neprůkazné reakce.

▼ B

Při zvažování použití nejvyšší fixní dávky 5 000 mg/kg se postupuje podle metody popsané v příloze 3 (viz také 1.6.2).

1.5.3.2 Limitní zkouška

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo produktech s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, bude provedena hlavní zkouška.

Podle obvyklého postupu slouží jako limitní zkouška pro tyto pokyny výchozí dávka orientační studie 2 000 mg/kg (nebo výjimečně 5 000 mg/kg), po níž následuje podání této výše dávky dalším čtyřem zvířatům.

1.6 POZOROVÁNÍ

Po podání dávky se zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 hodin, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 hodinám, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Bude stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity (11). Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou jednotlivě, pro každé zvíře.

Další pozorování budou nutná, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Vezmou se v úvahu principy a kritéria shrnuté v textu Humane Endpoints Guidance Document (8). Zvířata ve stavu agónie a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 Tělesná hmotnost

Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotnosti a zaznamenají se. Na konci zkoušky se zvířata, která přežila, zváží a poté humánně utratí.

▼ B1.6.2 **Patologie**

Všechna pokusná zvířata (včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty) se pitvají. U každého zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické patologie, u zvířat, která přežila 24 nebo více hodin po prvním podání dávky, protože mohou poskytnout užitečné informace.

2. **ÚDAJE**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3. **ZPRÁVY**3.1 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),
- identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,
- počet, stáří a pohlaví zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),
- původ, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,
- podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně objemu dávek a době podávání,
- podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),
- zdůvodnění výběru výchozí dávky.

▼ B

Výsledky:

- údaje o reakcích každého zvířete a o výši jeho dávky (tj. počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně úhynů, povahy, závažnosti a trvání účinků), ve formě tabulky,
- údaje o tělesné hmotnosti a jejích změnách ve formě tabulky,
- hmotnosti jednotlivých zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,
- datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,
- časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého zvířete, a zda byly vratné,
- pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

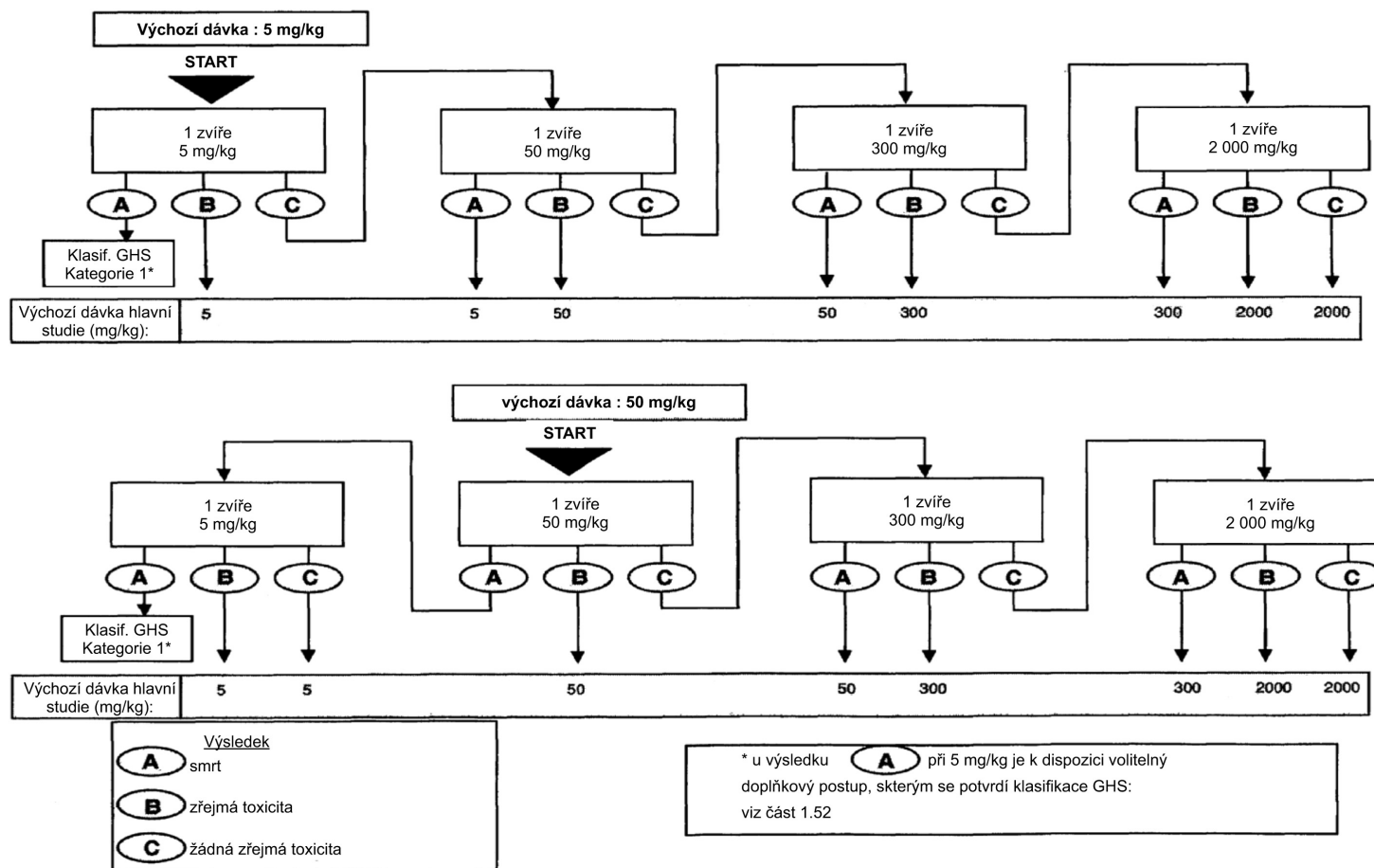
4. LITERATURA

- 1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85–92.
- 2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279–291.
- 3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469–482.
- 4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313–324.
- 5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315–323. *Human Exptl. Toxicol.*
- 6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183–196.
- 7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris
- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

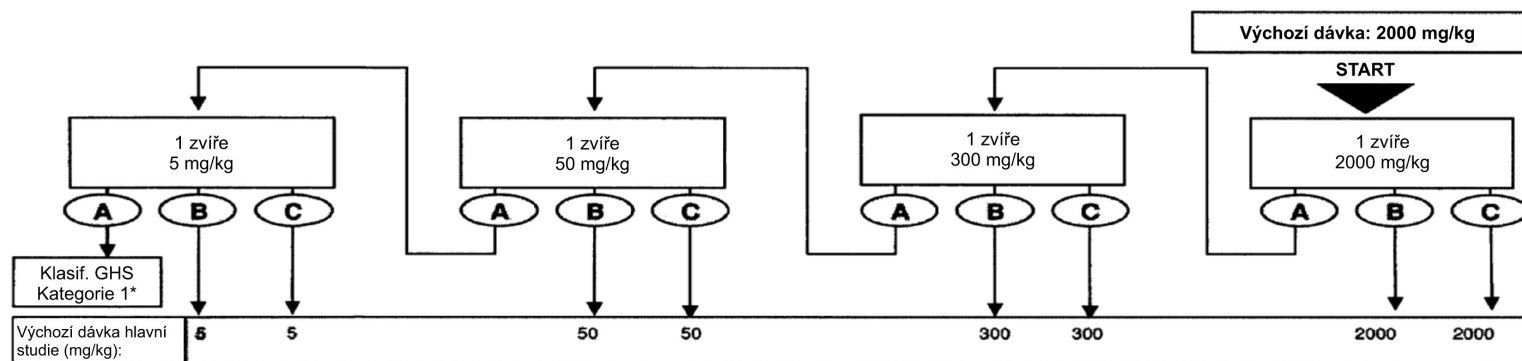
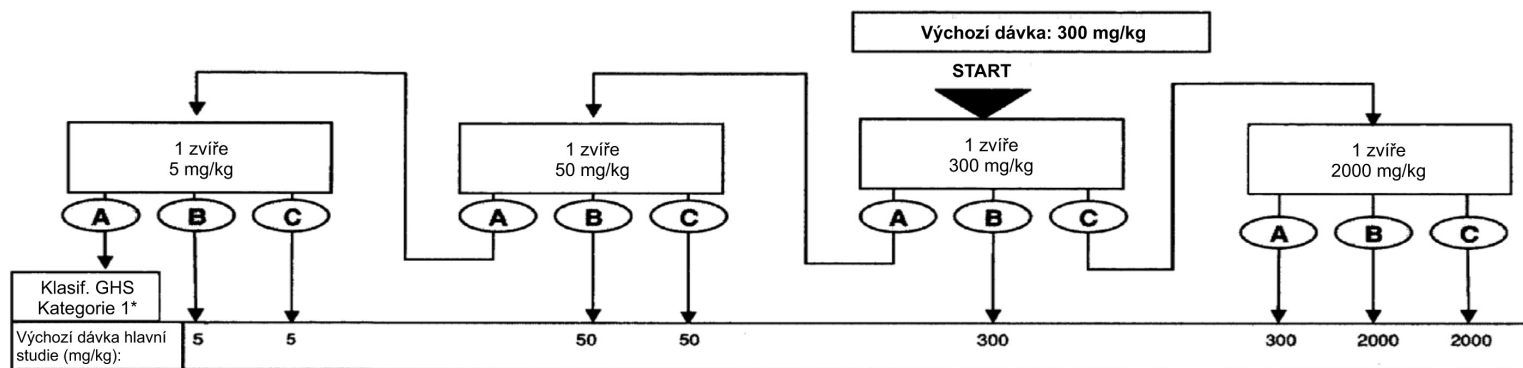
▼B

- 9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [<http://webnet1.oecd.org/oeed/-pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- 10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K. A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J. A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223–231.
- 11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO ORIENTAČNÍ STUDIÍ



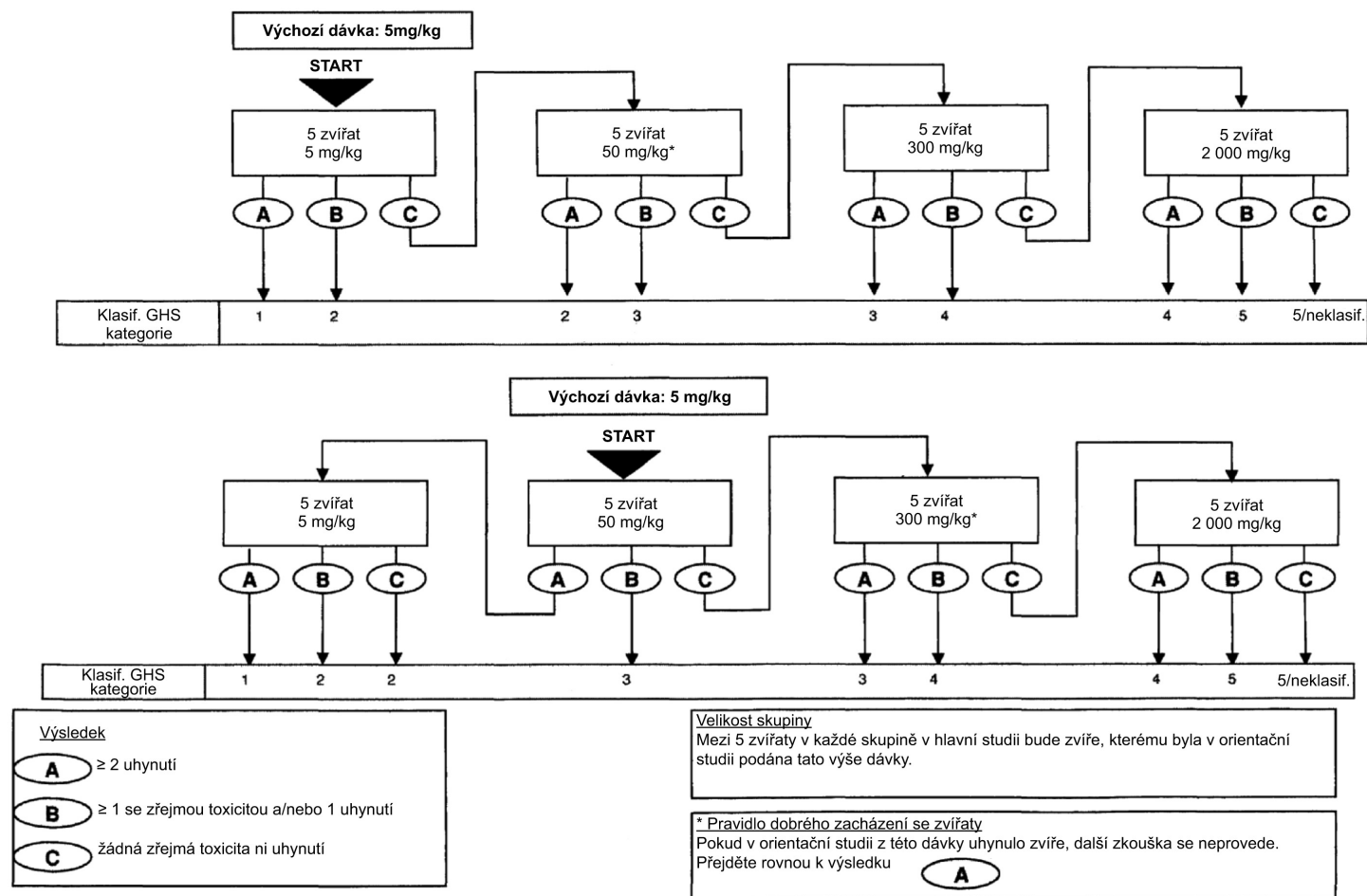
▼B



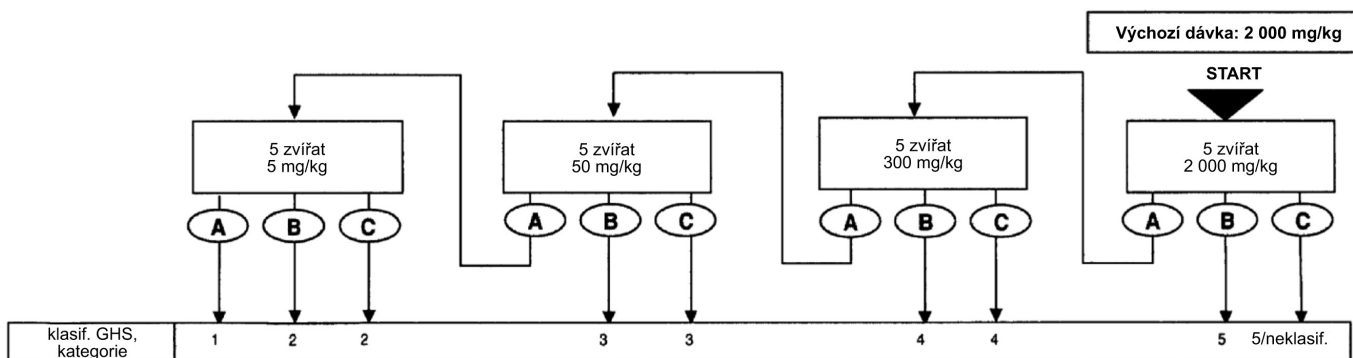
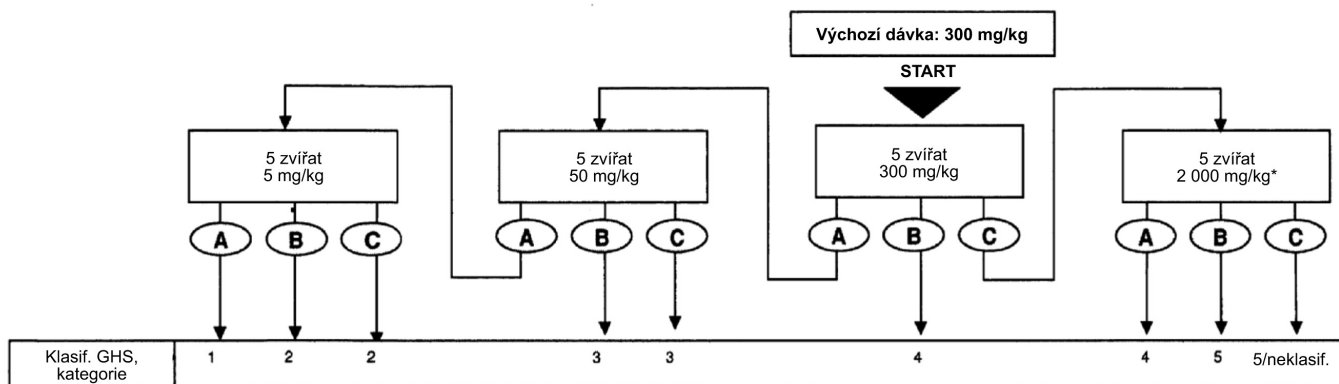
Výsledek
(A) smrt
(B) zřejmá toxicita
(C) žádná zřejmá toxicita

* u výsledku (A) při 5 mg/kg je k dispozici volitelný doplňkový postup, kterým se potvrdí klasifikace GHS: viz část 1.5.2

VÝVOJOVÝ DIAGRAM PRO HLAVNÍ STUDII



▼B



Výsledek

A ≥ 2 uhynutí

B ≥ 1 se zřejmou toxicitou a/nebo 1 uhynutí

C žádná zřejmá toxicita

Velikost skupiny

Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, kterému byla v orientační studii podána tato výše dávky.

* Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty

Pokud v orientační studii z této dávky uhynulo zvíře, další zkouška se neprovede. Přejděte rovnou k výsledku **A**



DODATEK 3

KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI HODNOTAMI LD₅₀ PŘESAHUJÍCÍMI 2 000 MG/KG BEZ NUTNOSTI ZKOUŠENÍ

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD₅₀ nebo LD₅₀ ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušené látky lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (v GHS kategorie 5) v těchto případech:

- a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze způsobů zkoušení uvedeného v příloze 2, a to v závislosti na výskytech uhynutí;
- b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD₅₀ se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na zvířatech nebo z toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví;
- c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno a
 - pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující významné toxické účinky na člověka, nebo
 - pokud je během zkoušení orální cestou s dávkami nejvýše kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování s dávkami nejvýše kategorie 4 s výjimkou průjmu, zjevení srsti nebo rozčuchané srsti, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují možnost závažných akutních účinků vyplývajících z jiných studií na zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHUJÍCÍCH 2 000 MG/KG

Ve výjimečných případech, a pouze je-li to odůvodněno specifickými regulačními potřebami, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně fixní dávky 5 000 mg/kg. S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty se zkoušení s dávkami 5 000 mg/kg nedoporučuje, mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky by měly přímý význam pro ochranu zvířat nebo lidského zdraví (9).

Orientační studie

Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v příloze 1, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se v orientační studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, výsledek A (úhyn) povede k nutnosti zkoušet na druhém zvířeti dávku 2 000 mg/kg. Výsledky B a C (zřejmě toxicita nebo žádná toxicita) umožní zvolit dávku 5 000 mg/kg za výchozí dávku hlavní studie. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledky B nebo C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg bude vyžadovat výchozí dávku hlavní studie 2 000 mg/kg a výsledky B a C budou vyžadovat výchozí dávku v hlavní studii 5 000 mg/kg.

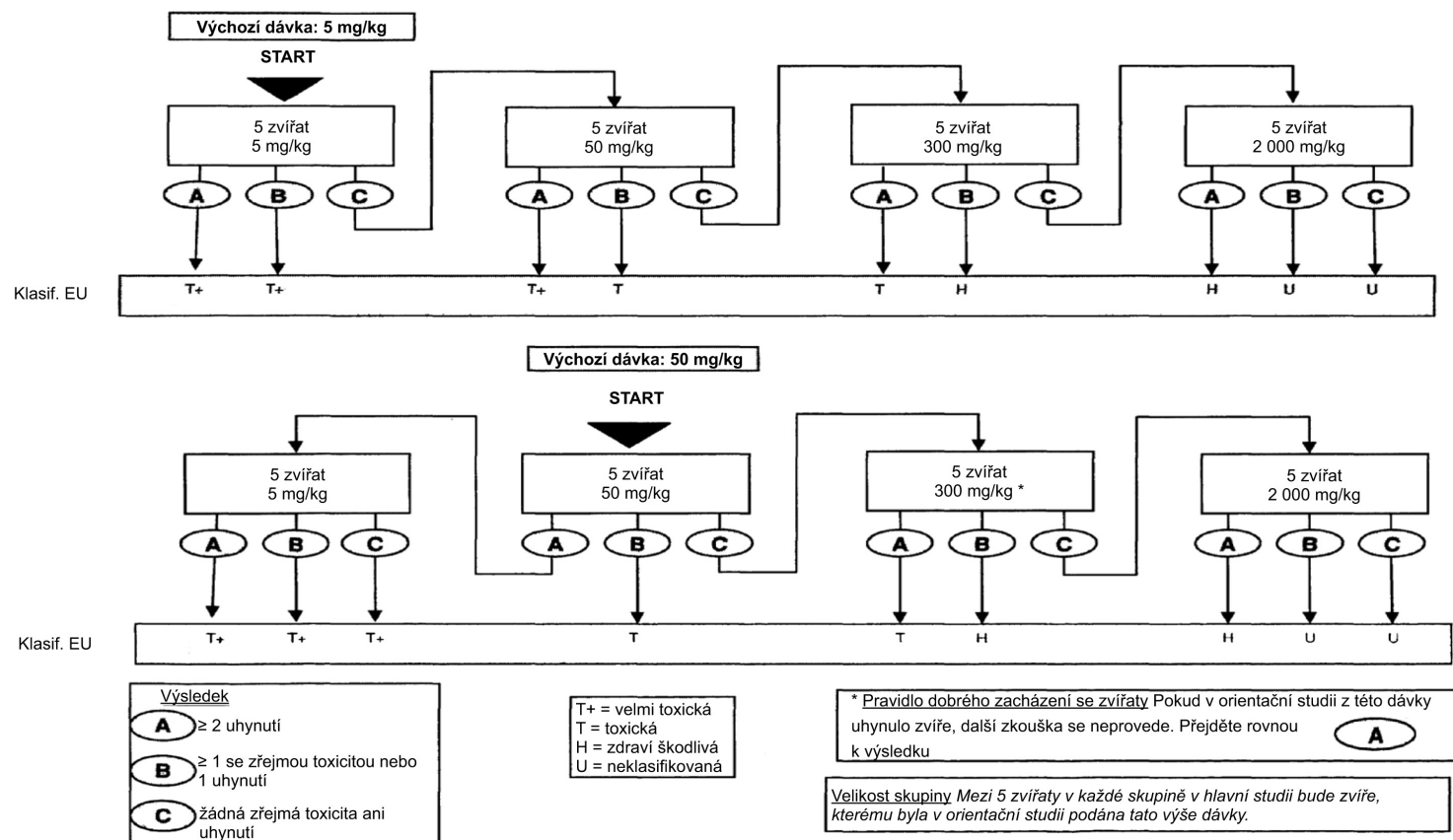
▼B**Hlavní studie**

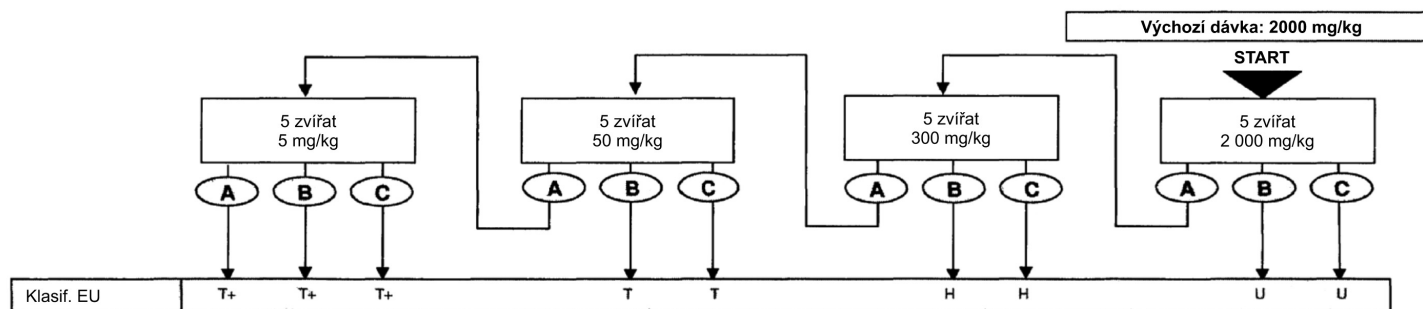
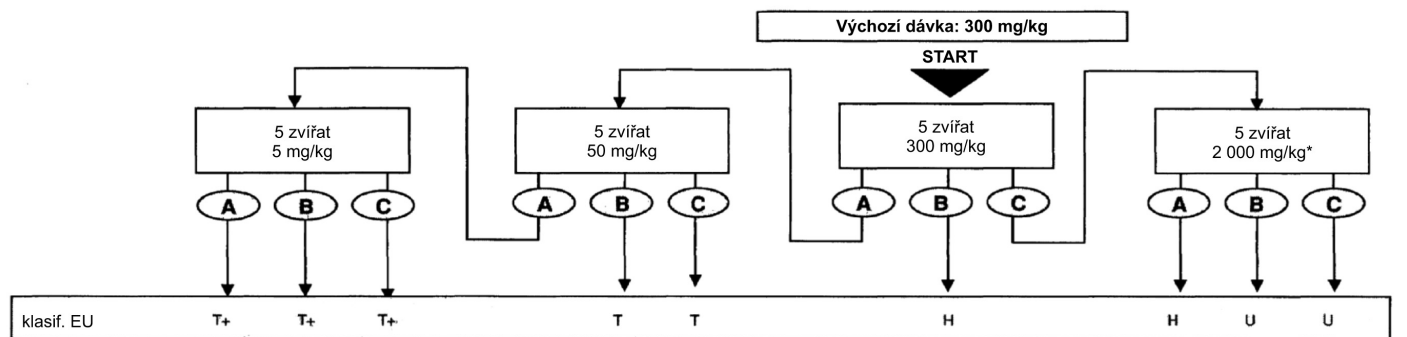
Pravidla pro rozhodování, jimiž se řídí metoda postupného podávání dávek uvedená v příloze 2, se rozšíří tak, aby zahrnovala úroveň dávky 5 000 mg/kg. Pokud se tedy v hlavní studii použije výchozí dávka 5 000 mg/kg, bude výsledek A (≥ 2 úhyny) vyžadovat zkoušení dávky 2 000 mg/kg na druhé skupině. Výsledek B (zřejmá toxicita a/nebo ≤ 1 úhyn) nebo C (žádná toxicita) povedou k tomu, že látka nebude podle GHS klasifikována. Podobně pokud se použije výchozí dávka jiná než 5 000 mg/kg, zkoušení pokračuje na úroveň 5 000 mg/kg v případě, že se při 2 000 mg/kg zjistí výsledek C. Následný výsledek A při 5 000 mg/kg povede k tomu, že se látka přiřadí do kategorie 5 GHS a na základě výsledku B nebo C látka nebude klasifikována.

DODATEK 4

ZKUŠEBNÍ METODA B.1.a

Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury (8))





Výsledek

A	≥ 2 uhynutí
B	≥ 1 zřejmá toxicita a/nebo 1 uhynutí
C	žádná zřejmá toxicita ani uhynutí

T+ = velmi toxická
 T = toxická
 H = zdraví škodlivá
 U = neklasifikovaná

Velikost skupiny
 Mezi 5 zvířaty v každé skupině v hlavní studii bude zvíře, kterému byla v orientační studii podána tato dávka.

* Pravidlo dobrého zacházení se zvířaty
 Pokud v orientační studii z této dávky uhynulo zvíře, další zkouška se neprovede. Přejděte rovnou k výsledku **A**

▼ B**B.1.b AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ
TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY****1. METODA**

Tato zkušební metoda odpovídá metodě OECD TG 423 (2001).

1.1 ÚVOD

Metoda stanovení třídy akutní toxicity (1) stanovená v této zkoušce je metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři zvířata stejného pohlaví. V závislosti na úmrtnosti a/nebo stavu agónie zvířat lze o akutní toxicitě zkoušené látky rozhodnout průměrně na základě 2 až 4 kroků. Tato metoda je reprodukovatelná, vyžaduje méně zvířat a dokáže látky zařadit podobně jako jiné zkušební metody akutní toxicity. Metoda stanovení třídy akutní toxicity je založena na biometrickém hodnocení (2)(3)(4)(5) s fixními dávkami, přiměřeně oddělenými tak, aby umožnila zařazení látky pro účely klasifikace a posouzení nebezpečnosti. Metoda přijatá v roce 1996 byla podrobena rozsáhlým národním (6) mezinárodním (7) validačním studiím *in vivo* pro srovnání s hodnotami LD₅₀ získanými z literatury.

Obecný návod týkající se výběru nejvhodnější zkušební metody k danému účelu obsahuje text Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8). V tomto dokumentu jsou také uvedeny doplňující informace o provádění a analýze zkušební metody B.1.b.

Není nutné podávat zkoušené látky v dávkách, o nichž je známo, že v důsledku leptavých nebo výrazně dráždivých účinků vyvolávají značnou bolest a utrpení. Umírající zvířata nebo zvířata, která zjevně projevují příznaky bolesti nebo značného a přetrvávajícího utrpení, se humánně utratí a při interpretaci výsledků jsou hodnocena jako zvířata uhynulá při zkoušce. Kritéria rozhodování o utrácení umírajících nebo značně trpících zvířat a poučení týkající se rozpoznání předvídatelného nebo blížícího se uhynutí jsou předmětem samostatného dokumentu (9).

Metoda využívá předem stanovených dávek a její výsledky umožňují látku zařadit a klasifikovat podle globálně harmonizovaného systému klasifikace chemických látek, které způsobují akutní toxicitu (10).

V zásadě tato metoda neslouží k vypočtení přesné hodnoty LD₅₀, ale umožňuje určit definované rozpětí expozice, při které se předpokládá letalita, neboť hlavním koncovým vyhodnocením této zkoušky zůstává uhynutí části zvířat. Metoda umožňuje stanovit hodnotu LD₅₀, pouze pokud alespoň dvě dávky vedou k mortalitě vyšší než 0 % a nižší než 100 %. Použití výběru předem stanovených dávek, bez ohledu na zkoušenou látku, u něhož se klasifikace explicitně váže k počtu zvířat pozorovaných v různých stavech, zvyšuje možnost konzistentního a opakovaného předávání zpráv mezi laboratořemi.

▼ B

Zkušební laboratoř vezme před provedením studie v úvahu veškeré dostupné informace o zkoušené látce. Součástí těchto informací je totožnost a chemická struktura látky, její fyzikálně-chemické vlastnosti, výsledek jiných zkoušek toxicity dané látky *in vitro* nebo *in vivo*, toxikologické údaje o strukturně příbuzných látkách a očekávané použití látky. Tyto informace jsou nezbytné k tomu, aby byli všichni zainteresovaní přesvědčeni, že zkouška má význam pro ochranu lidského zdraví a pomůže při výběru nejvhodnější výchozí dávky.

1.2 DEFINICE

Akutní orální toxicita: se vztahuje na nepříznivé účinky, které se projeví po orálním podání jedné dávky nebo více dávek látky během 24 hodin.

Opožděný úhyn: znamená, že zvíře během 48 hodin neuhyne ani nejeví známky umírání, ale uhynie později během čtrnáctidenní doby pozorování.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. mg/kg).

GHS: globálně harmonizovaný systém klasifikace chemických látek a směsí. Společný projekt Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (lidské zdraví a životní prostředí), Odborného výboru OSN pro přepravu nebezpečného zboží (fyzikálně-chemické vlastnosti) a Mezinárodní organizace práce (informace o nebezpečnosti) koordinovaný Meziorganizačním programem pro řádné nakládání s chemikáliemi (IOMC).

Blížící se uhynutí: stav agónie nebo uhynutí je očekáván před další plánovanou dobou pozorování. Příznaky svědčící o tomto stavu mohou u hlodavců zahrnovat křeče, polohu na boku, polohu vleže a třes (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

LD₅₀ (střední letální orální dávka): statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, u níž lze očekávat, že způsobí uhynutí 50 % zvířat, jimž byla podána orální cestou. Hodnota LD₅₀ se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (mg/kg).

Limitní dávka: označuje nejvyšší přípustnou dávku (2 000 nebo 5 000 mg/kg).

Stav agónie: označuje stav úhynu nebo neschopnost přežít, ani když je zvíře léčeno (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

Předvídatelný úhyn: přítomnost klinických příznaků svědčících o smrti, přičemž doba úhynu je známa a předchází plánovanému ukončení zkoušky v budoucnosti, např. neschopnost dojít k vodě nebo potravě (více podrobností viz text Humane Endpoint Guidance Document (9)).

▼B1.3 **PODSTATA ZKOUŠKY**

Podstatou zkoušky je, že se pomocí metody po krocích, využívající minimálního počtu zvířat u každého kroku, získají informace o akutní toxicitě zkoušené látky, které umožní její klasifikaci. Látka se skupině pokusných zvířat podává orálně v jedné ze stanovených dávek. Látka se zkouší metodou po krocích, přičemž u každého kroku se používají tři zvířata stejného pohlaví (obvykle samice). Přítomnost nebo nepřítomnost mortality vyvolané látkou u zvířat, jimž byla látka podána v jednom kroku, rozhodne o dalším kroku, tj.:

— není třeba žádné další zkoušení,

— podá se stejná dávka dalším třem zvířatům,

— látka se podá dalším třem zvířatům v nejbližší vyšší nebo nejbližší nižší úrovni dávky.

Podrobnosti postupu zkoušení jsou uvedeny v příloze 1. Metoda umožní rozhodnout s ohledem na zařazení zkoušené látky do jedné z řady tříd toxicity definovaných fixními hraničními hodnotami LD₅₀.

1.4 **POPIS METODY**1.4.1 **Výběr druhu zvířat**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, avšak lze použít i jiné druhy hlodavců. Obvykle se používají samice (9). Je to proto, že přehled literatury o konvenčních zkouškách LD₅₀ ukazuje, že ačkoliv je mezi pohlavími obvykle malý rozdíl, pokud jde o citlivost, jsou samice v případech, ve kterých jsou rozdíly pozorovány, obecně nepatrně citlivější (11). Pokud však poznatky o toxikologických nebo toxikokinetických vlastnostech strukturně příbuzných chemických látek naznačují, že citlivější jsou pravděpodobně samci, použije se toto pohlaví. Jestliže se zkouška provádí na samcích, je nutné podat náležité odůvodnění.

Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Každé zvíře musí být na začátku podávání látky 8 až 12 měsíců staré a jeho hmotnost by se měla pohybovat v intervalu ± 20 % střední hmotnosti zvířat, kterým byla podána předchozí dávka.

1.4.2 **Podmínky chovu a krmení**

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Zvířata mohou být chována v klecích ve skupinách podle dávky, ale počet zvířat v kleci nesmí bránit nerušenému pozorování každého zvířete.

▼B**1.4.3 Příprava zvířat**

Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí a chovají se v klecích minimálně pět dnů před podáním látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám.

1.4.4 Příprava dávek

Zkoušená látka by obecně měla být při všech úrovních zkoušených dávek podávána v konstantním objemu pomocí úpravy koncentrace dávkovaného přípravku. V případech, kdy má být zkoušen kapalný koncový produkt nebo směs, může však být použito nezředěné zkoušené látky, tj. s konstantní koncentrací, pro hodnocení následného rizika této látky užitečnější a je vyžadováno některými kontrolními orgány. Ani v jednom případě nesmí být překročen maximální objem dávky. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. U hlodavců by objem obvykle neměl přesáhnout 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, avšak u vodních roztoků připadá v úvahu i dávka 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S ohledem na složení dávkovaného přípravku se ve všech případech, kde je to možné, doporučuje použití vodního roztoku/suspenze/-emulze, potom v pořadí podle preference použití roztoku/suspenze/-emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec případně roztoku v jiných vehikulech. U vehikul jiných než voda musí být známy toxikologické charakteristiky. Dávky musí být připraveny krátce před podáním, pokud není stálost přípravku během doby, kdy bude používán, známa a neukáže se jako přijatelná.

1.5 POSTUP**1.5.1 Podávání dávek**

Zkoušená látka se podává sondou v jedné dávce pomocí žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Pokud výjimečně není možné podat dávku najednou, lze ji podat po menších množstvích během nejvýše 24 hodin.

Před podáním zkoušené látky nemají zvířata dostávat potravu (např. potkanům by se neměla podávat přes noc, myším 3–4 hodiny), voda se však ponechává. Po uplynutí doby hladovění se zvířata zváží a podá se jim zkoušená látka. Po podání látky se zamezí přístupu k potravě na další 3–4 hodiny u potkanů nebo 1–2 hodiny u myší. Podává-li se látka po částech v průběhu určité doby, může být podle délky období nezbytné poskytnout zvířatům potravu a vodu.

1.5.2 Počet zvířat a úrovně dávek

V každém kroku se používají tři zvířata. Dávka, která bude použita jako výchozí, se zvolí z jedné ze čtyř fixních úrovní: 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Výchozí dávka by měla být taková, která nejpravděpodobněji vyvolá uhynutí některých zvířat, jimž bude podána. Postup, který je nutno u každé výchozí dávky dodržet, je popsán ve vývojových diagramech v příloze 1. V příloze 4 jsou uvedeny pokyny týkající se klasifikace v rámci systému EU do doby, než bude zaveden nový globálně harmonizovaný systém (GHS).

▼B

Pokud dostupné informace naznačují, že při nejvyšší úrovni výchozí dávky (2 000 mg/kg tělesné hmotnosti) je úmrtnost nepravděpodobná, je nutné provést limitní zkoušku. Pokud nejsou o látce, která má být zkoušena, k dispozici žádné informace, doporučuje se, z důvodů dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, použít výchozí dávku 300 mg/kg tělesné hmotnosti.

Časový interval mezi experimentálními skupinami závisí na době nástupu, trvání a závažnosti příznaků toxicity. Podání další dávky bude odloženo, dokud nebude jisté, že zvířata, jimž byla podána předchozí dávka, přežila.

Ve výjimečných případech a pouze je-li to odůvodněno specifickými konkrétními předpisy, lze zvážit použití další nejvyšší úrovně dávky 5 000 mg/kg tělesné hmotnosti (viz dodatek 2). S ohledem na zásadu dobrého zacházení se zvířaty se pokusy na zvířatech v rámci kategorie 5 GHS (2 000–5 000 mg/kg) nedoporučují a měly by se zvažovat pouze tehdy, pokud existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky budou mít přímý význam pro ochranu lidského zdraví, zdraví zvířat nebo životního prostředí.

1.5.3 **Limitní zkouška**

Limitní zkouška se používá především tehdy, má-li osoba provádějící zkoušku informace svědčící o tom, že zkoušený materiál je pravděpodobně netoxický, tj. je toxický pouze nad rámec regulačních limitních dávek. Informace o toxicitě zkoušeného materiálu lze získat ze znalostí o podobných zkoušených sloučeninách, směsích nebo produktech s ohledem na totožnost a procento složek, o nichž se ví, že jsou toxikologicky významné. V situacích, kdy existuje jen málo informací nebo vůbec žádné informace o toxicitě nebo kdy se očekává, že zkoušený materiál bude toxický, bude provedena hlavní zkouška.

Limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti lze provést na šesti zvířatech (tři zvířata na jeden krok). Výjimečně lze na třech zvířatech provést limitní zkoušku s jednou úrovní dávky 5 000 mg/kg (viz dodatek 2). Projeví-li se úmrtnost vyvolaná zkoušenou látkou, budou další zkoušky uskutečněny s nejbližší nižší úrovní dávky.

1.6 **POZOROVÁNÍ**

Po podání dávky se zvířata pozorují individuálně minimálně jednou během prvních 30 minut, pravidelně během prvních 24 hodin, přičemž zvláštní pozornost se věnuje prvním 4 hodinám, a poté denně po dobu 14 dnů kromě případů, kdy je nutné zvířata ze studie vyjmout a humánně utratit z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty, nebo je zjištěn jejich úhyn. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Bude stanovena podle toxických reakcí, doby jejich nástupu a délky fáze zotavení, a může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, je důležitá zejména v případě tendence ke zpožděným příznakům toxicity (12). Veškerá pozorování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou pro každé zvíře jednotlivě.

▼ B

Další pozorování budou nutná, jestliže zvířata dále vykazují příznaky toxicity. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Pozornost je třeba věnovat třesu, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Vezmou se v úvahu principy a kritéria shrnuté v textu Humane Endpoints Guidance Document (9). Zvířata ve stavu agónie a zvířata se známkami prudkých bolestí nebo s přetrvávajícími příznaky značného utrpení se humánně utratí. Pokud jsou zvířata z humánních důvodů utracena nebo je zjištěn jejich úhyn, je nutné dobu uhynutí zaznamenat co nejpřesněji.

1.6.1 Tělesná hmotnost

Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví krátce před podáním zkoušené látky a nejméně jednou týdně poté. Vypočítají se změny hmotností a zaznamenají se. Na konci zkoušky se zvířata, která přežila, zváží a humánně utratí.

1.6.2 Patologie

Všechna pokusná zvířata (včetně těch, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena z důvodu dodržování pravidla dobrého zacházení se zvířaty) se pitvají. U každého zvířete se zaznamenají všechny makroskopické patologické nálezy. Lze také zvážit mikroskopické vyšetření orgánů, u nichž jsou patrné makroskopické patologie, u zvířat, která přežila 24 nebo více hodin, protože mohou poskytnout užitečné informace.

2. DATA

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se u každé zkušební skupiny uvede počet použitých zvířat, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba uhynutí jednotlivých zvířat, popis, časový průběh a vratnost toxických účinků a pitevní nálezy.

3. ZPRÁVY**3.1 Protokol o zkoušce**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, čistota a tam, kde je to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně izomerizace),

— identifikační údaje, včetně čísla CAS.

Vehikulum (je-li použito):

— zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

▼ B

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,
- počet, stáří a pohlaví zvířat (případně včetně zdůvodnění použití samců místo samic),
- původ, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o složení zkoušené látky, včetně podrobností o fyzikální formě podávaného materiálu,
- podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky, včetně objemu dávek a době podávání,
- podrobné údaje o stravě a kvalitě vody (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody),
- zdůvodnění výběru výchozí dávky.

Výsledky:

- údaje ve formě tabulky o reakcích každého zvířete a o výši jeho dávky (tj. počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, včetně uhynutí, povahy, závažnosti a trvání účinků),
- údaje o tělesné hmotnosti a jejích změnách ve formě tabulky,
- hmotnosti jednotlivých zvířat v den podání dávky, poté v týdenních intervalech a v čase úhynu nebo utracení,
- datum a doba úhynu, pokud předchází plánovanému usmrcení,
- časový průběh nástupu příznaků toxicity u každého zvířete, a zda byly vratné,
- pitevní a histopatologické nálezy pro každé zvíře, pokud jsou k dispozici.

Diskuse a interpretace výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

- 1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86
- 2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336–341.
- 3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559–610
- 4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729–734.
- 5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. ALTEX 16, 129–134
- 6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. Arch. Toxicol. 66, 455–470.

▼B

- 7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659–670.
- 8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- 9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- 10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/-oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- 11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel k A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223–231.
- 12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

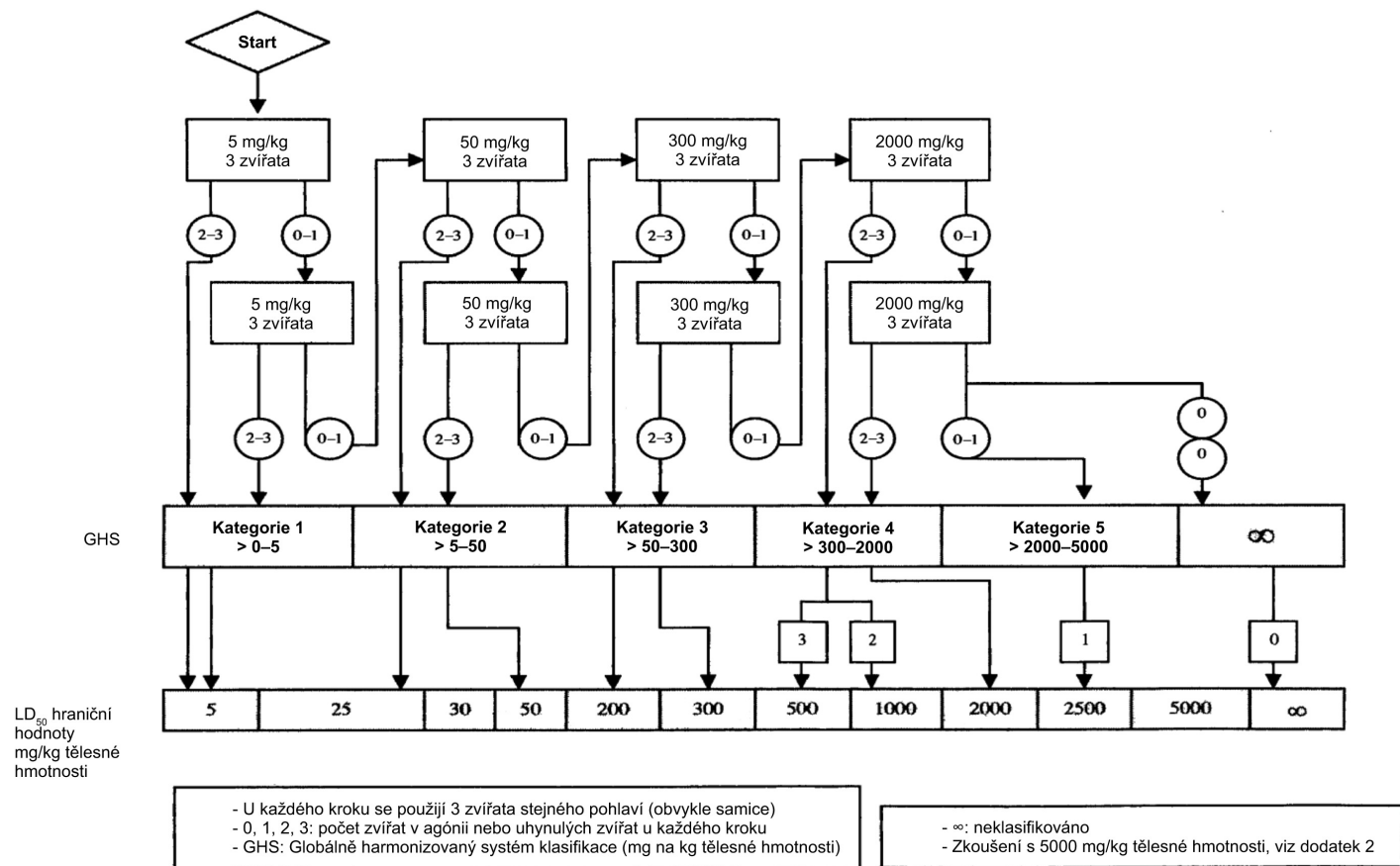
▼B*DODATEK 1***POSTUP, KTERÝ MÁ BÝT U KAŽDÉ Z VÝCHOZÍCH DÁVEK
DODRŽEN***OBECNÉ POZNÁMKY*

System zkoušení u každé výchozí dávky obsažený v této příloze nastiňuje postup, který je třeba sledovat.

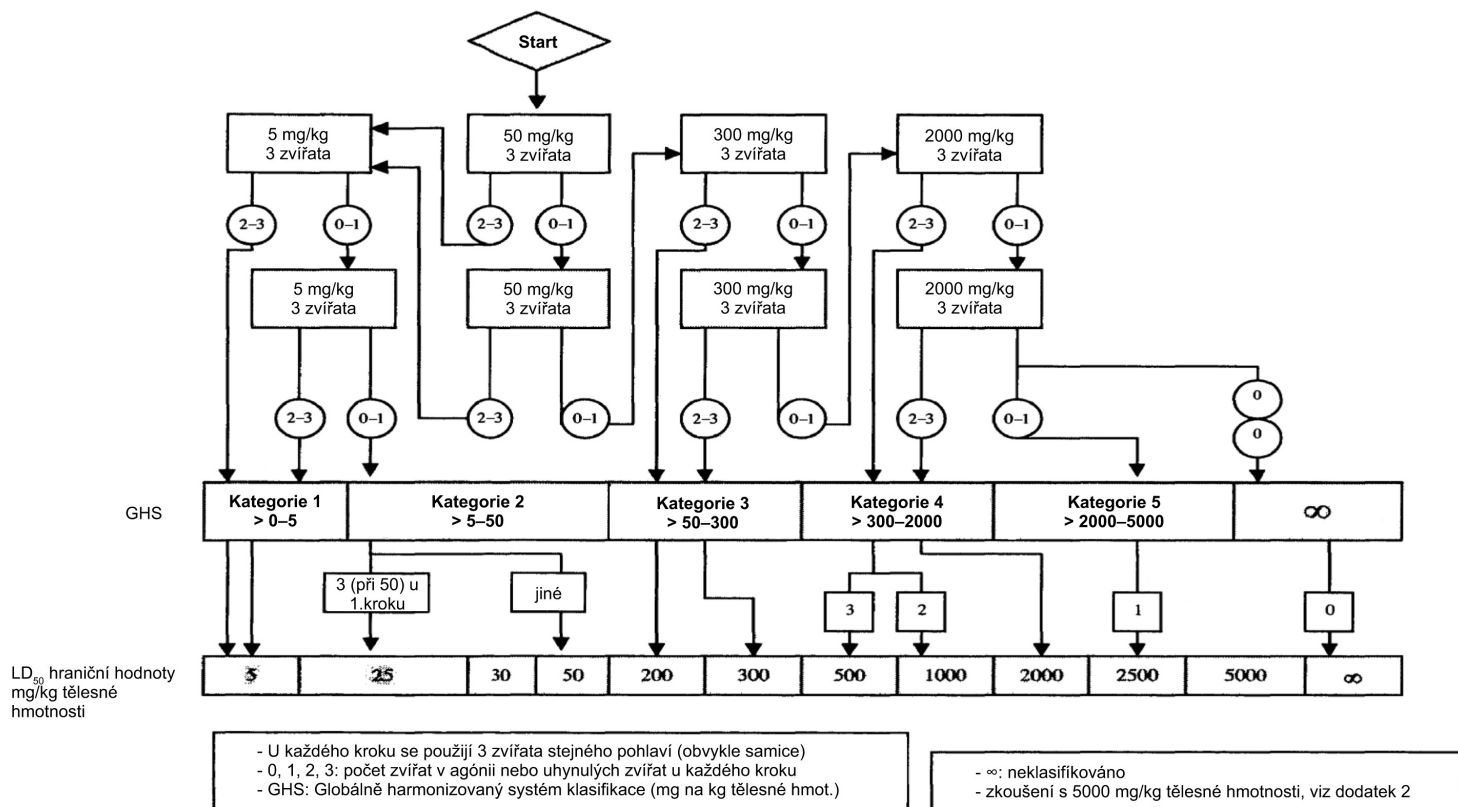
- Dodatek 1A: výchozí dávka je 5 mg na kg tělesné hmotnosti.
- Dodatek 1B: výchozí dávka je 50 mg na kg tělesné hmotnosti.
- Dodatek 1C: výchozí dávka je: 300 mg na kg tělesné hmotnosti.
- Dodatek 1D: výchozí dávka je: 2 000 mg na kg tělesné hmotnosti.

Postup zkoušení se řídí naznačenými šipkami v závislosti na počtu humánně utracených nebo uhynulých zvířat.

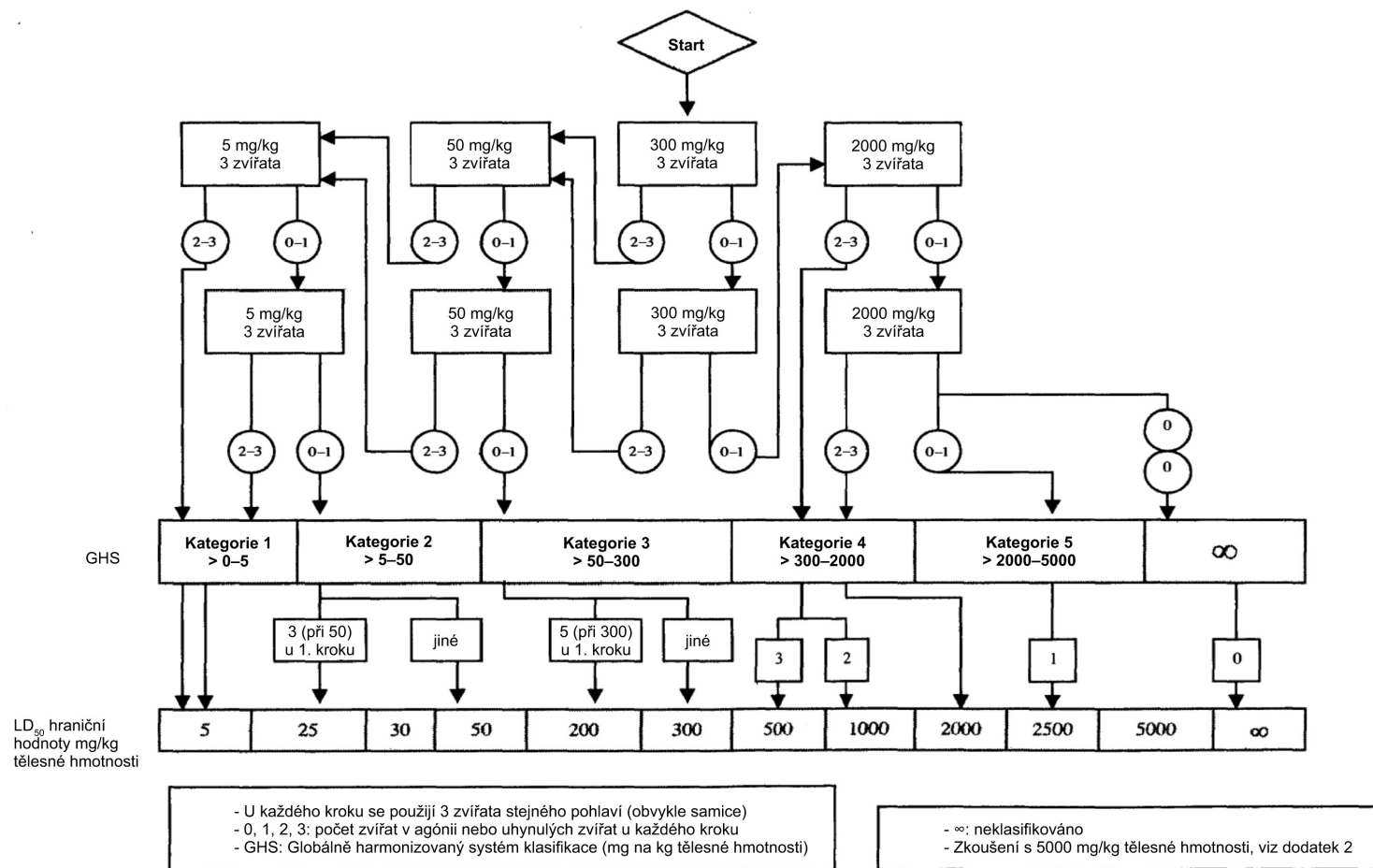
POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 5 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



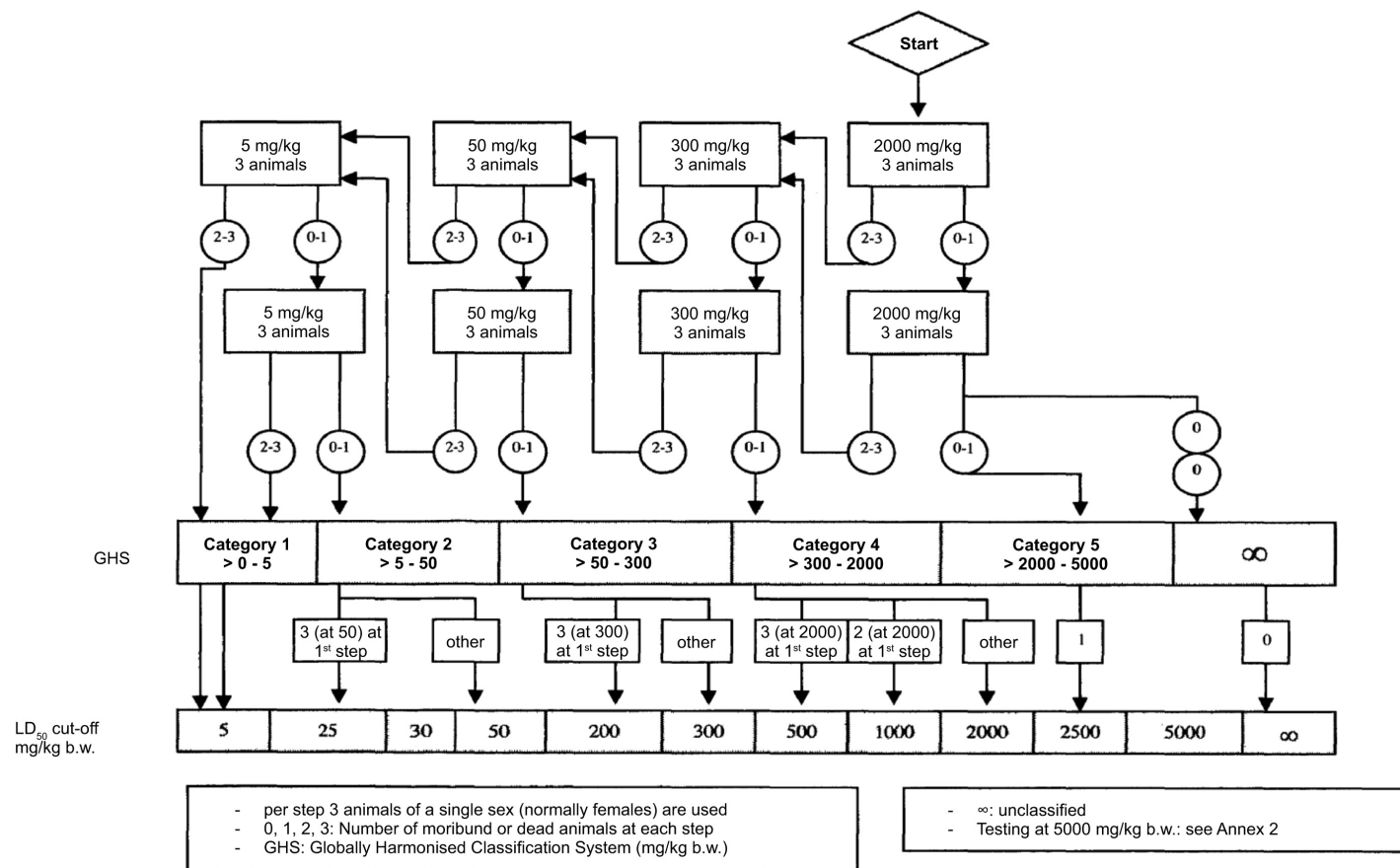
POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 50 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 300 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI



POSTUP ZKOUŠENÍ S VÝCHOZÍ DÁVKOU 2 000 MG NA KG TĚLESNÉ HMOTNOSTI





DODATEK 2

**KRITÉRIA KLASIFIKACE ZKOUŠENÝCH LÁTEK S OČEKÁVANÝMI
HODNOTAMI LD₅₀ PŘESAHOJÍCÍMI 2 000 MG/KG BEZ NUTNOSTI
ZKOUŠENÍ**

Kritéria pro kategorii nebezpečnosti 5 mají umožnit identifikaci zkoušených látek, u nichž je nebezpečí akutní toxicity relativně nízké, avšak které mohou za určitých okolností pro citlivé jedince představovat nebezpečí. U těchto látek se předpokládá, že se jejich orální nebo dermální LD₅₀ nebo LD₅₀ ekvivalentních dávek podávaných jinými cestami pohybuje v rozmezí od 2 000 do 5 000 mg/kg. Zkoušenou látku lze klasifikovat v kategorii nebezpečnosti definované jako 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg v těchto případech (v GHS kategorie 5):

- a) pokud je do této kategorie zařazena podle některého ze systémů zkoušení uvedeného v příloze 1a–1d, v závislosti na výskytech uhynutí;
- b) pokud jsou již k dispozici spolehlivé důkazy naznačující, že LD₅₀ se pohybuje v rozmezí hodnot kategorie 5, nebo pokud z jiných studií na zvířatech nebo toxických účinků na člověka vyplývají akutní obavy o lidské zdraví;
- c) pokud extrapolací, odhadem nebo měřením údajů není přiřazení do vyšší třídy nebezpečnosti odůvodněno a
 - pokud jsou k dispozici spolehlivé informace naznačující závažné toxické účinky na člověka, nebo
 - pokud je během zkoušení orální cestou do hodnot kategorie 4 pozorováno uhynutí, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí závažné klinické příznaky toxicity při testování do hodnot kategorie 4 s výjimkou průjmu, zjevení srsti nebo rozčuchané srsti, nebo
 - v případech, kdy odborný posudek potvrdí spolehlivé informace, které naznačují možnost závažných akutních účinků vyplývajících z jiných studií na zvířatech.

ZKOUŠENÍ V DÁVKÁCH PŘESAHOJÍCÍCH 2 000 MG/KG

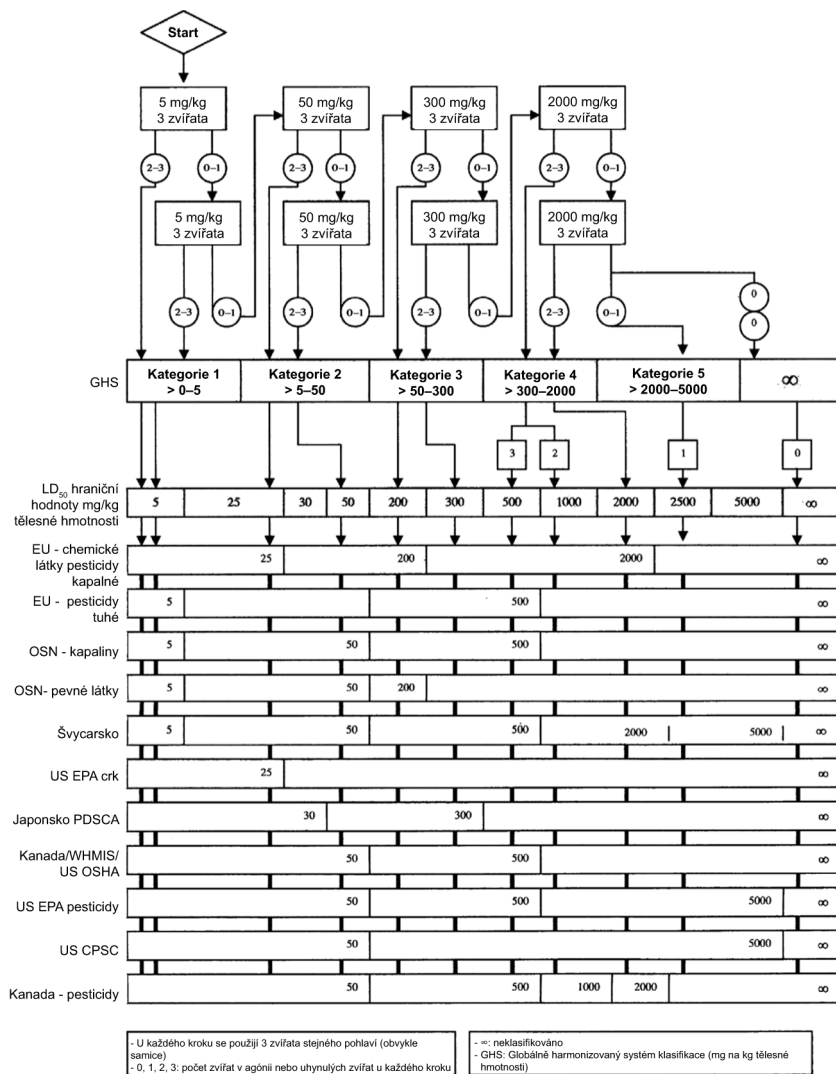
S ohledem na nutnost dodržování zásady dobrého zacházení se zvířaty se zkoušení na zvířatech v kategorii 5 (5 000 mg/kg) nedoporučuje a mělo by se zvažovat pouze v případě, že existuje velká pravděpodobnost, že výsledky takové zkoušky mají přímý význam pro ochranu lidského zdraví nebo zdraví zvířat (10). S vyššími úrovněmi dávek se žádné další zkoušky neprovedou.

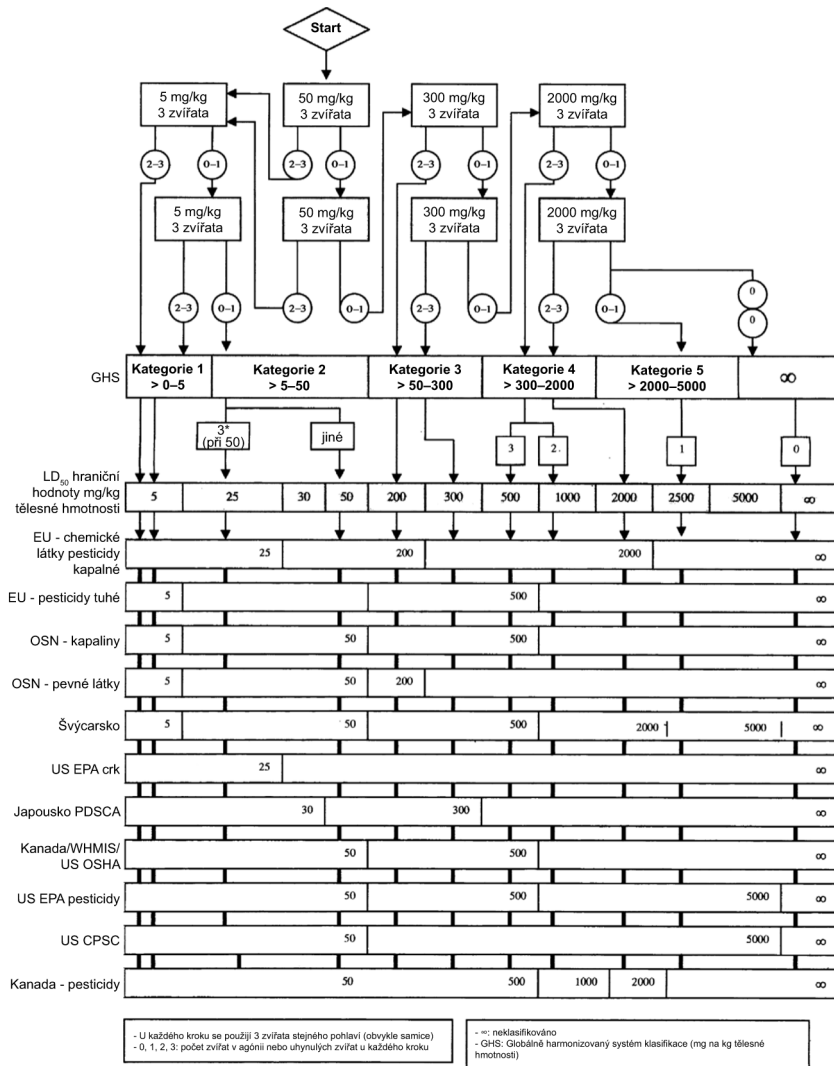
Pokud je vyžadováno zkoušení s dávkou 5 000 mg/kg, vyžaduje se pouze jeden krok (tj. tři zvířata). Pokud první zvíře, jemuž byla podána dávka, uhynie, pokračuje podávání s úrovní 2 000 mg/kg podle vývojového diagramu v příloze 1. Pokud první zvíře přežije, podá se dávka dalším dvěma zvířatům. Pokud uhynie pouze jedno zvíře ze tří, očekává se, že hodnota LD₅₀ přesáhne 5 000 mg/kg. Pokud uhynou obě zvířata, pokračuje se podáním dávky 2 000 mg/kg.



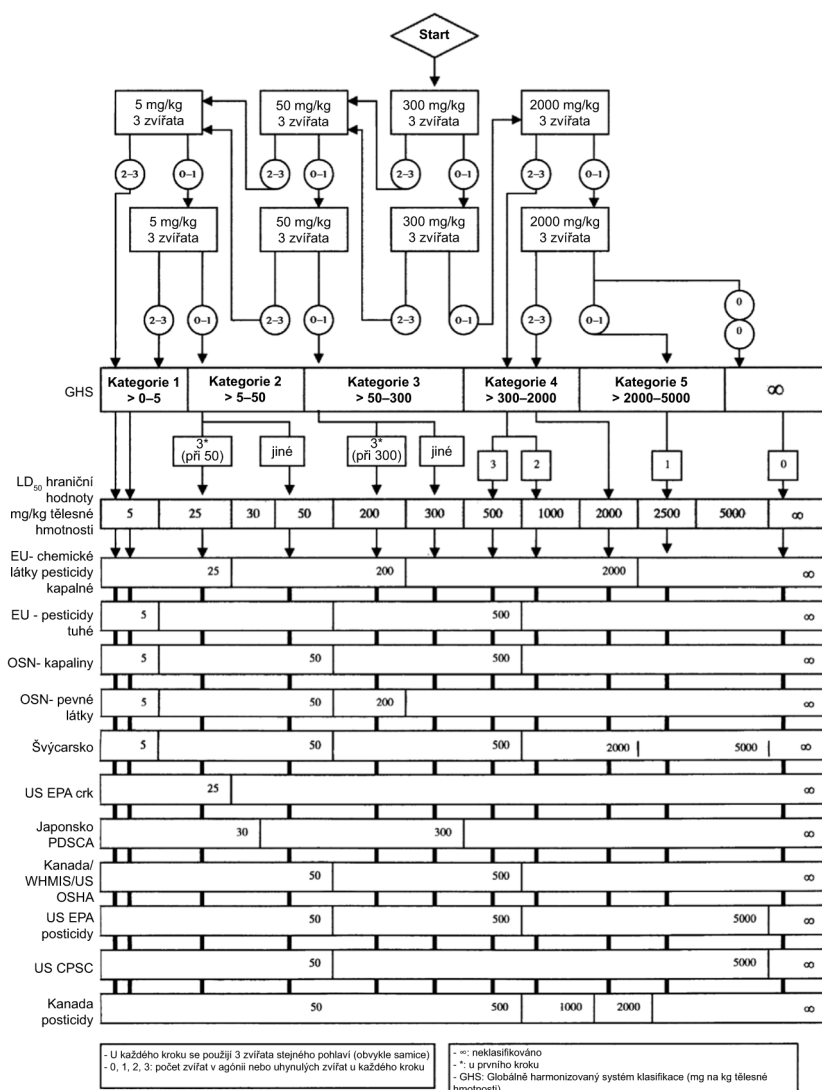
DODATEK 3

METODA ZKOUŠENÍ B.1.b: Pokyny ke klasifikaci podle systému EU pro přechodné období do plného zavedení globálně harmonizovaného systému klasifikace (GHS) (převzato z literatury (8))

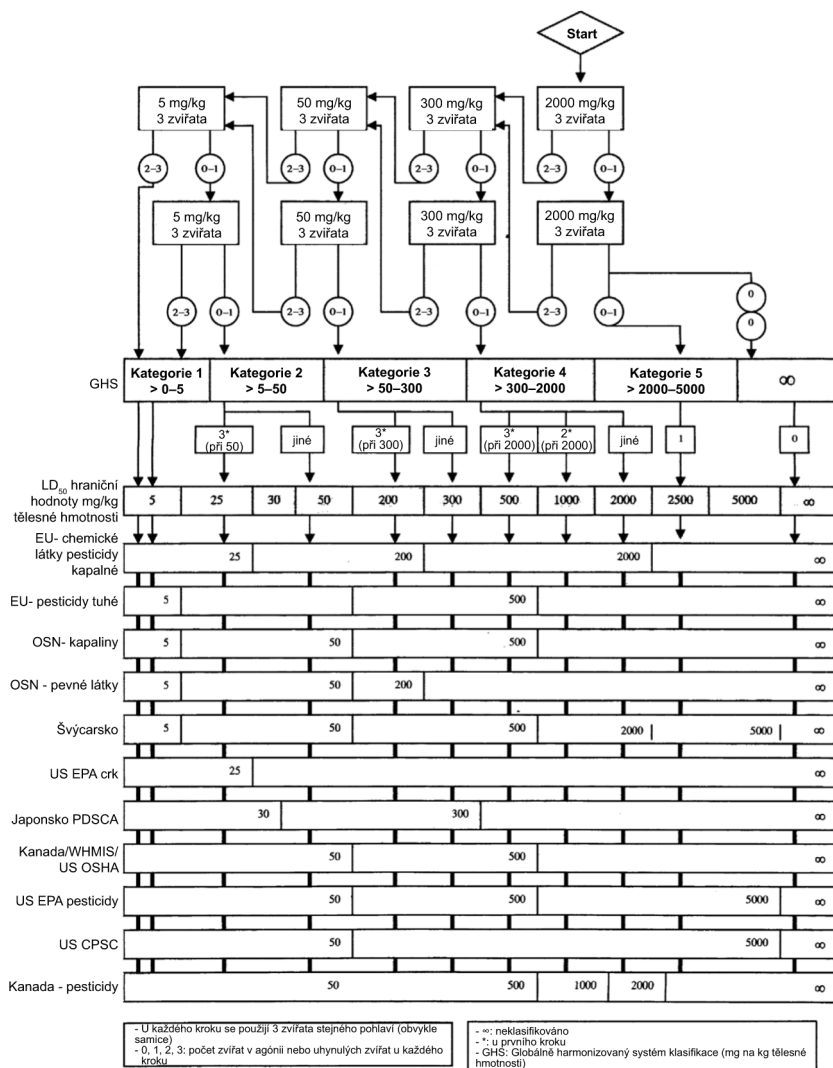




▼ B



▼ **B**



▼B**B.2 AKUTNÍ TOXICITA (INHALAČNÍ)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Je vhodné mít předběžné informace o distribuci velikosti částic, tenzi par, bodu tání, bodu varu, teplotě vzplanutí a popřípadě výbušnosti látky.

Viz také obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Několik skupin pokusných zvířat se vystaví po určenou dobu zkoušené látce v odstupňovaných koncentracích, a to každá skupina jedné koncentraci. Následně se pozorují účinky a uhynutí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou uvedena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1 Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých zvířat, která se přiřadí do požadovaného počtu skupin. Pokud to nevyžaduje typ používaného expozičního zařízení, není třeba podrobit zvířata simulované expozici.

Pevné zkoušené látky může být nezbytné rozmělnit na částice vhodné velikosti.

Je-li to nezbytné, přidá se ke zkoušené látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla požadovaná koncentrace zkoušené látky, a v tomto případě se zařadí také kontrolní skupina s vehikulem. Pokud se použijí pro usnadnění dávkování vehikulum nebo jiné přísady, musí být prokázáno, že nemají toxické účinky. Je možno použít stávající údaje, pokud je to potřebné.

▼ B**1.6.2 Zkušební podmínky****1.6.2.1 *Pokusná zvířata***

Upřednostňuje se potkan, pokud nejsou důvody proti jeho použití. Použijí se běžně používané laboratorní kmeny. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit $\pm 20\%$ příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň koncentrace se použije nejméně 10 hlodavců (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Poznámka: Používají-li se v akutních zkouškách toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, měl by se použít menší počet zvířat. Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxických dávek. V takových zkouškách by neměly být podávány letální dávky zkoušené látky.

1.6.2.3 *Expoziční koncentrace*

Počet expozičních koncentrací má být dostatečný, nejméně tři, a měly by být vhodně odstupňovány, aby se získaly zkušební skupiny s vhodným rozsahem toxických účinků a mortality. Získaná data by měla postačovat pro sestrojení závislosti koncentrace-mortalita, a pokud je to možné, měla by umožnit přijatelné stanovení LC₅₀.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Pokud se u 5 sameců a 5 samic pokusných zvířat exponovaných po čtyři hodiny 20 mg/l plynu nebo 5 mg/l aerosolu nebo částic (nebo maximálně dosažitelným koncentracím tam, kde toto není možné v důsledku fyzikálních nebo chemických vlastností, popř. výbušných, vlastností zkoušené látky) neprokáže mortalita spojená s látkou během 14 dnů následujících po zkoušce, další zkoušení se nepovažuje za nezbytné.

1.6.2.5 *Doba expozice*

Doba expozice by měla být čtyři hodiny.

1.6.2.6 *Zařízení*

Pro experimenty se zvířaty by mělo být použito inhalační zařízení, které umožňuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční komora, měla by její konstrukce minimalizovat shlukování pokusných zvířat a maximalizovat jejich inhalační expozici zkoušené látce. Pro zajištění stability atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“ zaplněný pokusnými zvířaty přesáhnout 5 % objemu expoziční komory. Lze použít speciální expoziční komory pro orálně-nasální expozici nebo pro expozici hlavy nebo pro expozici celého těla; první dva způsoby expozice usnadní minimalizaci příjmu látky jinými cestami.

▼ B1.6.2.7 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, jejich rychlosti vývoje a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděnému úhynu.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se krátce před expozicí zváží a poté se v určené komoře na dobu čtyř hodin od ustavení rovnováhy koncentrace vystaví zkušební koncentraci. Ustavení rovnováhy by mělo trvat krátce. Teplota, při které má být zkouška provedena, by měla být udržována na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost má být udržována nejlépe mezi 30 % a 70 %, ale v určitých případech to nemusí být realizovatelné (např. zkoušky některých aerosolů). Udržování mírného podtlaku v komoře (≤ 5 mm vodního sloupce) zabrání unikání zkoušené látky do okolí. Během expozice se nepodává potrava ani voda. Pro vytvoření a monitorování zkušební atmosféry se použijí vhodné systémy. Systém musí umožnit dosažení stálých expozičních podmínek co nejrychleji. Konstrukce a provoz komory by měly být takové, aby bylo možné udržovat homogenní distribuci zkušební atmosféry v komoře.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- a) průtok vzduchu (kontinuálně);
- b) skutečná koncentrace zkoušené látky v dýchací zóně nejméně třikrát během expozice (některá ovzduší, např. aerosoly o vysoké koncentraci mohou vyžadovat častější monitorování). Během doby expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %. U některých aerosolů však nelze této úrovně regulace dosáhnout a přípouští se větší rozsah kolísání. V případě aerosolů se provádí analýza velikosti částic tak často, jak je to nutné (nejméně jednou pro každou experimentální skupinu);
- c) teplota a vlhkost, pokud možno kontinuálně.

Během expozice a po jejím ukončení se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování; záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Během prvního dne se provádějí pozorování často. Nejméně jednou každý pracovní den se provádějí pečlivá klinická vyšetření, další pozorování se provádějí denně, přičemž se učiní odpovídající opatření pro minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitvou nebo zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací či utracením slabých nebo umírajících zvířat.

▼ B

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat dýchání, tremoru, křečím, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Doba uhynutí se zaznamená co nejpřesněji. Hmotnosti jednotlivých zvířat se stanoví jednou týdně po expozici a v době uhynutí.

Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají se zvláštním zřetelem na jakékoli změny horní i dolní části dýchacího traktu. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

2. DATA

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu uvede počet zvířat na počátku zkoušky, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevni nálezy. Změny hmotnosti je třeba vypočítat a zaznamenat, přežívají-li zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolaná látkou. LC_{50} se vypočte uznávanou metodou. Vyhodnocení dat by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat zkoušené látky a výskytem a stupněm všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxických účinků.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky: popis expozičního zařízení, včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému a způsobu umístění zvířat v expoziční komoře, je-li použita. Měly by být popsány přístroje pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, koncentrace a distribuce velikosti částic aerosolu.

▼ B

Údaje o expozici

Měla by být zpracována do tabulky s uvedením středních hodnot a míry rozptylu (např. směrodatné odchylky) a měla by zahrnovat pokud možno tyto informace:

- a) průtok inhalačním zařízením;
- b) teplota a vlhkost vzduchu;
- c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení děleno objemem vzduchu);
- d) povaha vehikula, pokud bylo použito;
- e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;
- f) hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka(GSD);
- g) doba do ustavení rovnováhy;
- h) doba expozice;
 - údaje o reakcích podle pohlaví a úrovně expozice ve formě tabulky (tj. počet zvířat, která při experimentu uhynula nebo byla humánně utracena; počet zvířat s příznaky toxicity; počet exponovaných zvířat),
 - doba uhynutí v průběhu expozice nebo po jejím ukončení, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,
 - všechna pozorování,
 - hodnota LC₅₀ pro každé pohlaví stanovená po ukončení doby pozorování (s uvedením metody výpočtu),
 - 95 % interval spolehlivosti pro LC₅₀ (lze-li jej vypočítat),
 - křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice (pokud to metoda stanovení umožňuje),
 - pitevní nálezy,
 - všechny histopatologické nálezy,
 - rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat vlivu, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během zkoušky na vypočtenou hodnotu LC₅₀),
 - interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B (E).

▼B**B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Následně se pozorují a zaznamenávají účinky a případy uhynutí. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

Je třeba humánně utratit zvířata vykazující závažné a přetrvávající známky utrpení; nesmějí se podávat zkoušené látky, o nichž je známo, že způsobují zřetelnou bolest a utrpení v důsledku žíravých a dráždivých vlastností látky.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY**1.6.1 Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do jednotlivých experimentálních skupin. Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá nebo oholí srst na zádech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže, což by mohlo změnit její propustnost. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Při výběru vehikula se bere v úvahu jeho vliv na průnik zkoušené látky kůží. Kapalně zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné.

1.6.2 Zkušební podmínky**1.6.2.1 Pokusná zvířata**

Mohou být použiti dospělí potkani nebo králci. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno. Použijí se běžně používané laboratorní kmeny. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty.

▼ B1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávky se použije nejméně pět zvířat. Mají být stejného pohlaví. Použijí-li se samice, musí být nullipary a nesmí být březí. Jsou-li k dispozici informace, že jedno z pohlaví je výrazně citlivější, použijí se zvířata tohoto pohlaví.

Poznámka: Používají-li se v akutních zkouškách toxicity zvířata vyšších druhů, než jsou hlodavci, měl by se použít menší počet zvířat. Dávky je třeba pečlivě volit a je třeba zajistit, aby nebyla překročena úroveň středně toxických dávek. V takových zkouškách by neměly být podávány letální dávky zkoušené látky.

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Počet úrovní dávek má být dostatečný, nejméně tři, a mají být vhodně odstupňovány, aby vznikly zkušební skupiny se zřetelným rozsahem toxických účinků a mortality. Při rozhodování o úrovních dávek by měly být vzaty v úvahu všechny dráždivé nebo žíravé účinky zkoušené látky. Získaná data by měla být dostatečná pro sestrojení závislosti dávka-odezva, a pokud je to možné, měla by umožnit přijatelné stanovení LD₅₀.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Lze provést limitní zkoušku s jednou dávkou nejméně 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti na skupinách pěti samců a pěti samic, a to za použití výše popsaných postupů. Pokud podaná látka způsobí uhynutí, je třeba uvážit provedení úplné studie.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být nejméně 14 dní. Doba pozorování by však neměla být stanovena pevně. Měla by být stanovena podle toxických reakcí, jejich rychlosti vývoje a délky fáze zotavení; může tedy být podle potřeby prodloužena. Doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí, a doba uhynutí jsou důležité zejména v případě tendence ke zpožděné mortalitě.

1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnější vrstvou.

Zkoušená látka se po expoziční dobu 24 hodin udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvas a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze doporučit.

▼B

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Pozorování by se měla současně systematicky zaznamenávat. Záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Během prvního dne se provádějí pozorování často. Nejméně jednou každý pracovní den se provádějí pečlivá klinická vyšetření, další pozorování se provádějí denně, přičemž se učiní odpovídající opatření pro minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitvou nebo zmrazením uhynulých zvířat nebo izolací či utracením slabých nebo umírajících zvířat.

Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Zvláštní pozornost je třeba věnovat tremoru, křečím, slinění, průjmům, letargii, spánku a kómatu. Doba uhynutí se zaznamená co nejpřesněji. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají. Zaznamenají se všechny makroskopické patologické nálezy. V případě potřeby se odeberou tkáně pro histopatologické vyšetření.

Posouzení toxicity u druhého pohlaví

Po dokončení zkoušky na jednom pohlaví se látka podá nejméně jedné skupině o pěti zvířatech druhého pohlaví s cílem zjistit, zda nejsou zvířata druhého pohlaví na zkoušenou látku výrazně citlivější. V jednotlivých případech může být odůvodněno použití menšího počtu zvířat. Pokud je k dispozici spolehlivá informace, že zvířata pohlaví, které je zkoušeno, jsou výrazně citlivější, je možno zkoušení na zvířatech druhého pohlaví vynechat.

2. ÚDAJE

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu uvede počet zvířat na počátku zkoušky, doba uhynutí jednotlivých zvířat, počet zvířat s jinými příznaky toxicity, popis toxických účinků a pitevní nálezy. Hmotnost jednotlivých zvířat se stanoví a zaznamená krátce před aplikací zkoušené látky, poté v týdenních intervalech a v době uhynutí. Změny hmotnosti je třeba stanovit a zaznamenat, přezívají-li zvířata déle než jeden den. Zvířata, která byla humánním způsobem utracena s ohledem na utrpení a bolest vyvolané podanou látkou, se zaznamenávají jako uhynutí vyvolané látkou. LD₅₀ se vypočte pomocí uznávané metody.

Vyhodnocení dat by mělo zahrnovat také vztah, pokud existuje, mezi expozicí zvířat zkoušené látce a výskytem a závažností všech abnormalit, včetně změn chování, klinických symptomů, makroskopických lézí, změn tělesné hmotnosti, mortality a ostatních toxikologických účinků.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

▼ B

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,
- zkušební podmínky (včetně způsobu očištění kůže a typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- pohlaví zvířat, jimž byla látka podána,
- údaje o odezvě podle pohlaví a podle úrovně dávky, a to ve formě tabulky (tj. počet uhynulých zvířat nebo počet zvířat, která byla v průběhu zkoušky utracena, počet zvířat s příznaky toxicity, počet exponovaných zvířat),
- doba uhynutí po podání zkoušené látky, důvody a kritéria pro humánní utracení zvířat,
- všechna pozorování,
- hodnota LD₅₀ pro pohlaví, u něhož byla provedena úplná studie, a to pro 14denní pozorování (s uvedením metody stanovení),
- 95 % interval spolehlivosti pro LC₅₀ (lze-li jej vypočítat),
- křivka závislosti mortality na dávce a její směrnice, pokud to metoda stanovení umožňuje,
- pitevní nálezy,
- všechny histopatologické nálezy,
- výsledky všech zkoušek na druhém pohlaví,
- rozbor výsledků (zvláštní pozornost je třeba věnovat vlivu, který by mohlo mít humánní utracení zvířat během zkoušky na vypočtenou hodnotu LC₅₀),
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B (E).

▼B**B.4 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI****1. METODA**

Tato metoda je rovnocenná metodě OECD TG 404 (2002).

1.1 ÚVOD

Při přípravě této modernizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením v oblasti dobrého zacházení se zvířaty a vyhodnocování veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se zkouškám na laboratorních zvířatech, které nejsou nutné. Součástí této metody je doporučení, aby byla před provedením popsané zkoušky dráždivých a leptavých účinků látky na kůži *in vivo* vypracována analýza průkaznosti stávajících relevantních údajů. Pokud jsou k dispozici nedostatečné údaje, lze je s využitím metody postupného zkoušení rozpracovat (1). Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* a je popsána v příloze k této metodě. Navíc se v případě potřeby v počáteční zkoušce *in vivo* doporučuje namísto současného aplikování postupná aplikace tří testovacích náplastí.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se zkoušky *in vivo* neměly provádět, dokud nebyly všechny dostupné údaje, významné pro potenciální leptavé nebo dráždivé účinky látky, vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech a/nebo laboratorních zvířatech, důkazy leptavých nebo dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí takových látek, údaje dokládající silnou kyselost nebo zásaditost látky (2, 3) a výsledky validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo* (4, 5, 5a). Tato analýza by měla snížit potřebu zkoušek leptavých nebo dráždivých účinků na kůži metodou *in vivo* u látek, u nichž již existují důkazy z jiných studiích, pokud jde o tyto dva ukazatele.

V příloze k této metodě je uvedena upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných a uznaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo*. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD (6), jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS) (7). Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky které lze dosáhnout vědecky spolehlivých údajů o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

Pokud pomocí analýzy průkaznosti výsledků nelze o leptavých nebo dráždivých účincích rozhodnout, měla by se v souladu se strategií postupného zkoušení uvážit zkouška *in vivo* (viz dodatek).

▼B

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na kůži: vyvolání vratných změn na kůži do 4 hodin po aplikaci zkoušené látky.

Leptavé účinky na kůži: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se v jedné dávce nanese na kůži pokusného zvířete, přičemž oblasti neexponované kůže pokusného zvířete slouží jako kontrola. Ve stanovených intervalech se určí, vyhodnotí a následně popíše stupeň dráždivých/leptavých účinků, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost pozorovaných účinků.

Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení a/nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria pro rozhodování o utracení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v literatuře (8).

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava na zkoušku *in vivo***1.4.1.1 *Výběr druhu zvířat*

Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albín králíka, používají se mladá dospělá zvířata. Použití jiného druhu by mělo být zdůvodněno.

1.4.1.2 *Příprava zvířat*

Asi 24 hodin před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Je třeba dbát na to, aby se kůže neporanila. Smějí se použít pouze zvířata se zdravou, neporaněnou kůží.

Některé kmeny králíka mají plošky husté srsti, které jsou v některých obdobích roku výraznější. Na takových oblastech husté srsti by se zkouška provádět neměla.

1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla u králíků být 20 °C (± 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

▼ B**1.4.2 Postup zkoušky****1.4.2.1 Aplikace zkoušené látky**

Zkoušená látka se nanese na malou plochu kůže (asi 6 cm²) a pokryje se plátkem mulu s nedráždivou náplastí. V případech, kdy přímá aplikace není možná (např. kapaliny nebo některé pasty), by se měla zkoušená látka nejprve nanést na plátek mulu, který se následně přiloží na kůži. Po dobu trvání expozice je třeba přidržovat plátek volně na kůži vhodným semiokluzivním obvazem. Pokud se zkoušená látka nanáší na mul, měl by být na kůži připevněn tak, aby se zajistil dobrý kontakt s kůží a rovnoměrné rozložení látky na kůži. Je třeba zabránit tomu, aby se zvíře dostalo k mulu a zkoušenou látku požilo nebo vdechlo.

Zkoušené kapaliny se zpravidla aplikují neředěné. Při zkouškách pevných látek (které mohou být případně rozetřeny na prach) se zkoušená látka navlhčí co nejmenším množstvím vody (v případě potřeby jiným vhodným vehikulem), aby se zajistil dostatečný kontakt s kůží. Pokud se používají jiná vehikula než voda, měl by být potenciální vliv vehikula na dráždivé účinky zkoušené látky na kůži pouze minimální.

Po uplynutí doby expozice, která je obvykle 4 hodiny, se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo vhodným rozpouštědlem, aniž by došlo k ovlivnění odezvy nebo celistvosti kůže.

1.4.2.2 Úroveň dávek

Na testovací místo se nanese 0,5 ml kapaliny nebo 0,5 g pevné látky nebo pasty.

1.4.2.3 Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo* s použitím jednoho zvířete)

Důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom zvířeti, zejména pokud existuje podezření, že látka má potenciální leptavé účinky. Tento postup je v souladu se strategií postupného zkoušení (viz dodatek 1).

Pokud byla na základě analýzy průkaznosti výsledků látka posouzena jako leptavá, není žádné další zkoušení na zvířatech nutné. U většiny látek, u nichž je podezření, že jsou leptavé, nejsou obvykle další zkoušky *in vivo* nutné. Avšak v těch případech, kdy je kvůli nedostatku důkazů považováno za nezbytné zjistit další údaje, mohou být v omezené míře provedeny zkoušky na zvířatech podle tohoto postupu: zvířeti se postupně přiloží nejvýše tři testovací náplasti. První náplast se odstraní po třech minutách. Pokud není pozorována závažná kožní reakce, odstraní se druhá náplast po jedné hodině. Pokud pozorování v této fázi naznačují, že expozici lze bez porušení zásady humánního zacházení prodloužit na čtyři hodiny, přiloží se třetí náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní, a vyhodnotí se odezva.

Pokud je po některé ze tří následných expozic pozorován leptavý účinek, zkouška se okamžitě ukončí. Pokud po odstranění třetí náplasti není leptavý účinek pozorován, zvíře se pozoruje po dobu 14 dnů, pokud se u něj poleptání kůže neprojeví dříve.

▼ B

V takových případech, kdy se u zkoušené látky nepředpokládá, že vyvolá leptavé účinky, ale může být dráždivá, by se měla jednomu zvířeti přiložit jedna náplast na čtyři hodiny.

1.4.2.4 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na kůži in vivo s dalšími zvířaty)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na dvou dalších zvířatech, u každého s jednou náplastí a dobou expozice 4 hodiny. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších zvířat současně. Ve výjimečném případě, kdy se počáteční zkouška neprovádí, lze dvěma nebo třem zvířatům přiložit jednu náplast, která se po čtyřech hodinách odstraní. Jestliže se použijí dvě zvířata a u obou se projeví stejná reakce, není žádné další zkoušení nutné. Jinak se zkouší také třetí zvíře. Sporné reakce je možné zhodnotit na dalších zvířatech.

1.4.2.5 *Doba pozorování*

Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena kdykoliv v okamžiku, kdy zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení. Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla pozorovat 14 dnů po odstranění náplastí. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 14 dnů, zkouška se v tomto okamžiku ukončí.

1.4.2.6 *Klinická pozorování a hodnocení reakcí kůže*

Všechna zvířata se pozorují na příznaky erytému a edému, reakce kůže se hodnotí po 60 min a dále po 24, 48 a 72 hodinách po odstranění náplastí. V počáteční zkoušce na jednom zvířeti se po odstranění náplastí okamžitě vyšetří také testované místo. Kožní reakce se vyhodnotí a zaznamenají podle stupnice v níže uvedené tabulce. Pokud se objeví poškození kůže, které po 72 hodinách nelze označit za dráždivé nebo leptavé účinky, může být nezbytné pozorování až do 14. dne kvůli stanovení vratnosti účinků. Vedle pozorování dráždivých účinků by měly být důkladně popsány a zaznamenány veškeré místní toxické účinky, jako je odtučnění kůže a jakékoli systémové nežádoucí účinky (např. vliv na klinické příznaky toxicity a tělesnou hmotnost). K objasnění sporných reakcí se zváží histopatologické vyšetření.

Hodnocení reakcí kůže je nevyhnutelně subjektivní. S cílem podporovat harmonizaci hodnocení reakcí kůže a napomáhat zkušebními laboratořím a těm, kdo provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování (viz níže uvedená tabulka). Jako pomůcku lze použít ilustrované pokyny pro hodnocení dráždivých účinků na kůži a jiných lézí (9).

2. **ÚDAJE**

2.1 **PŘEDKLÁDÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Výsledky studie se shrnou do tabulky uvedené v závěrečném protokolu o zkoušce. Měly by zpracovávat všechny položky uvedené v části 3.1.

▼ B

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Stupně dráždivých účinků na kůži se zhodnotí ve spojení s povahou a závažností lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které je nutno zhodnotit společně s dalšími pozorováními vyplývajícími ze studie.

Při hodnocení dráždivých reakcí se zohlední vratnost kožních lézí. Pokud do ukončení čtrnáctidenní doby pozorování přetrvávají reakce jako alopecie (na omezené ploše), hyperkeratóza, hyperplazie a šupinatění, považuje se zkoušená látka za dráždivou.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

- popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,
- údaje získané v každé fázi strategie zkoušení,
- popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/-referenčními látkami,
- analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, šarže),
- fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. pH, těkavost, rozpustnost, stabilita),
- pokud jde o směs, její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech.

Vehikulum:

- identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albín králíka,
- počet zvířat každého pohlaví,
- hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a v závěru zkoušky,
- stáří na začátku studie,
- původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

▼ B

Zkušební podmínky:

- technika přípravy oblasti kůže, na kterou se nanese náplast,
- podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,
- podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, jejím nanesení a odstranění.

Výsledky:

- údaje o stupni odezvy na dráždivé nebo leptavé účinky u každého zvířete v každém okamžiku měření,
- popis všech pozorovaných lézí,
- podrobný popis povahy a stupně pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků a případné histopatologické nálezy,
- popis jiných místních (např. odučnění kůže) a systémových účinků vedle dráždivých nebo leptavých účinků na kůži.

Rozbor výsledků.

4.

LITERATURA

- 1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J. B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.
- 2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19–26.
- 3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R. D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709–720.
- 4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation“, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- 5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzthutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, s. 483–524.
- 5a) Zkušební metoda B.40 Leptavé účinky na kůži.
- 6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www.oecd1.org/ehs/test/background.htm>).
- 7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd1.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

▼B

- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd1.org/ehs/test/monos.htm>).
- 9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Available from OECD Secretariat upon request].

▼B*Tabulka 1***HODNOCENÍ KOŽNÍCH REAKCÍ****Tvorba erytému a příškvaru**

Žádný erytém	0
Velmi slabý erytém (sotva patrný)	1
Zřetelně viditelný erytém	2
Mírný až výrazný erytém	3
Těžký erytém (silné zrudnutí) nebo tvorba příškvaru znemožňující posouzení erytému	4

Maximálně možné: 4

Tvorba edému

Žádný edém	0
Velmi lehký edém (sotva patrný)	1
Lehký edém (okraje jsou patrné, plocha je ohraničena zřetelným vyvýšením)	2
Mírný edém (okraje vyvýšeny asi o 1 mm)	3
Výrazný edém (zduření více než 1 mm a otok přesahující hranice exponované plochy)	4

Maximálně možné: 4

Pro objasnění sporných reakcí lze provést histopatologické vyšetření.



DODATEK

Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži

OBECNÉ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty je důležité vyhýbat se zbytečnému používání zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních leptavých/dráždivých účinků látky na kůži by se měly zhodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Je možné, že již existuje dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle její schopnosti vyvolávat leptavé nebo dráždivé účinky na kůži, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na laboratorních zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých nebo leptavých účinků látky na kůži zhodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie jiné než kožní studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a pomocí ní získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by měla být strategie postupného zkoušení využita k získání souboru údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich možných leptavých nebo dráždivých účinků. Strategie zkoušení popsána v této příloze byla vypracována na semináři OECD (1) a později potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998 (2).

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.4, vyjadřuje doporučený postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na kůži. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Metoda zkoušení poskytuje návod pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, které by před zahájením takové zkoušky měly být zváženy. Tato strategie představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých/leptavých účincích zkoušených látek a odstupňovaný přístup k vytváření relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Doporučuje se také za určitých okolností provést validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* na zjištění dráždivých/leptavých účinků na kůži.

POPIS STRATEGIE VYHODNOCOVÁNÍ A ZKOUŠENÍ

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (obrázek) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze významné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnoty pH), stávající informace by se měly vzít v úvahu jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích dotyčné látky nebo jejich obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na průkaznosti výsledků. Mělo by se podat zdůvodnění tohoto rozhodnutí. Hlavní důraz by se měl klást na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie leptavých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

▼B

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení a/nebo údaje o zkouškách na zvířatech, např. z jednorázových nebo opakovaných studií dermální toxicity, protože z těchto údajů lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na kůži. Látky, jejichž dráždivé nebo leptavé účinky jsou známy, a látky, o nichž existují jednoznačné důkazy, že leptavé nebo dráždivé účinky nemají, není nutné zkoušet ve studiích *in vivo*.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturálně příbuzných látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturálně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka a/nebo zvířata naznačující, že mají schopnost leptavých/dráždivých účinků, lze předpokládat, že hodnocená zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturálně příbuzných látek nebo jejich směsí nepředstavují podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz o neexistenci leptavých/dráždivých účinků látky. Ke stanovení potenciálních leptavých a dráždivých účinků na kůži by měly být použity validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2,0$ a $\geq 11,5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé účinky látky na kůži stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrační kapacitu) (3, 4). Pokud lze podle pufrační kapacity soudit, že látka možná nemá leptavé účinky na kůži, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Dermální toxicita (krok 4). Pokud se ukáže, že chemická látka je při podání dermální cestou vysoce toxická, nebude se provádět studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, neboť množství zkoušené látky, které se obvykle nanáší, by mohlo přesáhnout vysoce toxickou dávku a mít za následek uhynutí nebo značné utrpení zvířat. Navíc pokud byly studie dermální toxicity využívající albíny králíka již provedeny do limitní úrovně dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti nebo vyšší a nebyly zjištěny žádné dráždivé nebo leptavé účinky, nebudou další zkoušky dráždivých/leptavých účinků na kůži zřejmě nutné. Při hodnocení akutní dermální toxicity v předchozích studiích je třeba mít na paměti několik aspektů. Např. zaznamenané informace o dermálních lézích nemusí být úplné. Zkoušení a pozorování mohlo být prováděno na jiných druzích než králík a citlivost reakcí jednotlivých druhů se může do značné míry lišit. Také forma zkoušené látky, která byla zvířatům podávána, možná nebyla vhodná pro hodnocení dráždivých/leptavých účinků na kůži (např. ředění látek určených ke zkoušení dermální toxicity) (5). Avšak v takových případech, kdy byly na králících provedeny dobře navrhované a realizované studie dermální toxicity, lze negativní nálezy považovat za dostatečné důkazy, že látka není žíravá nebo dráždivá.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé účinky ve validované a uznané zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo* (6, 7), jejímž cílem bylo hodnocení specifických účinků, není nutné zkoušet na zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky.

▼B

Zkouška in vivo na králících (kroky 7 a 8). Pokud je k provedení zkoušení *in vivo* nutné rozhodnutí založené na průkaznosti výsledku, mělo by toto zkoušení začínat s počáteční zkouškou na jednom zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé účinky na kůži, nemělo by se další zkoušení provádět. Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit maximálně na dvou dalších zvířatech po dobu expozice 4 hodiny. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován dráždivý účinek, lze potvrzující zkoušku provést postupně, nebo exponováním dvou dalších zvířat současně.

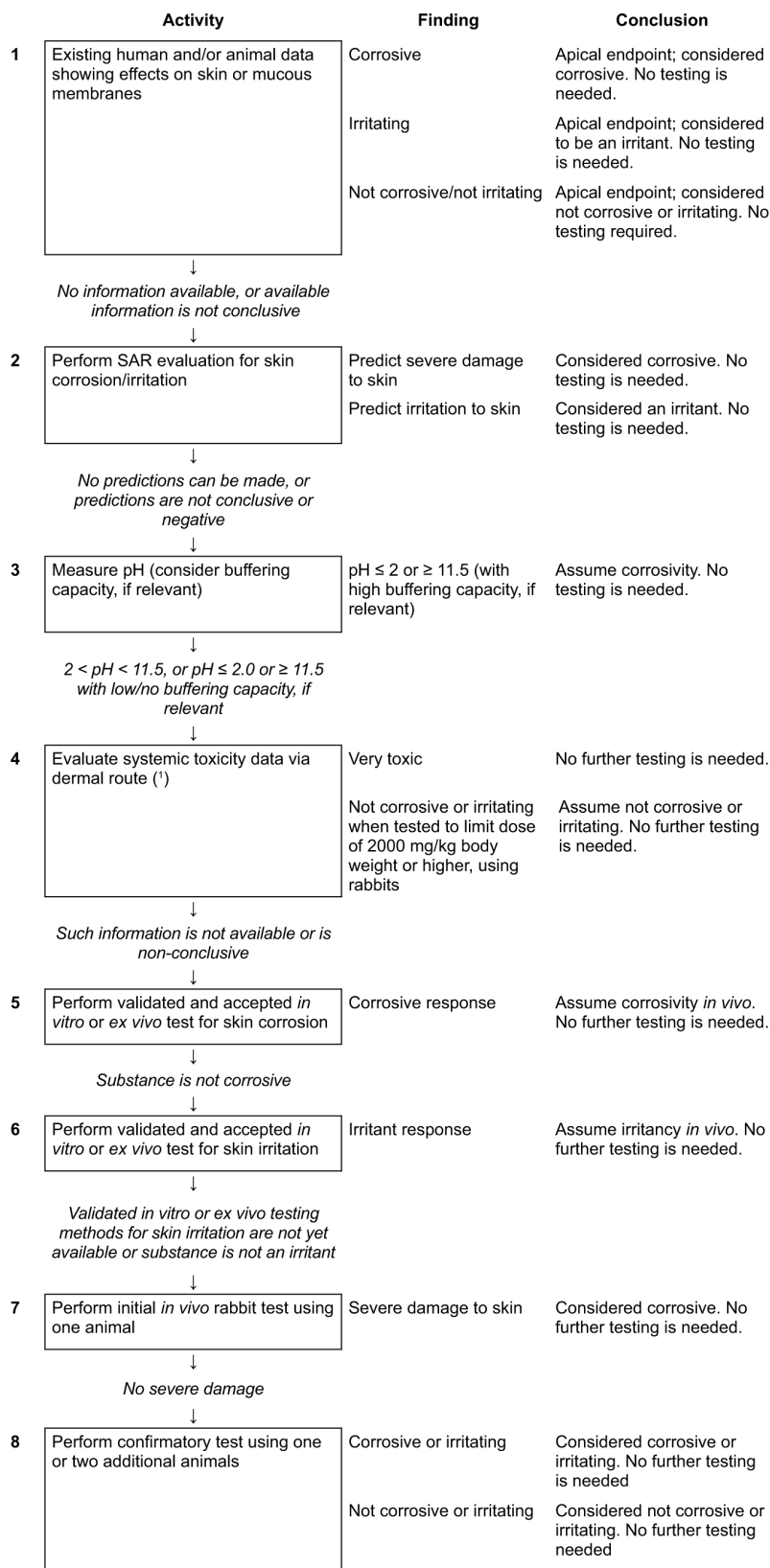
LITERATURA

- 1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, 709–720.
- 4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1) s. 19–26.
- 5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411–436.
- 6) Zkušební metoda B.40.
- 7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, s. 483–524.



Obrázek

STRATEGIE ZKOUŠENÍ A HODNOCENÍ DŘÁŽDIVÝCH/LEPTAVÝCH ÚČINKŮ NA KŮŽI



(¹) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B**B.5 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ/LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI****1. METODA**

Tato metoda je rovnocenná metodě OECD TG 405 (2002).

1.1 ÚVOD

Při přípravě této modernizované metody byla zvláštní pozornost věnována možným zlepšením, jichž lze dosáhnout vyhodnocováním veškerých existujících informací o zkoušené látce s cílem vyhnout se nadbytečným zkouškám na laboratorních zvířatech a zohlednit tak zásadu dobrého zacházení se zvířaty. Součástí této metody je doporučení, aby před provedením popsané zkoušky akutních dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo* byla vypracována analýza průkaznosti (1) stávajících relevantních údajů. Pokud nejsou k dispozici dostatečné údaje, doporučuje se získat je pomocí metody postupného zkoušení (2, 3). Strategie zkoušení zahrnuje provedení validovaných a schválených zkoušek *in vitro* a je popsána v příloze k této metodě zkoušení. Navíc se před zvažováním očního testu *in vivo* doporučuje provést zkoušku dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, na jejímž základě se předpoví možné leptavé účinky na oči.

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty by se ke zkouškám *in vivo* nemělo přistupovat, dokud nebyly všechny dostupné údaje významné pro možné leptavé/dráždivé účinky látky na oči vyhodnoceny na základě analýzy průkaznosti výsledků. Takové údaje budou zahrnovat důkazy ze stávajících studií na lidech a/nebo laboratorních zvířatech, důkazy leptavých/dráždivých účinků jedné nebo více strukturně příbuzných látek nebo směsí těchto látek, údaje dokládající vysokou kyselost nebo zásaditost látky (4, 5) a výsledky validovaných a uznaných zkoušek leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vitro* nebo *ex vivo* (6, 6a). Tyto studie mohly být vypracovány před analýzou průkaznosti výsledků nebo na základě zjištění této analýzy.

U některých látek může taková analýza naznačovat nutnost provedení studií možných leptavých/dráždivých účinků látky na oči *in vivo*. Ve všech takových případech se před zvážením použití oční zkoušky *in vivo* nejprve provede studie účinků látky na kůži *in vivo* a zhodnotí se v souladu s metodou zkoušení B.4 (7). Použití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení by mělo omezit potřebu zkoušení leptavých/dráždivých účinků na oči u těch látek, u nichž tyto účinky byly již dostatečně doloženy v jiných studiích. Pokud pomocí strategie postupného zkoušení nelze o možnosti leptavých nebo dráždivých účinků na oči rozhodnout ani po provedení studie leptavých a dráždivých účinků na kůži *in vivo*, lze provést zkoušku leptavých/dráždivých účinků na oči *in vivo*.

▼B

Upřednostňovaná strategie postupného zkoušení, jejíž součástí je provedení validovaných zkoušek leptavých/dráždivých účinků *in vitro* nebo *ex vivo*, je uvedena v příloze k této metodě zkoušení. Tato strategie byla vypracována na semináři OECD (8), jeho účastníky jednohlasně doporučena a přijata jako doporučená strategie zkoušení v globálně harmonizovaném systému klasifikace chemických látek (GHS) (9). Doporučuje se, aby se podle této strategie zkoušení postupovalo před prováděním zkoušek *in vivo*. U nových látek se doporučuje metoda zkoušení po krocích, díky níž lze dosáhnout vědecky spolehlivých poznatků o leptavých/dráždivých účincích látky. U existujících látek, o jejichž leptavých/dráždivých účincích na kůži a oči není k dispozici dostatek údajů, by se měla tato strategie využít pro doplnění chybějících informací. Použití jiné strategie nebo postupu zkoušení nebo rozhodnutí nepoužít metodu po krocích musí být odůvodněno.

1.2 DEFINICE

Dráždivé účinky na oči: vyvolání změn v oku po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Tyto změny jsou plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

Leptavé účinky na oči: vyvolání poškození oční tkáně nebo závažné fyzické zhoršení vidění po aplikaci zkoušené látky na přední povrch oka. Toto poškození není plně vratné do 21 dnů po aplikaci.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Látka, která má být zkoušena, se nanese v jedné dávce na jedno oko pokusného zvířete, přičemž neexponované oko slouží jako kontrola. V předem určených intervalech se na základě lézí spojivky, rohovky a duhovky vyhodnotí stupeň dráždivých/leptavých účinků na oči. Popíše se také jiné účinky na oko a nežádoucí systémové účinky, aby bylo možno provést úplné posouzení účinků. Doba studie by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné zhodnotit vratnost nebo nevratnost účinků.

Zvířata, která v jakékoli fázi zkoušky vykazují přetrvávající příznaky značného utrpení a/nebo bolesti, se humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Kritéria rozhodování o utrácení umírajících a značně trpících zvířat lze nalézt v literatuře (10).

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava na zkoušku *in vivo*

1.4.1.1 Výběr živočišných druhů

Upřednostňovaným laboratorním zvířetem je albín králíka, používají se zdravá mladá dospělá zvířata. Použití jiných kmenů nebo druhů je třeba zdůvodnit.

1.4.1.2 Příprava zvířat

24 hodin před zkouškou se u každého z předběžně vybraných pokusných zvířat provede vyšetření obou očí. Zvířata, u kterých se zjistí podráždění očí, oční defekt nebo poškození rohovky, se nepoužijí.

▼B1.4.1.3 *Podmínky chovu a krmení*

Zvířata se chovají samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být u králíků 20 °C (± 3 °C), relativní vlhkost vzduchu minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem však je hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

1.4.2 **Postup zkoušky**1.4.2.1 *Aplikace zkoušené látky*

Zkoušená látka se aplikuje každému zvířeti do spojivkového vaku jednoho oka tak, že se spodní víčko lehce odchlípne od oční bulvy. Víčka se pak asi na jednu sekundu lehce přidrží u sebe, aby nedošlo ke ztrátě látky. Druhé oko, do kterého se látka neaplikuje, slouží jako kontrola.

1.4.2.2 *Výplach*

Oči pokusných zvířat se do 24 hodin po instilaci zkoušené látky nevyplachují, s výjimkou pevných látek (viz část 1.4.2.3.2) a okamžitých leptavých nebo dráždivých účinků. Po 24 hodinách je možné v případě potřeby oči vypláchnout.

Použití satelitní skupiny zvířat k vyšetření vlivu výplachu očí se nedoporučuje, pokud to není vědecky odůvodněno. Je-li satelitní skupina nezbytná, použijí se dva králíci. Podmínky výplachu se podrobně zdokumentují, např. doba výplachu, složení a teplota promývacího roztoku, trvání, objem a rychlost aplikace.

1.4.2.3 *Úroveň dávek*1.4.2.3.1 *Zkoušení kapalin*

Při zkoušení kapalin se použije dávka 0,1 ml. K instilaci látky přímo do oka by se neměly používat aerosolové rozstřikovače s čerpadlem. Před instilací 0,1 ml do oka by se měla tekutina z rozstřikovače vypudit a shromáždit do nádoby.

1.4.2.3.2 *Zkoušení pevných látek*

Při zkoušení pevných látek, past a látek obsahujících částice se použije objem 0,1 ml nebo hmotnost nejvýše 100 mg. Zkoušená látka se rozemele na jemný prášek. Objem pevného materiálu se stanoví až po opatrném zhutnění, např. poklepáním odměrnou nádobkou. Pokud nebyla zkoušená pevná látka odstraněna z oka pokusného zvířete pomocí fyziologických mechanismů do doby prvního pozorování po 1 hodině po aplikaci, lze oko vypláchnout fyziologickým roztokem nebo destilovanou vodou.

▼B1.4.2.3.3 *Zkoušení aerosolů*

Před instilací látek do oka se doporučuje zachytit látky obsažené v rozstříkovačích nebo aerosolech do nádoby. Jedinou výjimkou jsou látky obsažené v aerosolové nádobce pod tlakem, které z důvodu odpařování zachytit nelze. V takových případech se oko podrží otevřené a látka se do oka aplikuje přímým vstříknutím trvajícím jednu sekundu ze vzdálenosti 10 cm. Vzdálenost se může lišit podle tlaku v rozprašovači a jeho obsahu. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození oka tlakem z rozprašovače. Případně bude nutné vyhodnotit možnost „mechanického“ poškození oka v důsledku rozprašovacího tlaku.

Dávku aerosolu lze odhadnout na základě této simulované zkoušky: látka se nastříká na odvažovací papír otvorem o velikosti králičího oka, který se nachází bezprostředně před papírem. Na základě zvýšení hmotnosti papíru se odhadne množství látky, která se vstříkne do oka. U těkavých látek lze dávku odhadnout pomocí zvážení odběrové nádoby před odstraněním zkoušené látky a po jejím odstranění.

1.4.2.4 *Počáteční zkouška (zkouška dráždivých/leptavých účinků na oči in vivo na jednom zvířeti)*

Jak je uvedeno ve strategii postupného zkoušení (viz dodatek 1), důrazně se doporučuje, aby byla zkouška *in vivo* provedena nejprve na jednom zvířeti.

Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči při použití popsaného postupu, další zkoušení dráždivých účinků na oči se neprovádí.

1.4.2.5 *Lokální anestetika*

V jednotlivých případech lze použít lokální anestetika. Pokud analýza průkaznosti výsledků naznačuje, že látka může způsobit bolest, nebo pokud počáteční zkoušky ukazují, že se objeví bolestivá reakce, lze před instilací zkoušené látky použít lokální anestetika. Typ, koncentraci a dávku lokálního anestetika je třeba pečlivě zvolit, aby bylo zajištěno, že v důsledku jeho použití nedojde k odlišné reakci na zkoušenou látku. Podobně se musí znecitlivět i kontrolní oko.

1.4.2.6 *Potvrzující zkouška (zkouška dráždivých účinků na oči in vivo na dalších zvířatech)*

Pokud během počáteční zkoušky není pozorován leptavý účinek, měla by se dráždivá nebo negativní reakce potvrdit na maximálně dalších dvou zvířatech. Pokud je během počáteční zkoušky pozorován značný dráždivý účinek, který naznačuje možný silný (nevratný) účinek v potvrzující zkoušce, doporučuje se provést potvrzující zkoušku metodou postupného zkoušení na jednom zvířeti spíše než exponováním dalších dvou zvířat současně. Pokud se u druhého zvířete projeví leptavé nebo vysoce dráždivé účinky, ve zkoušce se nepokračuje. K potvrzení slabých nebo mírných dráždivých reakcí bude případně nutné použít další zvířata.

▼ B1.4.2.7 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být dostatečně dlouhá, aby bylo možné plně zhodnotit míru a vratnost pozorovaných účinků. Zkouška by však měla být ukončena vždy, pokud zvíře vykazuje přetrvávající příznaky značné bolesti nebo utrpení (9). Za účelem určení vratnosti účinků by se zvířata měla obvykle pozorovat 21 dnů po podání zkoušené látky. Pokud je vratnost pozorována před uplynutím 21 dnů, zkouška by se měla v tomto okamžiku ukončit.

1.4.2.7.1 *Klinická pozorování a hodnocení očních reakcí*

Oči se vyšetří po 1, 24, 48 a 72 hodinách po podání zkoušené látky. Jakmile se získají konečné informace, nemělo by zkoušení na zvířatech probíhat déle, než je nezbytné. Zvířata se známkami přetrvávajícího utrpení nebo značných bolestí se neprodleně humánně utratí a látka se odpovídajícím způsobem vyhodnotí. Humánně se utratí ta zvířata, u nichž došlo po instilaci k těmto očním lézím: perforace rohovky nebo výrazné zvředovatění rohovky včetně stafyloemu; krev v přední komoře oční; zákal rohovky stupně 4 přetrvávající 48 h; absence reakce na osvit (reakce duhovky stupně 2) přetrvávající 72 hodin; zvředovatění spojivkové membrány; nekróza spojivek nebo slzné žlázy; nebo odlupování nekrotické hmoty. Tento postup je dán nevratností takových lézí.

Zvířata, u nichž oční léze nevzniknou, nelze utratit dříve než 3 dny po instilaci. Zvířata s mírnými až středními lézemi se pozorují, dokud léze nevymizí, nebo po 21 dnů, po jejichž uplynutí se studie ukončí. Po 7, 14 a 21 dnech se provádí pozorování, aby se určil stav lézí a jejich vratnost nebo nevratnost.

Stupeň reakce oka (spojivek, rohovky a duhovky) je třeba zaznamenat při každém vyšetření (tabulka 1). Uvedou se také jakékoli jiné oční léze (např. panus, zbarvení) nebo nežádoucí systémové účinky.

Vyšetřování reakcí lze usnadnit použitím binokulární lupy, ruční štěrbínové lampy, očního mikroskopu nebo jiných vhodných zařízení. Po zaznamenání pozorování po 24 hodin mohou být oči zvířat dále vyšetřeny fluoresceinem.

Hodnocení očních reakcí je nutně subjektivní. s cílem podporovat harmonizaci hodnocení očních reakcí a napomáhat zkušebními laboratorii a tým, kteří provádějí a interpretují pozorování, musí být zaměstnanci provádějící pozorování odpovídajícím způsobem kvalifikováni pro práci s používaným systémem vyhodnocování.

2. **ÚDAJE**2.2 **HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ**

Stupně dráždivých účinků na oči se zhodnotí ve spojení s povahou a stupněm závažnosti lézí a jejich vratností nebo nevratností. Jednotlivé stupně nepředstavují absolutní měřítko dráždivých vlastností látky, neboť se hodnotí také jiné účinky zkoušené látky. Jednotlivé stupně by spíše měly být považovány za referenční hodnoty, které jsou smysluplné, pouze pokud se opírají o úplný popis a hodnocení veškerých pozorování.

▼ B3. **ZPRÁVY**

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Zdůvodnění zkoušení *in vivo*: analýza průkaznosti výsledků předchozích pokusů, včetně výsledků strategie postupného zkoušení:

- popis relevantních údajů z předchozích zkoušek,
- údaje získané v každém kroku strategie zkoušení,
- popis provedených zkoušek *in vitro*, včetně podrobných údajů o postupech a o výsledcích získaných se zkoušenými/-referenčními látkami,
- popis provedené studie dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*, včetně získaných výsledků,
- analýza průkaznosti výsledků odůvodňující provedení studie *in vivo*.

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, zdroj, čistota, známé nečistoty, číslo šarže),
- fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. hodnota pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, reaktivita s vodou),
- v případě směsi její složení a relativní podíl složek vyjádřený v procentech,
- je-li použito lokální anestetikum, jeho identifikace, čistota, typ, dávka a možná interakce se zkoušenou látkou.

Vehikulum:

- identifikace, koncentrace (podle potřeby), použitý objem,
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen, zdůvodnění použití jiných zvířat, není-li použit albín králíka,
- stáří každého zvířete na začátku studie,
- počet zvířat každého pohlaví ve zkušebních a kontrolních skupinách (je-li to nutné),
- hmotnosti jednotlivých zvířat na začátku a na konci zkoušky,
- původ, podmínky chovu, strava atd.

Výsledky:

- popis metody vyhodnocení dráždivosti při každém pozorování (např. ruční štěrbinová lampa, biomikroskop, fluorescein),

▼B

- údaje ve formě tabulky o reakcích na dráždivé nebo leptavé účinky u jednotlivých zvířat při každém pozorování až do vyjmutí každého zvířete ze zkoušky,
- podrobný popis stupně a charakteru pozorovaných dráždivých nebo leptavých účinků,
- popis všech dalších pozorovaných očních lézí (např. vaskularizace, tvorba zánětu rohovky, srůst sousedních tkání, zbarvení),
- popis místních a systémových nepříznivých účinků mimo oči a případné histopatologické nálezy.

Diskuse a interpretace výsledků.

3.2 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Extrapolace výsledků studií dráždivých účinků na oči laboratorních zvířat na člověka je platná jen v omezené míře. Albín králík je ve většině případů na dráždivé a leptavé látky citlivější než člověk.

Je třeba dbát na to, aby byla při interpretaci údajů vyloučena dráždivost pramenící ze sekundární infekce.

4. LITERATURA

- 1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J. B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.
- 2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159–164.
- 3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.
- 4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19–26.
- 5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.
- 6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, s. 483–524.
- 6a) Zkušební metoda B.40 Leptavé účinky na kůži.
- 7) Zkušební metoda B.4. Akutní toxicita: dráždivé/leptavé účinky na kůži.
- 8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

▼B

- 9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

▼ B

Tabulka 1

STUPNICE OČNÍCH LÉZÍ**Rohovka**

Zákal: stupeň hustoty (vyšetří se nejvíce zakalené oblasti) (*)

Žádné zvrhodovatění ani zákal	0
Rozptýlené nebo difúzní oblasti zákalu (jiné než slabé zastření normálního lesku), detaily duhovky jasně viditelné	1
Snadno identifikovatelná průhledná oblast, detaily duhovky lehce zastřené	2
Přítomnost zóny opalescence, detaily duhovky nejsou viditelné, velikost zornice stěží rozeznatelná	3
Úplná neprůhlednost rohovky, duhovka je zcela neviditelná	4

Maximálně možné: 4

POZNAMKY

(*) Zaznamenaná se oblast zákalu rohovky.

Duhovka

Normální	0
Výrazně prohloubené řasy, městnání, otoky, střední překrvení kolem rohovky nebo překrvení při zánětu; rohovka reaguje na světlo (zpožděná reakce je považována za účinek)	1
Krvácení, makroskopické poškození nebo bez reakce na světlo	2

Maximálně možné: 2

Spojivky

Zčervenání (podle nejzávažnější změny pozorované na víčkové nebo bulbární spojivce, kromě rohovky a duhovky)

Normální	0
Některé krevní cévy hyperemické (překrvené)	1
Difúzní, rudá barva, jednotlivé cévy nesnadno rozeznatelné	2
Difúzní temně rudá barva	3

Maximálně možné: 3

Chemóza

Otoky (týká se víček a/nebo slzných žláz)

Normální	0
Slabě abnormální otok	1
Patrný otok, s částečným obrácením víček	2
Otok způsobující uzavření víček zhruba na polovinu	3
Otok způsobující uzavření víček více než na polovinu	4

Maximálně možné: 4



Dodatek

Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na oči

OBECNÉ ÚVAHY

V zájmu spolehlivého vědeckého přístupu a dobrého zacházení se zvířaty je důležité vyhýbat se zbytečnému používání zvířat a minimalizovat jakékoli zkoušky, které u zvířat pravděpodobně vyvolají závažné reakce. Veškeré informace týkající se potenciálních dráždivých/leptavých účinků látky na oči by se měly zhodnotit před zvažováním zkoušení *in vivo*. Může již existovat dostatek důkazů pro klasifikaci zkoušené látky podle jejích potenciálních dráždivých nebo leptavých účinků na oči, aniž by bylo nutné provádět zkoušky na laboratorních zvířatech. Proto využití analýzy průkaznosti výsledků a strategie postupného zkoušení sníží potřebu provádět zkoušení *in vivo*, zejména pokud látka pravděpodobně vyvolá závažné reakce.

Doporučuje se, aby se stávající informace týkající se dráždivých a leptavých účinků látky na oči zhodnotily pomocí analýzy průkaznosti výsledků, na jejímž základě se rozhodne o tom, zda by se k lepší charakteristice tohoto potenciálu měly provést další studie, jiné než oční studie *in vivo*. Jsou-li nutné další studie, doporučuje se využít strategie postupného zkoušení a jejím prostřednictvím získat relevantní experimentální údaje. U látek, které doposud nebyly zkoušeny, by se měla strategie postupného zkoušení využít k získání údajů, které jsou nezbytné k vyhodnocení jejich leptavých nebo dráždivých účinků na oči. Strategie zkoušení popsaná v této příloze byla vypracována na semináři OECD (1). Následně byla tato strategie potvrzena a rozpracována v Harmonizovaném integrovaném systému klasifikace nebezpečí chemických látek pro lidské zdraví a jejich vlivu na životní prostředí, který schválilo 28. společné zasedání Výboru pro chemické látky a Pracovní skupiny pro chemické látky v listopadu 1998 (2).

Ačkoliv tato strategie postupného zkoušení není nedílnou součástí zkušební metody B.5, vyjadřuje doporučený postup stanovení dráždivých/leptavých účinků na oči. Tento postup představuje nejlepší praktický i etický standard pro zkoušení dráždivých/leptavých účinků na oči *in vivo*. Metoda zkoušení obsahuje pokyny pro provádění zkoušky *in vivo* a shrnuje faktory, kterým je nutno před zvažováním takové zkoušky věnovat pozornost. Strategie postupného zkoušení představuje přístup posuzování existujících údajů o dráždivých a leptavých účincích látek na oči a odstupňovaný přístup k získávání relevantních údajů o látkách, u kterých je nutné provést další studie, nebo u nichž žádné studie nebyly doposud provedeny. Součástí této strategie je provedení nejprve validovaných a uznaných zkoušek *in vitro* nebo *ex vivo* a poté za určitých okolností provedení studií dráždivých/leptavých účinků na kůži metodou zkoušení B.4 (3, 4).

POPIS STRATEGIE ZKOUŠENÍ PO KROCÍCH

Před zahájením zkoušek v rámci strategie postupného zkoušení (obrázek) se vyhodnotí veškeré dostupné informace, aby se mohlo rozhodnout o nutnosti provést zkoušení *in vivo*. Ačkoliv lze podstatné informace získat z vyhodnocení jednotlivých parametrů (např. extrémní hodnota pH), stávající informace by se měly hodnotit jako celek. Všechny relevantní údaje o účincích zkoušené látky a jejích strukturálních obdob se vyhodnotí na základě rozhodnutí založeném na průkaznosti výsledků, toto rozhodnutí se zdůvodní. Zvláštní důraz bude kladen na již existující údaje o účincích látky na člověka a zvířata a dále na výsledky zkoušení *in vitro* nebo *ex vivo*. Studie žíravých látek *in vivo* by se měly provádět co nejméně. Mezi faktory uvedené ve strategii zkoušení patří:

▼ B

Hodnocení existujících údajů o účincích látky na člověka a zvířata (krok 1). Nejprve je nutné vzít v úvahu existující údaje o účincích na člověka, např. klinické studie nebo studie nemocí z povolání, záznamy subjektů hodnocení a/nebo údaje o zkouškách na zvířatech získané z očních studií, protože z těchto dat lze získat informace přímo se vztahující k účinkům na oči. Poté se zhodnotí dostupné údaje ze studií na lidech a/nebo na zvířatech zabývajících se leptavými/dráždivými účinky na kůži. Látky, jejichž leptavé nebo vysoce dráždivé účinky na oči jsou známy, se do očí zvířat neaplikují. To platí rovněž pro látky vykazující leptavé nebo dráždivé účinky na kůži; takové látky se považují za látky s leptavými a/nebo dráždivými účinky rovněž na oči. Látky, o nichž byly v předchozích očních studiích získány dostatečné důkazy, že jsou nežiravé a nedráždivé, se v očních studiích *in vivo* také nezkoušejí.

Analýza vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) (krok 2). Vezmou se v úvahu výsledky zkoušek strukturně příbuzných chemických látek, jsou-li k dispozici. Pokud jsou k dispozici dostatečné údaje o účincích strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí na člověka a/nebo zvířata naznačující, že mají potenciál leptavých/dráždivých účinků na oči, lze předpokládat, že zkoušená látka vyvolá stejné reakce. V takových případech není nutné tuto látku zkoušet. Negativní údaje získané ze studií strukturně příbuzných látek nebo jejich směsí nezakládají podle strategie postupného zkoušení dostatečný důkaz nežiravosti/-nedráždivosti látky. Ke stanovení potenciálu leptavých/dráždivých účinků na kůži i oči by měly být použity validované a uznané postupy vycházející z analýzy SAR.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (krok 3). Látky vykazující extrémní hodnoty pH jako $\leq 2,0$ nebo $\geq 11,5$ mohou mít silné místní účinky. Pokud se leptavé nebo dráždivé účinky látky na oči stanoví na základě extrémních hodnot pH, lze také vzít v úvahu kyselou/alkalickou rezervu (pufrální kapacitu) (5, 6). Pokud lze podle pufrální kapacity soudit, že látka zřejmě nemá leptavé účinky na oči, musí tento předpoklad potvrdit další zkoušky, pokud možno s využitím validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* (viz kroky 5 a 6).

Zvážení dalších existujících informací (krok 4). V této fázi se vyhodnotí veškeré dostupné informace o systémové toxicitě dermální cestou. Vezme se v úvahu také akutní dermální toxicita zkoušené látky. Pokud se u zkoušené látky ukázalo, že je při podání dermální cestou vysoce toxická, není nutné zkoušet ji na oku. Ačkoliv mezi akutní dermální toxicitou a dráždivými/leptavými účinky na oči nemusí nezbytně existovat souvislost, lze se domnívat, že pokud je látka při podání dermální cestou vysoce toxická, bude vysokou toxicitu vykazovat také při instilaci do oka. Takové údaje lze také vzít v úvahu mezi kroky 2 a 3.

Výsledky ze zkoušek in vitro nebo ex vivo (kroky 5 a 6). Látky, které vykazovaly leptavé nebo výrazně dráždivé vlastnosti ve zkoušce *in vitro* nebo *ex vivo* (7, 8), která byla validována a uznána pro hodnocení výlučně leptavých/dráždivých účinků na oči nebo na kůži, není nutné zkoušet na zvířatech. Lze předpokládat, že takové látky vyvolají ve zkoušce *in vivo* podobné závažné účinky. Nejsou-li validované a uznané zkoušky *in vitro* nebo *ex vivo* k dispozici, kroky 5 a 6 se přeskočí a přejde se přímo ke kroku 7.

Posouzení dráždivých nebo leptavých účinků na kůži in vivo (krok 7). Pokud stávající důkazy k provedení přesvědčivé analýzy průkaznosti výsledků potenciálních dráždivých/leptavých účinků látky na oči opírající se o údaje z výše uvedených studií nepostačují, nejprve se s využitím metody B.4 (4) a průvodní přílohy (9) vyhodnotí potenciál dráždivých/leptavých účinků na kůži *in vivo*. Jestliže se u látky prokáží leptavé nebo silně dráždivé účinky na kůži, považuje se za látku s leptavými a dráždivými účinky na oči, pokud jiné informace nesvědčí o odlišném závěru. Oční zkoušku *in vivo* by tak nebylo nutné provádět. Pokud látka leptavé nebo výrazně dráždivé účinky na kůži nemá, oční zkouška *in vivo* se provede.

▼B

Zkouška *in vivo* na králících (kroky 8 a 9). Oční zkoušení *in vivo* se zahájí počáteční zkouškou na jednom zvířeti. Pokud výsledky této zkoušky naznačují, že látka má silně dráždivé nebo leptavé účinky na oči, další zkoušení se neprovádí. Pokud zkouška žádné leptavé nebo silně dráždivé účinky neodhalí, provede se potvrzující zkouška na dvou dalších zvířatech.

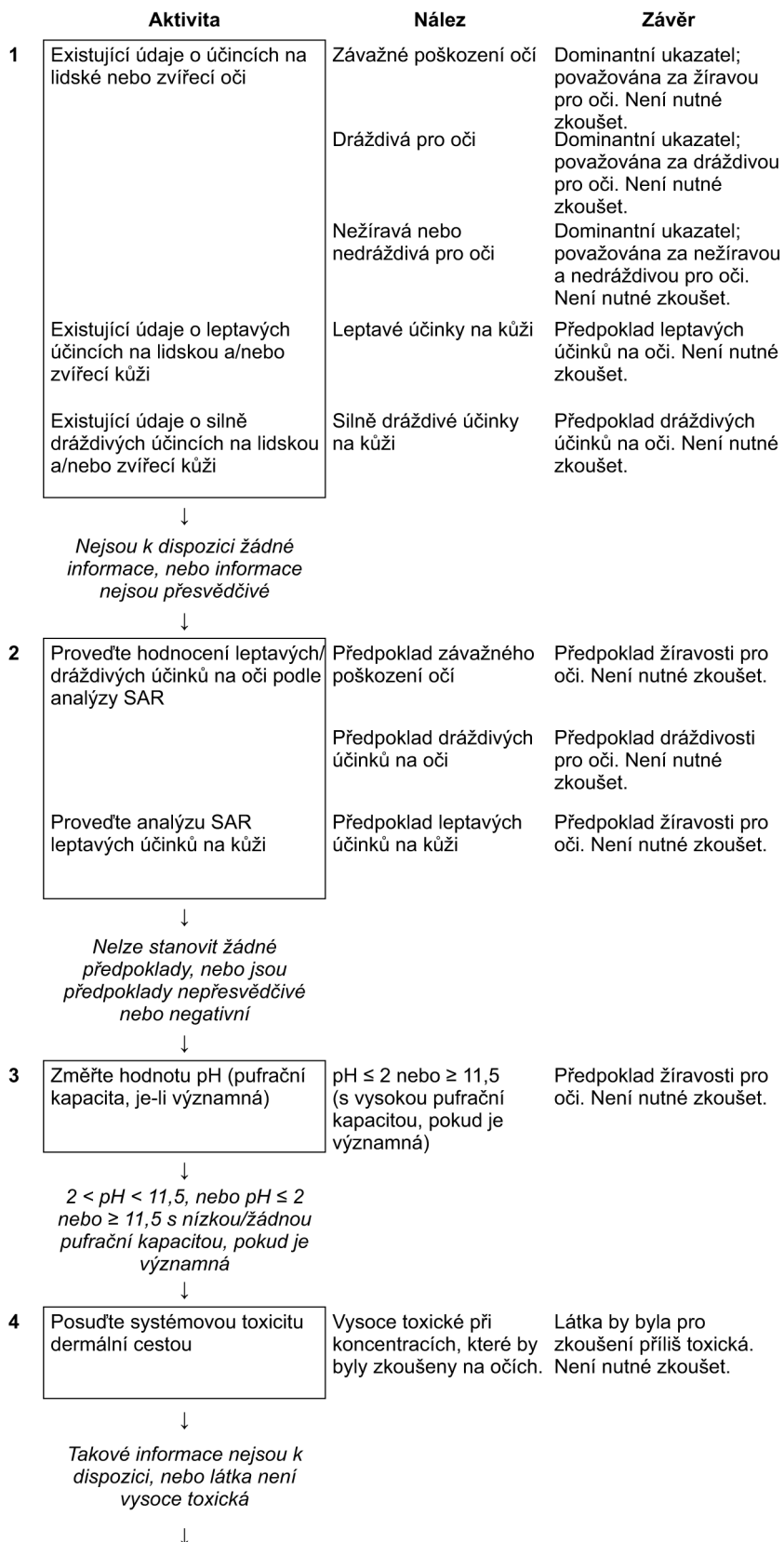
LITERATURA

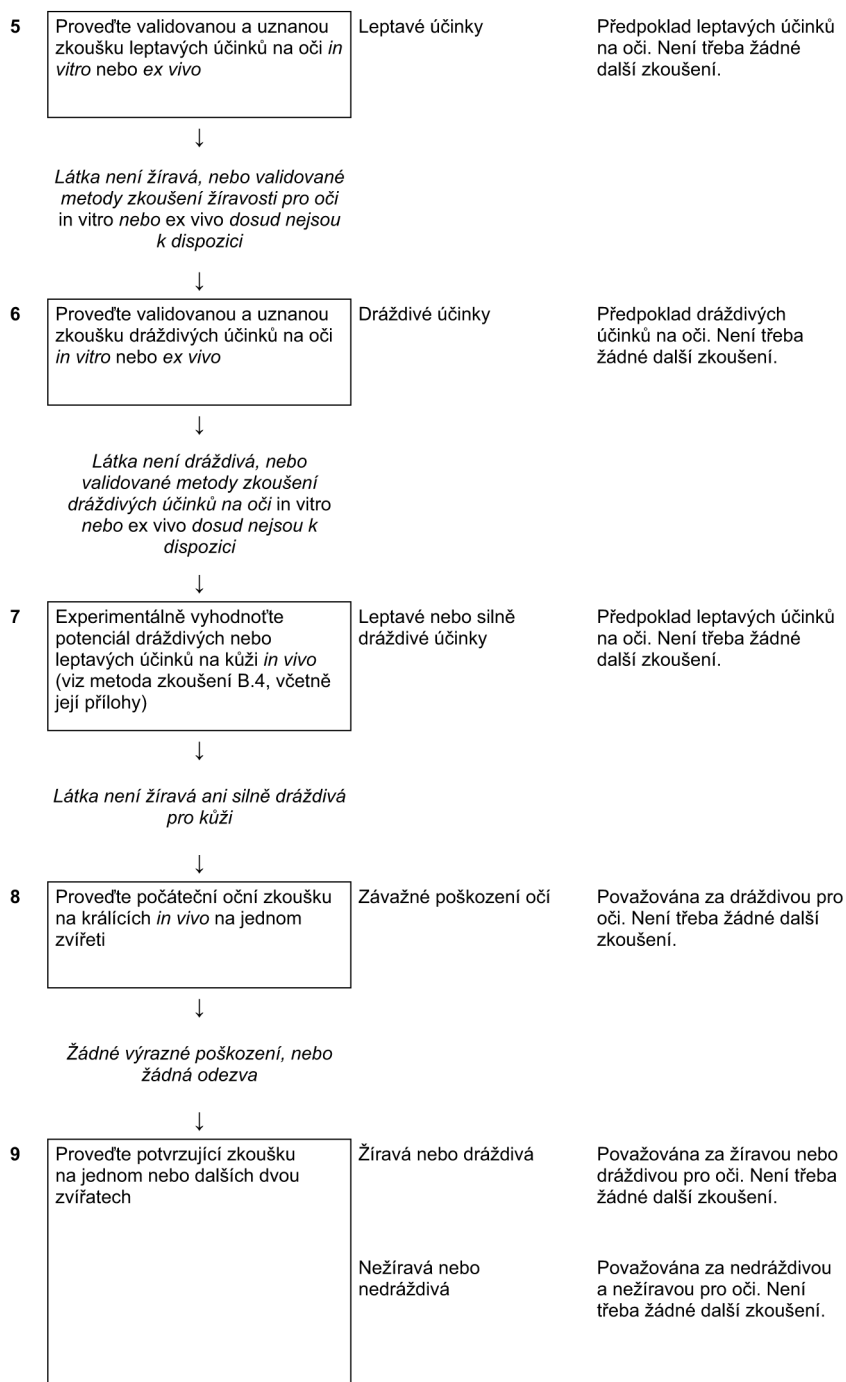
- 1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA* 27, 161–177.
- 4) Zkušební metoda B.4. Akutní toxicita: dráždivé/leptavé účinky na kůži.
- 5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19–26.
- 6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227–231.
- 7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, s. 483–524.
- 8) Zkušební metoda B.40 Leptavé účinky na kůži.
- 9) Dodatek zkušební metody B.4: Strategie postupného zkoušení dráždivých a leptavých účinků na kůži.



Obrázek

Strategie zkoušení a hodnocení dráždivých/leptavých účinků na oči



▼ **B**

▼B**B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Poznámky:

Citlivost zkoušek a jejich schopnost zjistit látky s možným senzibilizačním účinkem na lidskou kůži mají v systému klasifikace toxicity v oblasti veřejného zdraví velký význam.

Neexistuje jediná zkušební metoda, která by vhodným způsobem identifikovala všechny látky s potenciálním senzibilizačním účinkem na lidskou kůži a která by byla relevantní pro všechny látky.

Při výběru zkoušky musí být zváženy faktory, jako jsou fyzikální vlastnosti látky, včetně schopnosti pronikat kůží.

Byly vyvinuty dva typy zkoušek na morčatech: zkoušky s adjuvanty, ve kterých je alergický stav umocněn rozpuštěním nebo suspendováním zkoušené látky ve Freundově kompletním adjuvantu (FCA), a zkoušky bez adjuvantů.

Zkoušky s adjuvanti jsou pravděpodobně přesnější v předpovědi pravděpodobného senzibilizačního účinku na lidskou kůži než metody bez použití Freundova kompletního adjuvantu, a proto se jim dává přednost.

Maximalizační zkouška na morčatech (Guinea Pig Maximisation Test – GPMT) je velmi rozšířená zkouška s adjuvanti. Ačkoli lze použít několik dalších metod pro zjištění schopnosti látky vyvolat senzibilizační reakci kůže, je zkouška GPMT upřednostňovanou technikou s adjuvanti.

U mnoha skupin chemických látek jsou zkoušky bez adjuvantu (dává se přednost Bühlerově zkoušce) považovány za méně citlivé.

V určitých případech lze zdůvodnit Bühlerovu zkoušku s povrchovou aplikací spíše než intradermální injekci používanou v maximalizační zkoušce na morčatech. Pro použití Bühlerovy zkoušky by mělo být uvedeno vědecké zdůvodnění.

V této metodě jsou popsány maximalizační zkoušky na morčatech (GPMT) a Bühlerova zkouška. Jiné metody lze použít za předpokladu, že jsou spolehlivě validované a odborně odůvodněné.

Pokud je z uznávané screeningové zkoušky získán pozitivní výsledek, může být zkoušená látka označena za potenciální senzibilizátor a nemusí být nezbytné provést další zkoušku na morčatech. Jestliže však má taková zkouška negativní výsledek, musí být zkouška na morčatech provedena za použití postupu popsaného v této zkušební metodě.

Viz také obecný úvod, část B.

▼B

1.2 DEFINICE

Senzibilizace kůže: (alergická kontaktní dermatitida) je imunologicky zprostředkovaná kožní reakce na látku. U člověka mohou být reakce charakterizovány svěděním, zarudnutím kůže, otoky, pupenci, puchýřky, bulami nebo jejich kombinací. U jiných živočišných druhů se mohou reakce lišit a může být zjištěno pouze zarudnutí kůže nebo otok.

Indukční expozice: experimentální expozice subjektu zkoušené látky se záměrem navodit stav přecitlivělosti.

Indukční období: období nejméně jednoho týdne po indukční expozici, během něhož se může rozvinout stav přecitlivělosti.

Provokační expozice: experimentální expozice subjektu dříve vystaveného zkoušené látce po indukčním období s cílem stanovit, zda je reakce subjektu přecitlivělá.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Citlivost a spolehlivost použité zkušební metody by měla být posouzena každých šest měsíců za použití látek, o kterých je známo, že mají mírné až středně silné senzibilizační účinky na kůži.

U správně provedené zkoušky vyvolávají mírné/střední senzibilizátory zpravidla nejméně 30 % reakci při metodě s adjuvanty a nejméně 15 % reakci při metodě bez adjuvantů.

Přednostně jsou používány tyto látky:

Čísla CAS	Čísla EINECS	Názvy podle EINECS	Obecné názvy
101-86-0	202-983-3	α -hexylcinnamaldehyd	α -hexylcinnamaldehyd
149-30-4	205-736-8	2sulfanylbenzothiazol	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokain	nordkain

Za určitých okolností mohou být při dostatečném zdůvodnění použity jiné kontrolní látky splňující výše uvedená kritéria.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Pokusným zvířatům je nejdříve aplikována zkoušená látka intradermálními injekcemi a/nebo epidermální aplikací (indukční expozice). Po období klidu 10 až 14 dnů (indukční období), v průběhu kterého se může rozvinout imunitní reakce, je zvířatům aplikována provokační dávka. Rozsah a stupeň kožní reakce pokusných zvířat na provokační expozici je porovnáván s rozsahem a stupněm reakce u kontrolních zvířat, která podstoupí negativní expozici v průběhu indukce a je jim aplikována provokační dávka.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍCH METOD

Pokud je považováno za nezbytné odstranit zkoušenou látku, použije se voda nebo vhodné rozpouštědlo, aniž by se změnila stávající reakce nebo integrita pokožky.

▼B

- 1.5.1 *Maximalizační zkouška na morčatech (GPMT)*
- 1.5.1.1 *Příprava*
- Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat a zvířata se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Srst se odstraní stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité zkušební metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na konci zkoušky.
- 1.5.1.2 *Zkušební podmínky*
- 1.5.1.2.1 *Pokusná zvířata:*
- Použijí se běžně používané laboratorní kmeny albinotických morčat.
- 1.5.1.2.2 *Počet a pohlaví*
- Použít lze samce i samice. Použité samice musí být nullipary a nesmí být březí.
- Experimentální skupina se skládá nejméně z 10 zvířat a kontrolní skupina nejméně z 5 zvířat. Použije-li se méně než 20 experimentálních a 10 kontrolních morčat a není možné dojít k závěru, že je zkoušená látka senzibilizující, doporučuje se zkoušení na dalších zvířatech, aby byl celkový počet nejméně 20 experimentálních a 10 kontrolních zvířat.
- 1.5.1.2.3 *Úrovně dávek*
- Koncentrace zkoušené látky použitá pro každou indukční expozici by měla být taková, aby ji zvířata systémově dobře snášela, a měla by být nejvyšší koncentrací vyvolávající mírné až střední podráždění kůže. Koncentrace použitá při provokační expozici by měla odpovídat nejvyšší dávce, která nevyvolává podráždění. V případě potřeby mohou být vhodné koncentrace stanoveny předběžnou studií na dvou nebo třech zvířatech. Pro tento účel by mělo být zváženo použití zvířat, kterým bylo podáno Freundovo kompletní adjuvans (FCA).
- 1.5.1.3 *Postup*
- 1.5.1.3.1 *Indukce*
- Den 0 – experimentální skupina
- Tři dvojice intradermálních injekcí o objemu 0,1 ml se podají symetricky podle střední linie do lopatkové oblasti zbavené srsti.
- Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smíšené s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.
- Injekce 2: zkoušená látka ve vhodném vehikulu ve zvolené koncentraci.
- Injekce 3: zkoušená látka ve zvolené koncentraci připravené ve směsi s FCA a vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.
- Pro injekci 3 se látky rozpustné ve vodě rozpustí před smísením s FCA ve vodné fázi. Látky rozpustné v lipidech nebo nerozpustné látky se před smísením s vodnou fází suspendují v FCA. Konečná koncentrace zkoušené látky musí být stejná jako koncentrace použitá v injekci 2.

▼B

Injekce 1 a 2 se aplikují blízko sebe a co nejbližší hlavě, zatímco injekce 3 se podává směrem ke kaudální části zkušební plochy.

Den 0 – kontrolní skupina

Tři dvojice subkutánních injekcí o objemu 0,1 ml se podají na stejná místa jako u experimentálních zvířat.

Injekce 1: Freundovo kompletní adjuvans (FCA) smíšené s vodou nebo fyziologickým roztokem v poměru 1: 1 obj.

Injekce 2: neředěné vehikulum.

Injekce 3: 50 % (m/V) směs vehikula se směsí FCA a vody nebo fyziologickém roztoku v poměru 1: 1 obj.

5.–7. den – experimentální a kontrolní skupiny

Přibližně dvacet čtyři hodin před povrchovou indukční aplikací, jestliže látka není dráždivá pro kůži, se po důkladném ostříhání a/nebo oholení nanese na zkušební plochu 0,5 ml 10 % natriumdodecylsulfátu ve vazelině za účelem vyvolání místního podráždění.

6.–8. den – experimentální skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Filtrační papír (2 × 4 cm) se plně napustí zkoušenou látkou ve vhodném vehikulu, přiloží se na zkušební plochu a udržuje se ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po dobu 48 hodin. Výběr vehikula by měl být zdůvodněn. Pevné látky se jemně roztřou a vpraví do vhodného vehikula. Kapaliny lze aplikovat přímo, je-li to vhodné.

6.–8. den – kontrolní skupina

Zkušební plocha se opět zbaví srsti. Na zkušební plochu se podobným způsobem nanese samotné vehikulum a udržuje se ve styku s kůží pomocí okluzivního plátku po dobu 48 hodin.

1.5.1.3.2 Provokace

20.–22. den – experimentální a kontrolní skupiny

Boky pokusných i kontrolních zvířat se zbaví srsti. Na jeden bok zvířete se aplikuje zkoušená látka v plátku nebo v komůrce a na druhý bok se může popřípadě umístit plátek nebo komůrka obsahující pouze vehikulum. Plátky se fixují ve styku s kůží pomocí okluzivního obvazu po dobu 24 hodin.

Pozorování a hodnocení: experimentální a kontrolní skupiny

- Přibližně 21 hodin po odstranění plátku se provokační plocha očistí, důkladně ostříhá a/nebo oholí a v případě potřeby depiluje,
- přibližně po 3 hodinách (přibližně 48 hodin od začátku aplikace provokační dávky) se pozoruje kožní reakce a zaznamená se podle stupnice uvedené v dodatku,
- přibližně 24 hodin po tomto pozorování se provede druhé pozorování (72 hodin) a opět se zaznamená reakce kůže.

Doporučuje se provádět pozorování „naslepo“ u pokusných i kontrolních zvířat.

Pokud je to nezbytné pro objasnění výsledků získaných při první provokaci, měla by být přibližně jeden týden po první provokaci zvažena druhá provokace (tj. opakovaná provokace), v případě potřeby s novou kontrolní skupinou. Opakovaná provokace může být provedena také na původní kontrolní skupině.

▼ B

Pozorování a zaznamenávání všech kožních reakcí a neobvyklých náleží, včetně systémových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, by měla být prováděna podle stupnice Magnussona/Kligmana (viz dodatek). Pro objasnění nejasných reakcí mohou být provedeny jiné postupy, např. histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

1.5.2 *Bühlerova zkouška*

1.5.2.1 Příprava

Zdravá mladá dospělá albinotická morčata se aklimatizují na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat a zvířata se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Srst se odstraní stříháním, holením nebo chemickou depilací, v závislosti na použité zkušební metodě. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k poškození kůže. Zvířata se zváží před zahájením zkoušky a na konci zkoušky.

1.5.2.2 Zkušební podmínky

1.5.2.2.1 Pokusná zvířata

Používají se běžně používané laboratorní kmeny albinotických morčat.

1.5.2.2.2 Počet a pohlaví

Použít lze samce i samice. Použité samice musí být nullipary a nesmí být březí.

Experimentální skupina se skládá nejméně z 20 zvířat a kontrolní skupina nejméně z 10 zvířat.

1.5.2.2.3 Úrovně dávek

Koncentrace zkoušené látky použitá pro každou indukční expozici by měla být tou nejvyšší koncentrací, která vyvolá mírné, ne však silné podráždění kůže. Koncentrace použitá při provokační expozici by měla odpovídat nejvyšší koncentraci, která nevyvolává podráždění. V případě potřeby mohou být vhodné koncentrace stanoveny předběžným pokusem na dvou nebo třech zvířatech.

Pro zkoušené látky rozpustné ve vodě je vhodné používat jako vehikulum vodu nebo ne podráždivé zředěné roztoky povrchově aktivní látky. Pro ostatní zkoušené látky se upřednostňuje roztok 80 % alkoholu ve vodě pro indukci a aceton pro provokaci.

1.5.2.3 Postup

1.5.2.3.1 Indukce

Den 0 – experimentální skupina

Jeden bok se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Zkušební plátek by měl být důkladně napuštěn zkoušenou látkou ve vhodném vehikulu (výběr vehikula musí být zdůvodněn; tekuté zkoušené látky mohou být podle potřeby aplikovány neředěné).

Zkušební plátek se přiloží na zkušební plochu a po dobu 6 hodin se udržuje ve styku s kůží okluzivním plátkem nebo komůrkou a vhodným obvazem.

▼B

Systém s plátkem musí být okluzivní. Vhodný je bavlněný polštářek, může být kruhový nebo čtvercový, ale měl by mít velikost přibližně 4–6 cm². Pro zajištění okluze je vhodné použít vhodnou fixaci. Jsou-li použity obvazy, mohou být nezbytné dodatečné expozice.

Den 0 – kontrolní skupina

Jeden bok se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Na zkušební plochu se nanese vehikulum podobným způsobem jako u experimentální skupiny. Zkušební plátek se po dobu 6 hodin udržuje ve styku s kůží pomocí okluzivního plátku nebo komůrky a vhodného obvazu. Pokud je možné prokázat, že kontrolní skupina podrobená negativní expozici není nezbytná, lze použít neexponovanou kontrolní skupinu.

6.–8. a 13.–15. den – experimentální a kontrolní skupina

Provede se stejná aplikace jako v den 0 na stejnou zkušební plochu (v případě potřeby zbavenou srsti) na tentýž bok, a to 6.–8. den a opět 13.–15. den.

1.5.2.3.2 Provakace

27.–29. den – experimentální a kontrolní skupina

Neošetřený bok pokusných a kontrolních zvířat se zbaví srsti (důkladně se ostříhá). Okluzivní plátek nebo komůrka obsahující příslušné množství zkoušené látky v nejvyšší neдрáždivé koncentraci se aplikuje na zadní část neošetřeného boku pokusných a kontrolních zvířat.

Na přední část neošetřeného boku pokusných a kontrolních zvířat se popřípadě aplikuje okluzivní plátek nebo komůrka jen s vehikulem. Plátky nebo komůrky se po dobu 6 hodin fixují ve styku s kůží pomocí vhodného obvazu.

1.5.2.3.3 Pozorování a hodnocení

- Přibližně 21 hodin po odstranění plátku se provokační plocha zbaví srsti,
- přibližně po třech hodinách (přibližně 30 hodin po aplikaci provokačního plátku) se pozorují kožní reakce a zaznamenají se podle stupnice uvedené v dodatku,
- přibližně 24 hodin po 30hodinovém pozorování (přibližně 54 hodin po aplikaci provokačního plátku) se opět pozorují kožní reakce a zaznamenají se.

Doporučuje se provádět pozorování „naslepo“ u pokusných i kontrolních zvířat.

Pokud je to nezbytné pro objasnění výsledků získaných při první provokaci, měla by být přibližně jeden týden po první provokaci zvážena druhá provokace (tj. opakovaná provokace), v případě potřeby s novou kontrolní skupinou. Opakovaná provokace může být provedena také na původní kontrolní skupině.

▼ B

Pozorování a zaznamenávání všech kožních reakcí a neobvyklých nálezů, včetně systémových reakcí, které jsou důsledkem indukčních a provokačních postupů, by měla být prováděna podle stupnice Magnussona/Kligmana (viz dodatek). Pro objasnění nejasných reakcí mohou být provedeny jiné postupy, např. histopatologické vyšetření nebo měření tloušťky kožní řasy.

2. **ÚDAJE (GPMT A BÜHLEROVA ZKOUŠKA)**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každé zvíře uvedou kožní reakce při každém pozorování.

3. **ZPRÁVY (GPMT A BÜHLEROVA ZKOUŠKA)**

Pokud byla před zkouškou na morčatech provedena screeningová zkouška (např. zkouška ztluštění ucha u myši (MEST)), musí být s výsledky získanými se zkoušenými a referenčními látkami uveden popis této zkoušky nebo odkaz na tuto zkoušku, včetně podrobných informací o postupu.

Protokol o zkoušce (GPMT a Bühlerova zkouška)

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

Pokusná zvířata:

- použitý kmen morčat,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- technika přípravy oblastí kůže, na kterou se nanese náplast,
- podrobné údaje o materiálech použitých na náplasti a technice aplikování náplastí,
- výsledek předběžné studie a závěr týkající se indukčních a provokačních koncentrací, které byly při zkoušce použity,
- podrobné údaje o přípravě, aplikaci a odstranění zkoušené látky,
- zdůvodnění volby vehikula,
- koncentrace vehikula a zkoušené látky použité pro indukční a provokační expozice a celkové množství látky použité pro indukci a provokaci.

Výsledky:

- souhrn výsledků poslední kontroly citlivosti a spolehlivosti (viz 1.3), včetně informací o použité látce, koncentraci a vehikulu,

▼B

- posuzování jednotlivých zvířat, včetně systému klasifikace,
- podrobný popis charakteru a stupně pozorovaných účinků,
- všechny histopatologické nálezy.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 406.

▼B

Dodatek

TABULKA

**Stupnice Magnussona/Kligmana pro hodnocení kožních reakcí na
provokační expozici**

0 = žádná viditelná změna

1 = slabé nebo skvrnité zarudnutí kůže

2 = mírné a splývající zarudnutí kůže

3 = intenzivní zarudnutí a zduření kůže

▼B**B.7 ORÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky 28 dnů. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

Tato metoda klade větší důraz na neurologické účinky jako na specifické výsledné účinky; důraz je kladen na potřebu pečlivého klinického pozorování zvířat, aby bylo získáno co nejvíce informací. Metoda by měla odhalit chemické látky s neurotoxickým potenciálem, u nichž může být nezbytné další hlubší zkoumání tohoto aspektu. Metoda může upozornit na imunologické účinky a toxicitu pro reprodukční orgány.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.4.1 Příprava**

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují a umístí se do klecí nejméně pět dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

Zkoušená látka se podává sondou nebo v potravě či v pitné vodě. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálně-chemických vlastnostech látky.

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. kukuřičný olej) a nakonec roztoku jiného vehikula. Pro nevodná vehikula by měla být známa jejich toxická charakteristika. Měla by být určena stálost zkoušené látky ve vehikulu.

1.4.2 Zkušební podmínky**1.4.2.1 Pokusná zvířata**

Dává se přednost potkanům, ale lze použít i jiného druhu hlodavců. Použity by měly být běžně používané kmeny mladých zdravých dospělých zvířat. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení a v každém případě dříve, než zvířata dosáhnou stáří devíti týdnů.

▼B

Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit $\pm 20\%$ střední hmotnosti pro každé pohlaví.

Provádí-li se studie opakovaného orálního podávání látky jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, měla by být v obou studiích použita nejlépe zvířata stejného kmene a stejného původu.

1.4.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrčena před koncem studie.

Kromě toho může být satelitní skupině 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) podávána vysoká úroveň dávky po dobu 28 dnů a 14 dnů po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.4.2.3 *Úroveň dávek*

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální skupiny a jedna kontrolní skupina. s výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitelném objemu.

Pokud se po posouzení jiných údajů neočekávají žádné účinky při dávce 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti, může být provedena limitní zkouška. Nejsou-li dostupné žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozmezí dávek, které mají být použity.

Při výběru úrovní dávek by měly být zohledněny veškeré existující údaje o toxických a toxikokinetických vlastnostech, které jsou pro zkoušenou látku nebo příbuzné materiály dostupné. Nejvyšší úroveň dávky má vyvolat toxické účinky, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Dále by měla být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu, než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než 10).

U látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete.

Pokud je studie opakovaným podáváním prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé studii, měla by být v obou studiích použita stejná potrava.

▼ B1.4.2.4 *Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsanych v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg na kg tělesné hmotnosti na den nebo v případě podávání v potravě nebo v pitné vodě v odpovídající koncentraci (na základě stanovení tělesné hmotnosti) nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří úrovní dávek nutná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.4.2.5 *Doba pozorování*

Doba pozorování by měla být 28 dnů. Zvířata v satelitní skupině určené pro následná pozorování by měla být po dalších nejméně 14 dnů bez aplikace, aby se zachytil zpožděný výskyt, přetrvávání nebo zotavení z toxických účinků.

1.4.3 **Postup**

Zkoušená látka se podává zvířatům sedm dnů v týdnu po dobu 28 dnů. Pokud se látka podává pět dnů v týdnu, musí to být zdůvodněno. Pokud se zkoušená látka podává sondou, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem tekutiny, který lze podat najednou, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých nebo žiravých látek, u kterých se ve vyšších koncentracích stupňují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

1.4.3.1 *Obecná pozorování*

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, nejlépe ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvážením doby očekávaného maxima účinku po podání látky. Zaznamenává se zdravotní stav zvířat. Nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Před prvním podáním látky a dále nejméně jednou týdně se provede důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem individuálního porovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a nejlépe pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by měla být pečlivě zaznamenávána, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Mělo by se usilovat o to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší a aby vyšetření prováděly nejlépe osoby, které nejsou o zařazení do skupiny informovány. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (slzení, zjevení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. vytrvalých čistících pohybů nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškozování, pohybu pozpátku).

▼ B

Ve čtvrtém týdnu podávání látky se otestují reakce na různé smyslové podněty (např. sluchové, zrakové, proprioceptivní) a změní se síla úchopu a motorické aktivity. Další podrobné informace o postupech, které je možno použít, jsou uvedeny v literatuře (viz obecný úvod, část B).

Pozorování funkčních poruch ve čtvrtém týdnu podávání látky lze případně vynechat, pokud je studie prováděna jako předběžná pro následnou subchronickou (90denní) studii. V takovém případě je pozorování funkčních poruch zahrnuto do dlouhodobé studie. Dostupnost údajů o pozorovaných funkčních poruchách ze studie opakovaného podávání dávky může na druhé straně usnadnit výběr úrovní dávek pro následnou subchronickou studii.

Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by zkoušky významně narušily jejich funkční stav.

1.4.3.2 *Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody*

Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Měření spotřeby potravy a vody by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně měřit spotřeba vody.

1.4.3.3 *Hematologická vyšetření*

Na konci zkoušky by měla být provedena tato hematologická vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a stanoví se protrombinový čas.

Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa těsně před usmrcením zvířat nebo v jeho průběhu a měly by se skladovat za vhodných podmínek.

1.4.3.4 *Klinická biochemická vyšetření*

Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáně a zejména na játra a ledviny se provedou na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům před utracením nebo v jeho průběhu (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky). Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata přes noc bez potravy⁽¹⁾. Vyšetření plazmy a séra zahrnuje stanovení sodíku, draslíku, glukosy, celkového cholesterolu, močoviny, kreatininu, celkových bílkovin a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako alaninaminotransferasa, aspartátaminotransferasa, alkalická fosfatasa, gama glutamyltranspeptidasa a sorbitoldehydrogenasa). Stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a žlučových kyselin může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

Dále je možné v průběhu posledního týdne studie provést následující analýzy moči za použití časově definovaného sběru: vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, bílkoviny, glukosa a krev-/krvinky.

⁽¹⁾ Vyšetření na lačno je žádoucí pro řadu měření v séru a plazmě, zvláště pro měření glukosy. Hlavním důvodem pro toto doporučení je to, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat méně výrazné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně by hladovění přes noc mohlo mít vliv na celkový metabolismus a při podávání v potravě by zasáhlo do pravidelnosti expozice zkoušené látky. Pokud se odebírá krev na lačno, je třeba provést biochemické vyšetření až po pozorování funkčních poruch ve 4. týdnu zkoušky.

▼ B

Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání v séru. Další vyšetření by mělo být provedeno, pokud mohou známé vlastnosti zkoušené látky ovlivnit odpovídající metabolické profily, včetně vápníku, fosforu, triglyceridů na lačno, specifických hormonů, methemoglobinu a cholinesterasy. Tyto profily je třeba identifikovat pro látky určitých skupin nebo případ od případu.

Obecně je třeba postupovat pružně v závislosti na druhu a na pozorovaných a/nebo předpokládaných účincích dané látky.

Pokud nejsou údaje o dosavadních výchozích hodnotách dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem zkoušky.

1.4.3.5 *Pitva*

U všech pokusných zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé zkoumání vnějšího povrchu těla, všech otvorů a dutiny lebeční, hrudní a břišní a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat by měly být zbaveny všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

Následující tkáně by měly být přechovány v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s lézemi, mozek (reprezentativní oblasti, včetně hemisfér, mozečku a mostu), mícha, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, brzlík, štítná žláza, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a ponořením), gonády a přídatné pohlavní orgány (např. děloha, prostata), močový měchýř, lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*), nejlépe v blízkosti svalu, řez kostní dřeně (nebo čerstvý nátěr z nasáté kostní dřeně). Podle klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Všechny orgány považované za možné cílové orgány pro působení zkoušené látky by měly být uchovány.

1.4.3.6 *Histopatologická vyšetření*

U všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny, které byla podána vysoká dávka, by mělo být provedeno celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

Všechny makroskopické léze by měly být zkoumány.

V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. **ÚDAJE**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a dobu úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze.

▼ B

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

3. ZPRÁVY*PROTOKOL O ZKOUŠCE*

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky, dále v týdenních intervalech a na konci zkoušky.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění volby vehikula, není-li použita voda,
- zdůvodnění výběru úrovní dávek,
- podrobné údaje o složení látky nebo úpravě potravy, o dosažené koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,
- podrobnosti o způsobu podání zkoušené látky,
- popřípadě přepočtení koncentrace zkoušené látky v potravě/pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku (mg na kg tělesné hmotnosti),
- podrobné údaje o stravě a kvalitě vody.

Výsledky:

- tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,
- spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,
- charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),
- posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity,
- hematologické vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),
- klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami,
- tělesná hmotnost při usmrcení a údaje o hmotnosti orgánů,
- pitevni nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- údaje o absorpci, pokud jsou dostupné,
- popřípadě statistické zpracování výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

Metoda je analogická metodě OECD TG 407.

▼ B**B.8 INHALAČNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Je vhodné mít předběžné informace o distribuci velikosti částic, tenzi par, bodu tání, bodu varu, teplotě vzplanutí a popřípadě výbušnosti látky.

Viz také obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Několik skupin pokusných zvířat se denně po 28 dní vystaví po definovanou dobu zkoušené látce v odstupňovaných koncentracích, a to každá skupina jedné koncentraci. Je-li použito pro usnadnění přípravy vhodné koncentrace zkoušené látky v ovzduší vehikulum, použije se kontrolní skupina exponovaná vehikulu. Během expozice se zvířata denně pozorují a zjišťují se toxické účinky. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1 Příprava**

Nejméně pět dnů před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých zvířat, která se přiřadí do požadovaného počtu skupin. Je-li to nezbytné, přidá se ke zkoušené látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla požadovaná koncentrace zkoušené látky. Pokud se užijí pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiné přísady, musí být o nich známo, že nemají toxické účinky. V případě potřeby je možno použít stávající údaje.

1.6.2 Zkušební podmínky**1.6.2.1 Pokusná zvířata**

Přednostně se používá potkan, pokud nejsou proti tomu důvody. Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů.

Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty.

▼B1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se plánuje usmrcování zvířat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před koncem studie. Kromě toho může být satelitní skupině 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) podávána vysoká úroveň dávky po dobu 28 dní a 14 dní po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.6.2.3 *Expoziční koncentrace*

Použijí se nejméně tři koncentrace a kontrolní skupina nebo, v případě použití vehikula, kontrolní skupina s vehikulem (v koncentraci odpovídající koncentraci vehikula při nejvyšší úrovni zkoušené látky). Se zvířaty v kontrolní skupině se zachází stejně jako se zvířaty v exponované skupině s výjimkou aplikace zkoušené látky. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity. Je-li k dispozici použitelný odhad expozice člověka, měla by jej nejnižší úroveň překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň dávky vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna střední úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

1.6.2.4 *Doba expozice*

Denní expozice má trvat 6 hodin, ale může se použít jiná doba, mají-li být splněny specifické požadavky.

1.6.2.5 *Zařízení*

Pro pokusy se zvířaty by měla být použita inhalační zařízení, která umožňují dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční komora, měla by její konstrukce minimalizovat stísněnost pokusných zvířat a maximalizovat inhalační expozici zkoušené látky. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory. Lze použít jednotlivé expoziční komory pro orálně-nasální expozici nebo pro expozici hlavy nebo pro expozici celého těla; první dva způsoby expozice minimalizují příjem látky jinými cestami.

1.6.2.6 *Doba pozorování*

Zvířata se pozorují denně během expozice a zotavení s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamená se doba uhynutí a doba, kdy se příznaky toxicity objeví a vymizí.

▼B1.6.3 **Postup**

Zvířata se vystaví zkoušené látce denně, pět až sedm dnů v týdnu, po dobu 28 dnů. Zvířata v satelitních skupinách určených pro následná pozorování by neměla být dalších 14 dnů exponována, aby se posoudilo zotavení z toxických účinků, nebo jejich přetrvávání. Teplota, při které má být zkouška provedena, by měla být udržována na 22 ± 3 °C.

Relativní vlhkost má být v ideálním případě udržována nejlépe mezi 30 % a 70 %, ale v určitých případech to nemusí být realizovatelné (např. zkoušky některých aerosolů). Udržování mírného podtlaku v komoře (≤ 5 mm vodního sloupce) zabrání unikání zkoušené látky do okolí. Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Použijí se dynamické inhalační systémy s vhodným kontrolním analytickým systémem pro regulaci koncentrace. Aby bylo dosaženo vyhovujících koncentrací, doporučuje se provést předběžný experiment. Průtok by měl být nastaven tak, aby zajistil homogenní podmínky v celé expoziční komoře. Systém by měl zajistit, že bude stálých podmínek expozice dosaženo co nejrychleji.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- a) průtok vzduchu (kontinuálně);
- b) skutečná koncentrace zkoušené látky v dýchací zóně. Během denní expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %. U některých aerosolů však nelze této úroveň regulace dosáhnout a připouští se větší rozsah kolísání. Během celé studie mají být každodenní koncentrace co nejstálější. V případě aerosolů se provádí nejméně jedna analýza velikosti částic u každé experimentální skupiny jednou týdně;
- c) teplota a vlhkost, pokud možno kontinuálně.

Během expozice a po jejím ukončení se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování; záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, stupně a trvání. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Každý týden se zvířata váží. Doporučuje se také, aby byla každý týden zjištěna spotřeba potravy. Pravidelné pozorování zvířat je nezbytné k tomu, aby se zajistilo, že u zvířat nedochází ke ztrátám, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení studie se všechna přeživší zvířata z jiných než satelitních skupin pitvají. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Na konci zkušebního období se u všech zvířat, včetně kontrolních, provedou tato vyšetření:

- i) hematologické vyšetření: stanovit alespoň hematokrit, koncentraci hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů a srážlivost krve,

▼ B

ii) klinické biochemické vyšetření krve: stanovení alespoň jednoho parametru funkce jater a ledvin: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamátpyruváttransaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamátalacetáttransaminasa), močovinový dusík, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukosy na lačno, analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

Další klinické biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků.

1.6.3.1 *Pitva*

U všech zvířat použitých ve studii se provede celková pitva. Alespoň játra, ledviny, nadledviny, plíce a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně (dýchací systém, játra, ledviny, slezina, varlata, nadledviny a srdce, i všechny orgány s lézemi nebo změnami velikosti) je třeba uchovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření. Plíce je třeba vyjmout bez poškození, zvážít a fixovat vhodným médiem tak, aby se zachovala struktura.

1.6.3.2 *Histopatologická vyšetření*

U skupiny, které byla podána nejvyšší koncentrace, a u kontrolní skupiny se provede histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Orgány a tkáně, u nichž se ve skupině s nejvyšší koncentrací objeví poškození způsobená zkoušenou látkou, se podrobí histologickému vyšetření i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat ze všech satelitních skupin se provede histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, na kterých byly pozorovány účinky u ostatních exponovaných skupin.

2. **ÚDAJE**

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou exponovanou skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky a počet zvířat, která vykazují jednotlivé typy léze.

Všechny výsledky se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Lze použít jakoukoli uznanou statistickou metodu.

3. **ZPRÁVY**3.1 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.,

— zkušební podmínky:

▼ B

Popis expozičního zařízení, včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému, popisu čistění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikosti částic aerosolu.

Údaje o expozici

Měly by být zpracovány do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky) a měly by zahrnovat pokud možno tyto informace:

- a) průtok vzduchu inhalačním zařízením;
 - b) teplota a vlhkost vzduchu;
 - c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu);
 - d) povaha vehikula, pokud bylo použito;
 - e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;
 - f) hmotnostní medián aerodynamického průměru (MMAD) a geometrická směrodatná odchylka (GSD);
- údaje týkající se odezvy podle pohlaví a koncentrace,
 - den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,
 - popis toxických nebo jiných účinků, úroveň, při které nedochází k účinkům,
 - doba pozorování každého neobvyklého příznaku a jeho další vývoj,
 - údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
 - provedená hematologická vyšetření a výsledky,
 - provedená klinická biochemická vyšetření a výsledky,
 - pitevnické nálezy,
 - podrobný popis všech histopatologických nálezů,
 - statistické zpracování výsledků, kde je to možné,
 - diskuse a výsledky,
 - diskuse a výsledky,

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B (E).

▼ B**B.9 DERMÁLNÍ TOXICITA (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B (A).

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B (B).

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně po dobu 28 dní nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, a to každé skupině jedna úroveň dávky. Během doby aplikace se zvířata denně pozorují s cílem zjistit příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS METODY**1.6.1 Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během zkoušky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Krátce před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Ostříhání nebo oholení je potřeba obvykle opakovat přibližně v týdenních intervalech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže, která má být zbavena srsti, a o velikosti krycího obvazu je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou nebo podle potřeby vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Kapalné zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

1.6.2 Zkušební podmínky**1.6.2.1 Pokusná zvířata**

Mohou být použiti dospělí potkani, králíci nebo morčata. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno.

▼B

Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat u obou pohlaví (pro každé pohlaví zvlášť) překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty.

1.6.2.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 10 zvířat (pět samic a pět samců). Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se plánuje usmrcování zvířat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před koncem studie. Mimoto je možné exponovat po dobu 28 dnů satelitní skupinu 10 zvířat (pět zvířat každého pohlaví) vysokou dávkou a během následujících 14 dnů po podávání sledovat vratnost, trvání nebo zpožděný výskyt toxických účinků. Používá se také satelitní skupina 10 kontrolních zvířat (pět zvířat každého pohlaví).

1.6.2.3 *Úrovně dávek*

Použijí se nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina nebo, je-li použito vehikulum, kontrolní skupina s vehikulem. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně. Zkoušená látka by měla být aplikována každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být pravidelné (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v exponované skupině. Použije-li se pro usnadnění aplikace vehikulum, aplikuje se na kontrolní skupinu stejným způsobem a ve stejném množství, jako ve skupině, které se aplikuje nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší dávka by neměla vyvolat žádné známky toxicity. Je-li k dispozici použitelný odhad expozice člověka, měla by jej nejnižší úroveň překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň dávky vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna střední úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolní skupině by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Vede-li aplikace zkoušené látky k závažnému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké úrovně dávky může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došlo-li navíc k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

1.6.2.4 *Limitní zkouška*

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 mg/kg nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, je-li známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

1.6.2.5 *Doba pozorování*

Zvířata se pozorují denně s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamená se doba uhynutí a doba, kdy se známky toxicity objeví a vymizí.

▼B1.6.3 **Postup**

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zvířatům se aplikuje zkoušená látka denně nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 28 dnů. Zvířata ve všech satelitních skupinách určených pro následná pozorování by neměla být dalších 14 dnů exponována, aby se posoudilo zotavení z toxických účinků, nebo jejich přetrvávání. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně.

Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; co největší část této plochy by se však měla pokrýt co nejslabší a nejstejnější vrstvou.

Během expozice se zkoušená látka udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředků pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění však nelze doporučit. Jako alternativní metody je možno použít „ochranného límce“.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky, pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, stupně a trvání. Pozorování zahrnují změny na kůži, na srsti, na očích, na sliznicích, a rovněž změny dýchání, krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Každý týden se zvířata váží. Doporučuje se také, aby byla každý týden zjištěna spotřeba potravy. Pravidelné pozorování zvířat je nezbytné k tomu, aby se zajistilo, že u zvířat nedochází ke ztrátám, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení studie se všechna přeživší zvířata z jiných než satelitních skupin pitvají. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Na konci zkušebního období se u všech zvířat, včetně kontrolních, provedou tato vyšetření:

- 1) hematologické vyšetření: stanovit alespoň hematokrit, koncentraci hemoglobinu, počet erytrocytů, celkový a diferenciální počet leukocytů a srážlivost krve;
- 2) klinické biochemické vyšetření krve: stanovení alespoň jednoho parametru funkce jater a ledvin: alaninaminotransferasa v séru (dříve známá jako glutamátpyruváttransaminasa), aspartátaminotransferasa séra (dříve známá jako glutamátalacetáttransaminasa), močovinový dusík, albumin, kreatinin, celkový bilirubin a celkové bílkoviny v séru.

Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukosy na lačno, analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu, aktivity cholinesterasy.

▼ B

Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků.

1.6.4 Pitva

U všech zvířat použitých ve studii se provede celková pitva. Alespoň játra, ledviny, nadledviny, plíce a varlata se co nejdříve po sekci zváží ve vlhkém stavu, aby se předešlo vysychání. Orgány a tkáně, tj. normální a exponovaná kůže, játra, ledviny, slezina, varlata, nadledviny, srdce a cílové orgány (orgány s lézemi nebo změnami velikosti), je třeba uchovávat ve vhodném médiu s ohledem na pozdější histopatologická vyšetření.

1.6.5 Histopatologické vyšetření

U skupiny, které byla aplikována vysoká dávka, a u kontrolní skupiny se provede histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Orgány a tkáně, u nichž se ve skupině s nejvyšší koncentrací objeví poškození způsobená zkoušenou látkou, se podrobí histologickému vyšetření i u všech skupin s nižšími dávkami. U zvířat ze satelitní skupiny se provede histologické vyšetření se zvláštním důrazem na orgány a tkáně, na kterých byly pozorovány účinky u ostatních exponovaných skupin.

2. ÚDAJE

Data se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou exponovanou skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky a počet zvířat, která vykazují jednotlivé typy léze.

Všechny výsledky se zhodnotí vhodnou statistickou metodou. Lze použít jakoukoli uznanou statistickou metodu.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- údaje o zvířatech (druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava atd.),
- zkušební podmínky (včetně typu obvazu: okluzivní nebo neokluzivní),
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud se použije) a koncentrace,
- dávka, při které nedochází k účinkům, pokud je to možné,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úroveň dávky,
- doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do konce zkoušky,
- toxické a jiné účinky,
- doba pozorování každého neobvyklého příznaku a jeho další vývoj,
- údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
- provedená hematologická vyšetření a výsledky,

▼B

- provedená klinická biochemická vyšetření a výsledky,
- pitevnické nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické zpracování výsledků, kde je to možné,
- diskuse a výsledky,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B (D).

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B (E).

▼B**B.10 Mutagenita – zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro*****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 473 – Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* (1997).

1.1 ÚVOD

Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* má identifikovat činitele, které způsobují strukturní chromozomové aberace v kultivovaných buňkách savců (1, 2, 3). Rozlišují se dva typy strukturních aberací: chromozomové a chromatidové. U většiny chemických mutagenů jsou indukované aberace chromatidového typu, avšak chromozomové aberace se rovněž vyskytují. Nárůst polyploidie může znamenat, že chemická látka má schopnost indukovat numerické aberace. Tato metoda však není určena ke stanovení numerických aberací a není k tomuto účelu rutinně používána. Chromozomové mutace a podobné jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že chromozomové mutace a s nimi související jevy způsobující změny v onkogenech a v genech somatických buněk tlumících nádory, mají podíl na indukci rakoviny u člověka a u pokusných zvířat.

Ke zkoušce na chromozomové aberace *in vitro* mohou být použity stabilizované buněčné linie, buněčné kmeny nebo primární buněčné kultury. Použité buňky jsou vybrány na základě schopnosti růstu v kultuře, stálosti karyotypu, počtu chromozomů, rozmanitosti chromozomů a spontánní četnosti chromozomových aberací.

Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Tento metabolický aktivační systém nemůže zcela napodobit podmínky *in vivo* u savců. Je třeba se zcela vyvarovat podmínek, které by vedly k pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vlastní mutagenitu a může k nim dojít změnou pH, osmolality nebo vysokých úrovní cytotoxicity (4, 5).

Tato zkouška se používá ke zjištění možných mutagenů a karcinogenů pro savce. Mnoho sloučenin, které jsou v této zkoušce pozitivní, jsou pro savce karcinogenní, avšak mezi touto zkouškou a karcinogenitou však není absolutní korelace. Korelace závisí na chemické třídě a přibývají důkazy o tom, že existují karcinogeny, které nejsou zjištěny touto zkouškou, neboť zřejmě působí jinými mechanismy než přímým poškozením DNA.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jednotlivých chromatid nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

▼ B

Endoreduplikace: proces, při kterém v jádře po S-fázi replikace DNA nedojde k mitóze, nýbrž následuje další S-fáze. Výsledkem jsou chromozomy se 4, 8, 16 ... chromatidami.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimální odchylkou chromatid.

Mitotický index: podíl buněk, které se nacházejí v metafázi, z celkového počtu buněk v populaci; udává stupeň proliferace této populace.

Numerická aberace: odchylka počtu chromozomů od normálního počtu obvyklého u použitého typu buněk.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozomových sad (n) jiný než diploidní (tj. $3n$, $4n$ atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromozomální nebo interchromozomální změny.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Buněčné kultury jsou vystaveny zkoušené látce, a to s metabolickou aktivací a bez ní. V předem stanovených intervalech po zkoušené látce se do buněčných kultur přidává látka zastavující metafázi (např. Colcemid nebo kolchicin), kultury se sklídí, obarví a přítomnost chromozomových aberací se zjistí mikroskopickým pozorováním buněk.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 Buňky

Mohou být použity různé buněčné linie, kmeny nebo primární buněčné kultury, včetně lidských buněčných linií (např. fibroblasty křečka čínského, lymfocyty periferní krve člověka nebo jiných savců).

1.4.1.2 Média a kultivační podmínky

Pro udržování kultur by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO_2 teplota a vlhkost). U stabilizovaných buněčných linií a kmenů by měla být rutinně kontrolována stabilita modální hodnoty počtu chromozomů a mělo by být kontrolováno, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty; v případě kontaminace by neměly být použity. Pro použité buňky a inkubační podmínky by měla být známa normální délka buněčného cyklu.

1.4.1.3 Příprava kultur

Stabilizované buněčné linie a kmeny: buňky se pomnoží z kmenových kultur, nasadí se do kultivačního média v takové hustotě, aby nedosáhly konfluence před sklizením, a inkubují se při $37\text{ }^\circ\text{C}$.

▼ B

Lymfocyty: krev ošetřená antikoagulantem (např. heparinem) nebo oddělené lymfocyty zdravých probandů se přidají do kultivačního média obsahujícího mitogen (např. fytohemaglutinin) a inkubují se při 37 °C.

1.4.1.4 *Metabolická aktivace*

Buňky by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodnou metabolickou aktivací a bez ní. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (6, 7, 8 a 9), nebo směs fenobarbitonu a β-naftoflavonu (10, 11 a 12).

Postmitochondriální frakce je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích 1–10 % obj. Stav metabolického aktivčního systému může záviset na třídě chemické látky, která je zkoušena. V některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci postmitochondriální frakce.

Řada výsledků vývoje, včetně přípravy geneticky modifikovaných buněčných linií exprimujících specifické aktivční enzymy, poskytuje možnosti pro endogenní aktivaci. Volba použitých buněčných linií by měla být vědecky zdůvodněna (např. důležitostí isoenzymu cytochromu P450 pro metabolismus zkoušené látky).

1.4.1.5 *Zkoušená látka/příprava*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacím systémům a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by mělo být mimo podezření, že reaguje se zkoušenou látkou, a mělo by být slučitelné s přežitím buněk a s aktivitou S9. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Při zkoušení látek nestálých ve vodě by měla být použita organická rozpouštědla neobsahující vodu. Vodu lze odstranit přidáním molekulového síta.

1.4.2.2 *Expoziční koncentrace*

Mezi kritéria, která mají být zohledněna při stanovení nejvyšší koncentrace, patří cytotoxicita, rozpustnost v testovacím systému a změny pH nebo osmolality.

Cytotoxicita by měla být stanovena s metabolickou aktivací a bez ní v hlavním experimentu za použití vhodných indikátorů buněčné integrity a růstu, jako jsou stupeň konfluency, počet životaschopných buněk nebo mitotický index. Může být výhodné stanovit cytotoxicitu a rozpustnost v předběžném experimentu.

▼ B

Měly by být použity alespoň tři analyzovatelné koncentrace. V případě cytotoxicity by měly tyto koncentrace pokrývat rozmezí dané maximální až minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou, což obvykle znamená, že by se koncentrace neměly lišit více nežli faktorem 2 až 10. V okamžiku sklizně by měla nejvyšší koncentrace vykazovat významné snížení stupně konfluence, počtu buněk nebo mitotického indexu (vše o více než 50 %). Mitotický index je pouze nepřímým měřítkem cytotoxických nebo cytostatických účinků a závisí na době, která uplynula od expozice. Mitotický index je však přijatelný u suspenzních kultur, u nichž mohou být jiné metody stanovení toxicity obtížné a nepraktické. Informace o kinetice buněčného cyklu, například průměrná generační doba (AGT), mohou být použity jako dodatkové informace. V případě AGT však jde o celkovou průměrnou hodnotu, z níž nelze usoudit na existenci zpožděných subpopulací, a i malý přírůstek průměrné generační doby může mít za následek velmi podstatné oddálení okamžiku optimálního výtěžku aberací.

V případě relativně necytotoxických látek by měla být maximální zkušební koncentrace 5 µl/ml, 5 mg/ml nebo 0,01 M, podle toho, která z nich je nejnižší.

V případě relativně nerozpustných látek, které nejsou toxické při koncentracích nižších, než je jejich rozpustnost, by měla být použita nejvyšší dávka v koncentraci, jež je nad mezí rozpustnosti v konečném kultivačním médiu na konci doby aplikace. V určitých případech (např. projeví-li se toxicita pouze při vyšších koncentracích, než je rozpustnost) se doporučuje vyzkoušet více koncentrací, při nichž dochází ke srážení. Může být užitečné stanovit rozpustnost na začátku a na konci expozice, neboť koncentrace v testovacím systému se může v průběhu expozice měnit v důsledku přítomnosti buněk, séra S9 atd. Nerozpustnost lze zjistit vizuálně. Srážení by neměla vadit při vyšetřování.

1.4.2.3 *Negativní a pozitivní kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní kontroly (kontroly rozpouštědla nebo vehikula). Při použití metabolické aktivace by měla být pro pozitivní kontrolu použita chemická látka, která k mutagenní reakci vyžaduje aktivaci.

K pozitivní kontrole by měl být použit známý elastogen v expozičních koncentracích, které nejspíše poskytnou reprodukovatelný a detekovatelný nárůst nad pozadí, čímž se prokáže citlivost testovacího systému.

Koncentrace pozitivních kontrol by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Příklady pozitivních a negativních kontrol:

Stav metabolické aktivace	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
Bez vnější metabolické aktivace	methyl-methansulfonát	66-27-3	200-625-0
	ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7

▼ B

Stav metabolické aktivace	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
	1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
	mitomycin C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1
S vnější metabolickou aktivací	benzo[<i>a</i>]pyren	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
	cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	

Pro pozitivní kontrolu mohou být použity i jiné vhodné látky. Pro pozitivní kontrolu by mělo být pokud možno vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy.

V okamžiku sklizení by měly být použity negativní kontroly skládající se ze samotného rozpouštědla nebo vehikula v kultivačním médiu a zpracované stejným způsobem jako kultury. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud žádné kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

1.4.3 **Postup**

1.4.3.1 *Expozice zkoušené látky*

Proliferující buňky se vystaví zkoušené látce jak za přítomnosti metabolického aktivčního systému, tak bez něho. Expozice lymfocytů by měla být zahájena asi 48 hodin po mitogenní stimulaci.

1.4.3.2 Pro každou koncentraci by měly být obvykle použity duplicitní kultury, a totéž se důrazně doporučuje u kultur pro negativní kontrolu nebo kontrolu rozpouštědla. Jestliže lze na základě dosavadních údajů prokázat (13, 14), že mezi duplicitními kulturami je minimální rozdíl, může být přípustné použití jediné kultury.

Plynné nebo těkavé látky by měly být zkoušeny vhodnými metodami, např. v těsně uzavřených kultivačních nádobách (15, 16).

1.4.3.3 *Doba sklizně kultur*

V prvním experimentu by měly být buňky vystaveny zkoušené látce, jak s metabolickou aktivací, tak bez ní, na dobu 3–6 hodin, a měly by být odebrány po takové době od zahájení aplikace, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu (12). Jestliže tento postup dává negativní výsledky jak s aktivací, tak bez aktivace, měl by být proveden dodatečný experiment bez aktivace s nepřetržitou expozicí až do odběru v době, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu. Určité chemické látky lze snáze detekovat při dobách aplikace nebo odběru delších než 1,5 násobek délky cyklu. Negativní výsledky při metabolické aktivaci musí být potvrzeny případ od případu. V případech, kdy se nepovažuje potvrzení negativních výsledků za nezbytné, by mělo být podáno zdůvodnění.

▼ B1.4.3.4 *Příprava preparátů pro analýzu chromozomů*

Do buněčné kultury se obvykle 1–3 hodiny před sklizením přidá Colcemid nebo kolchicin. Pro přípravu preparátů pro analýzu chromozomů se každá buněčná kultura sklízí a zpracovává zvlášť. Příprava preparátů pro analýzu chromozomů zahrnuje hypotonizaci buněk, fixaci a obarvení buněk.

1.4.3.5 *Analýza*

Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. Poněvadž při fixaci často dochází ke zlomu části buněk v metafázi a ke ztrátě chromozomů, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu rovném modální hodnotě ± 2 pro všechny typy buněk. Na každou koncentraci a kontrolu by mělo být hodnoceno alespoň 200 dobře rozprostřených metafází, případně rovnoměrně rozdělených mezi duplicitní kultury. Tento počet lze snížit, je-li pozorován velký počet aberací.

Ačkoli je účelem zkoušky detekovat strukturní chromozomové aberace, je důležité zaznamenat polyploidii a endoreduplikace, jsou-li pozorovány.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Experimentální jednotkou je buňka a mělo by tedy být vyhodnoceno množství buněk se strukturní chromozomovou aberací (aberacemi) vyjádřené v procentech. Pro kontrolní a experimentální kultury by měly být uvedeny různé typy strukturních chromozomových aberací s jejich počtem a četností. Gapy se zaznamenávají odděleně a uvádějí se, ale nezahrnují se do celkové četnosti aberací.

Měla by být také zaznamenána opatření, která byla provedena pro stanovení cytotoxicity u všech exponovaných kultur a negativních kultur v hlavních experimentech s aberacemi.

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé kultury. Dále by měly být všechny údaje shrnuty ve formě tabulky.

Ověření jasně pozitivní odpovědi se nepožaduje. Dvoznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek. Nezbytnost potvrdit negativní výsledky byla diskutována v bodu 1.4.3.3. Změna parametrů studie s cílem rozšířit rozsah posuzovaných podmínek by měla být zvážena v následných experimentech. K parametrům studie, které by mohly být změněny, patří rozmezí koncentrací a podmínky metabolické aktivace.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst počtu buněk s chromozomovými aberacemi v závislosti na koncentraci, nebo reprodukovatelný nárůst tohoto počtu. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (3, 13). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

▼ B

Nárůst počtu polyploidie buněk může znamenat, že zkoušená látka má schopnost potlačit mitotické procesy a indukovat numerické chromozomové aberace. Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozomy může znamenat, že zkoušená látka má schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (17, 18).

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky ze zkoušky na chromozomové aberace *in vitro* znamenají, že zkoušená látka indukuje v kultivovaných somatických buňkách savců strukturní chromozomové aberace. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v kultivovaných somatických buňkách savců strukturní chromozomové aberace.

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Buňky:

- typ a zdroj buněk,
- vlastnosti karyotypu a vhodnost použitého typu buněk,
- popřípadě nepřítomnost mykoplasmat,
- informace o délce buněčného cyklu,
- pohlaví dárce krve, zda byla použita plná krev nebo separované lymfocyty, použitý mitogen,
- případně počet pasáží,
- případně metody udržování buněčné kultury,
- modální hodnota počtu chromozomů.

Zkušební podmínky:

- identifikace látky zastavující metafázi, její koncentrace a délka expozice buněk,
- odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti, jsou-li k dispozici,
- složení média, případně koncentrace CO₂,

▼ B

- koncentraci zkoušené látky,
- objem vehikula a přidané zkoušené látky,
- inkubační teplota,
- inkubační doba,
- délka expozice,
- případně hustota buněk při nasazení,
- typ a složení použitého metabolického aktivačního systému, včetně kritérií přijatelnosti,
- pozitivní a negativní kontroly,
- metody přípravy preparátů,
- kritéria hodnocení aberací,
- počet analyzovaných metafází,
- metody stanovení toxicity,
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojnásobnou.

Výsledky:

- známky toxicity, např. stupeň konfluence, údaje o buněčném cyklu, počty buněk, mitotický index,
- známky srážení,
- údaje o pH a osmolalitě expozičního média, pokud byly stanoveny,
- definice aberací, včetně gapů,
- počet buněk s chromozomovými aberacemi a typy aberací zvlášť pro každou exponovanou a kontrolní kulturu,
- změny ploidie, pokud byly pozorovány,
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- případné statistické analýzy,
- údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole,
- dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

- 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, s. 1–29.
- 2) Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The *in Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427–432.

▼B

- 3) Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, MA, Anderson, G. and Zeiger, E. (1978). Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), 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, 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, 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, 347–364.
- 7) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 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, 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, 277–290.
- 10) Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 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, s. 85–88.
- 12) Galloway, S.M., Aardema, M.J., Ishidate, M.Jr., Ivett, J.L., Kirkland, D.J., Morita, T., Mosesso, P., Sofuni, T. (1994). Report from Working Group on in *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. *Mutation Res.*, 312, 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., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, s. 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, 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, s. 91–103.

▼B

- 16) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795–801.
- 17) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.*, 119, 403–413.
- 18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362–1364.

▼B**B.11 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ
ABERACE V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘEŇE SAVCŮ *IN VIVO*****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 475 – Zkouška na chromozomové aberace v buňkách kostní dřevě savců (1997).

1.1 ÚVOD

Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vivo* je používána pro detekci strukturních chromozomových aberací indukovaných zkoušenou látkou v buňkách kostní dřevě savců, obvykle hlodavců (1, 2, 3, 4). Rozlišují se dva typy strukturních aberací – chromozomové a chromatidové. Nárůst polyploidie může znamenat, že chemická látka má schopnost indukovat numerické aberace. v případě většiny chemických mutagenů jsou indukované aberace chromatidového typu, avšak chromozomové aberace se rovněž vyskytují. Chromozomové mutace a související jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že chromozomové mutace a související jevy způsobující změny v onkogenech a v genech somatických buněk tlumících nádory, mají podíl na indukci rakoviny u člověka a v experimentálních systémech.

Při této zkoušce jsou rutinně používáni hlodavci. Cílovou tkání je v této zkoušce kostní dřev, poněvadž je vysoce vaskularizovaná tkání a obsahuje populaci buněk s rychlým cyklem, které se snadno izolují a zpracovávají. Jiné druhy a cílové tkáně nejsou předmětem této metody.

Tato zkouška na chromozomové aberace je zvláště určena k posouzení nebezpečí mutagenese, neboť umožňuje zohlednit faktory metabolismu *in vivo*, farmakokinetiku a procesy reparace DNA, třebaže se mohou u různých druhů a tkání měnit. Zkouška *in vivo* je rovněž užitečná pro další výzkum mutagenních účinků zjištěných zkouškou *in vitro*.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nebo reaktivní metabolity nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Chromatidová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu jednotlivých chromatid nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturní poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v tomtéž místě.

Endoreduplikace: proces, při kterém v jádře po S-fázi replikace DNA nedojde k mitóze, nýbrž následuje další S-fáze. Výsledkem jsou chromozomy se 4, 8, 16... chromatidami.

Gap: achromatická léze menší než šířka jednoho chromatidu a s minimální odchylkou chromatid.

Numerická aberace: odchylka počtu chromozomů od normálního počtu obvyklého u použitého typu buněk.

▼ B

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromozomových sad (n) jiný než diploidní (tj. $3n$, $4n$ atd.).

Strukturní aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromozomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromozomální nebo interchromozomální změny.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata jsou vystavena zkoušené látce vhodným způsobem a ve vhodném okamžiku po aplikaci se usmrtí. Před usmrcením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo Colcemide®). Z buněk kostní dřeně se poté připraví preparáty chromozomů, obarví se a analyzují se chromozomové aberace buněk v metafázi.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Přípravky

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířat*

Běžně je používán potkan, myš a křeček čínský, ačkoli lze použít jakýkoli vhodný savčí druh. Použity by měly být běžně používané kmeny mladých zdravých dospělých zvířat. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

1.4.1.4 *Příprava dávek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 Zkušební podmínky

1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

▼ B1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpuštědlo/vehikulum) kontroly pro obě pohlaví. S výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivní kontroly by měly poskytovat strukturní aberace *in vivo* při expozičních úrovních, u nichž se očekává, že poskytnou detekovatelný nárůst nad pozadí. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevysla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Je přijatelné, aby byla pozitivní kontrola podávána jiným způsobem než zkoušená látka a aby byl odběr v jejím případě prováděn jen jednou. Pro pozitivní kontrolu mohou být použity chemické látky ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici. Příklady pozitivních a negativních kontrol:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7
1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)- 1,3,5-triazin	51-18-3	200-083-5

V okamžiku každého odběru by měl být proveden odběr u negativních kontrol, jimž je aplikováno pouze rozpuštědlo nebo vehikulum a jež jinak podstupují stejný proces jako exponované skupiny, pokud nejsou z dosavadních kontrolních údajů k dispozici přijatelné údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk s chromozomovými aberacemi. Provádí-li se pro negativní kontrolu jeden odběr, je nejvhodnějším okamžikem doba prvního odběru. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpuštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá exponovaná a kontrolní skupina se skládá z alespoň pěti analyzovatelných zvířat pro každé pohlaví. Jestliže jsou v době studie k dispozici údaje ze studií se stejným druhem a za použití stejného způsobu expozice, jež prokazují, že neexistuje mezi pohlavími rozdíl v toxicitě, bude postačující zkoušení jednoho pohlaví. Je-li expozice člověka specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 **Plán expozice**

Zkoušené látky by měly být pokud možno podávány jednorázově. Zkoušené látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tzn. dvě dávky v týž den v rozmezí ne více než několika hodin, aby bylo usnadněno podávání velkých objemů materiálu. Jiné režimy podávání by měly být vědecky zdůvodněny.

▼ B

Vzorky by měly být odebrány ve dvou různých intervalech od aplikace podané v jednom dni. U hlodavců se odběr provádí po takové době od aplikace, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu (jenž trvá obvykle 12–18 hodin). Poněvadž doba nezbytná pro příjem a metabolismus zkoušené látky a rovněž pro účinky na kinetiku buněčného cyklu může mít vliv na optimální okamžik pro stanovení chromozomových aberací, doporučuje se provést další odběr po 24 hodinách od prvního odběru. Je-li aplikace rozložena do více než jednoho dne, měl by být odběr proveden po takové době od poslední aplikace, která odpovídá 1,5 násobku normální délky buněčného cyklu.

Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka látky zastavující metafázi (např. Colcemid® nebo kolchicin). Poté se po vhodné době provede u zvířat odběr. U myši je tato doba přibližně 3–5 hodin; u křečka čínského je tato doba přibližně 4–5 hodin. Z kostní dřeně se odeberou buňky a analyzují se na chromozomové aberace.

1.5.3 Dávkování

Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu dávek, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, které se použijí v hlavní studii (5). V případě toxicity se pro první odběr použijí tři úrovně dávek. Tyto úrovně dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou. Při pozdějším odběru stačí, když bude použita pouze nejvyšší dávka. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly při stejném režimu dávkování podle očekávání k letalitě. Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající v kostní dřeni některé známky toxicity (např. více než 50 % snížení mitotického indexu).

1.5.4 Limitní zkouška

Jestliže zkouška s jednou dávkou alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávek za nezbytnou. U déle trvajících studií je limitní dávkou pro 14denní aplikaci 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den a pro delší než 14denní aplikaci je limitní dávkou 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 Podávání dávek

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, nebo intraperitoneální injekcí. Jiné způsoby podávání jsou v odůvodněných případech přijatelné. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán nitrožaludečně nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušební objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

▼B**1.5.6 Příprava preparátů pro analýzu chromozomů**

Ohned po usmrcení se odebere kostní dřev, hypotonizuje se a fixuje. Buňky se nanesou na podložní sklíčka a obarví se.

1.5.7 Analýza

Jako měřítko cytotoxicity by měl být u všech exponovaných zvířat (včetně pozitivních kontrol) a u neexponovaných zvířat pro negativní kontrolu stanoven mitotický index, a to alespoň u 1 000 buněk na jedno zvíře.

U každého zvířete by mělo být analyzováno alespoň 100 buněk. Tento počet lze snížit, je-li pozorován velký počet aberací. Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. Protože při fixaci často dochází ke chromozomálním zlomům nebo ke ztrátě chromozomů u části buněk v metafázi, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu odpovídajícímu číslu $2n \pm 2$.

2. ÚDAJE**2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Pro každé zvíře by měl být vyhodnocen počet buněk, počet aberací na buňku a počet buněk s chromozomovou aberací (chromozomovými aberacemi) vyjádřený v procentech. Pro exponované a kontrolní skupiny by měly být uvedeny různé typy strukturních chromozomových aberací s jejich počtem a četností. Gapy se zaznamenávají odděleně a uvádějí se, ale nezahrnují se do celkové četnosti aberací. Neexistuje-li důkaz o rozdílu v odpovědi mezi pohlavími, mohou být pro statistickou analýzu údaje pro obě pohlaví zkombinovány.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst relativního počtu buněk s chromozomovými aberacemi v závislosti na dávce nebo jasný nárůst počtu buněk s aberacemi pro skupinu s určitou dávkou a k určitému okamžiku odběru. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (6). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď. Dvojnásobné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek.

Nárůst polyploidie může znamenat, že zkoušená látka má potenciál indukovat numerické chromozomové aberace. Nárůst počtu buněk s endoreduplikovanými chromozomy může znamenat, že zkoušená látka má schopnost potlačit progresi buněčného cyklu (7, 8).

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagení.

▼B

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojnásobné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na chromozomové aberace *in vivo* znamenají, že zkoušená látka indukuje v kostní dřeni testovacího druhu chromozomové aberace. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v kostní dřeni testovacího druhu chromozomové aberace.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka nebo její metabolity dostanou do krevního oběhu, nebo specificky do cílové tkáně (např. systémová toxicita).

3. **ZPRÁVY***PROTOKOL O ZKOUŠCE*

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

- pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontroly,
- údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,
- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- údaje o přípravě zkoušené látky,
- údaje o podávání zkoušené látky,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- popřípadě metody ověření, zda se zkoušená látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,
- případně přepočty mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),
- podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,
- podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,
- metody stanovení toxicity,

▼B

- identifikace látky zastávající metafázi, její koncentrace a délka aplikace,
- metody přípravy preparátů,
- kritéria hodnocení aberací,
- počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojnásobnou.

Výsledky:

- známky toxicity,
- mitotický index,
- typ a počet aberací uvedený samostatně pro každé zvíře,
- celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- celkový počet aberací ve skupině se středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- změny ploidie, pokud byly pozorovány,
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- případné statistické analýzy,
- údaje o souběžné negativní kontrole,
- dosavadní údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- údaje o souběžné pozitivní kontrole.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

- 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., s. 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, 157–165.
- 3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.
- 4) Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, 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, 313–319.

▼B

- 6) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. s. 184–232.
- 7) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.* 119, 403–413.
- 8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin – induced endoreduplication in Chinese hamster cells. *Cancer Res.*, 43, 1362–1364.

▼ B**B.12 MUTAGENITA – TEST SAVČÍCH ERYTROCYTÁRNÍCH MIKROJADER *IN VIVO*****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 474 – Test savčích erytrocytárních mikrojadér *in vivo* (1997).

1.1 ÚVOD

Test savčích erytrocytárních mikrojadér *in vivo* je používán pro detekci poškození chromozomů nebo mitotického aparátu erytroblastu, které je indukováno zkoušenou látkou, a to pomocí analýzy erytrocytů odebraných z kostní dřeně a/nebo buněk periferní krve, obvykle hlodavců.

Účelem testu savčích erytrocytárních mikrojadér je identifikovat látky, které způsobují cytogenetické poškození, jehož výsledkem je tvorba mikrojadér obsahujících nereplikující se (lagging) chromozomové fragmenty nebo celé chromozomy.

Když se erytroblast kostní dřeně mění na polychromatický erytrocyt, hlavní jádro je vypuzeno a mikrojádra, která při tom mohou vzniknout, zůstávají v cytoplasmě, která jinak jádra neobsahuje. Zviditelnění mikrojadér je v těchto buňkách usnadněno tím, že neobsahují hlavní jádro. Nárůst výskytu polychromatických erytrocytů s mikrojádry v exponovaných zvířatech je známkou indukovaného chromozomového poškození.

V tomto testu je rutinně používána kostní dřeň hlodavců, poněvadž tato tkáň produkuje polychromatické erytrocyty. Stanovení nezralých (polychromatických) erytrocytů s mikrojádry v periferní krvi je rovnocenně přijatelné u kteréhokoli druhu, u něhož byla prokázána neschopnost sleziny odstraňovat erytrocyty s mikrojádry, nebo dostatečná citlivost detekovat činitele, které způsobují strukturální nebo numerické chromozomové aberace. Mikrojádra lze rozlišit řadou kritérií. Ta zahrnují identifikaci přítomnosti nebo nepřítomnosti centromerní (kinetochorní) DNA v mikrojádre. Vyšetřuje se zejména četnost nezralých (polychromatických) erytrocytů s mikrojádry. Počet zralých (normochromatických) erytrocytů v periferní krvi, které obsahují mikrojádra, připadající na určitý počet zralých erytrocytů lze rovněž použít jako konečný výsledek zkoušky, jestliže jsou zvířata exponována čtyři týdny nebo déle.

Tento test savčích erytrocytárních mikrojadér *in vivo* je zvláště vhodný k posouzení nebezpečí mutagenese, neboť umožňuje zohlednit faktory metabolismu *in vivo* farmakokinetiku a procesy reparace DNA, třebaže se mohou lišit u různých druhů a tkání, jakož i z genetického hlediska. Zkouška *in vivo* je rovněž užitečná pro další výzkum mutagenních účinků zjištěných v systémech *in vitro*.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nebo reaktivní metabolity nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Viz také obecný úvod, část B.

▼ B

1.2 DEFINICE

Centromera (kinetochor): oblast (oblasti) chromozomu, k níž (k nimž) se během dělení buněk připojí dělicí vřetenko umožňující uspořádaný pohyb dceřiných chromozomů k pólům dceřiných buněk.

Mikrojádra: malá jádra existující odděleně od hlavních jader a vedle nich, vytvářená během telofáze mitosy (meiosy) nereplikujícími se (lagging) chromozomovými fragmenty nebo celými chromozomy.

Normochromatický erytrocyt: zralý erytrocyt neobsahující ribozomy, který lze rozlišit od nezralých polychromatických erytrocytů barvivem selektivním pro ribozomy.

Polychromatický erytrocyt: nezralý erytrocyt ve vývojovém mezistadiu, který ještě obsahuje ribozomy, a může být tedy rozlišen od zralých normochromatických erytrocytů barvivem selektivním pro ribozomy.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata se vhodným způsobem vystaví zkoušené látce. Při použití kostní dřeně se zvířata ve vhodném okamžiku po expozici usmrtí, odebere se kostní dřeň, připraví se preparáty a obarví se (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Při použití periferní krve se krev ve vhodném okamžiku po expozici odebere, rozetřením se připraví preparát a obarví se (4, 8, 9, 10). Při studiích s periferní krví by měla mezi poslední expozicí a sklizením buněk uplynout co nejkratší doba. Preparáty jsou analyzovány na přítomnost mikrojader.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Přípravky

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířat*

Při použití kostní dřeně se jako testovací zvíře doporučuje myš nebo potkan, ačkoli lze použít jakýkoli vhodný savčí druh. Při použití periferní krve se doporučuje myš. Lze však použít jakýkoli vhodný druh savce za předpokladu, že jde o druh, u něhož slezina neodstraňuje erytrocyty s mikrojádry, nebo druh vykazující dostatečnou citlivost detekovat činitele, které způsobují strukturní nebo numerické chromozomové aberace. Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by u obou pohlaví překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

▼ B1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodně přiřadí do kontrolních a experimentálních skupin. Zvířata se jednoznačně identifikují. Nechají se v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován.

1.4.1.4 *Příprava dávek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly pro obě pohlaví. S výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivní kontroly by měly produkovat mikrojádra *in vivo* při expozičních úrovních, u nichž se očekává, že poskytnou detekovatelný nárůst nad pozadí. Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Je přijatelné, aby pozitivní kontrola byla podávána jiným způsobem než zkoušená látka a aby byl odběr v tomto případě prováděn jen jednou. Pro pozitivní kontrolu navíc může být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici. Příklady látek pro pozitivní kontrolu:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7
1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)- 1,3,5-triazin	51-18-3	200-083-5

▼B

V okamžiku odběru by měl být proveden odběr u skupiny negativní kontroly, které je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum a která jinak podstupuje stejný proces jako exponované skupiny, pokud nejsou z dosavadních kontrolních údajů k dispozici přijatelné údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk s mikrojádry. Provádí-li se pro negativní kontrolu jeden odběr, je nejvhodnějším okamžikem doba prvního odběru. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

Při použití periferní krve může být jako negativní kontrola přijatelný také vzorek krve odebraný před expozicí, pouze však u krátkých studií s periferní krví (např. 1–3 aplikace) za předpokladu, že výsledné údaje budou v rozpětí, které se na základě dosavadních kontrol očekává.

1.5 POSTUP**1.5.1 Počet a pohlaví zvířat**

Každá exponovaná a kontrolní skupina se musí skládat z alespoň pěti analyzovatelných zvířat pro každé pohlaví (11). Jestliže jsou v době studie k dispozici údaje ze studií se stejným druhem a za použití stejného způsobu expozice, jež prokazují, že neexistuje mezi pohlavími rozdíl v toxicitě, bude postačující zkoušení jednoho pohlaví. Je-li expozice člověka specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 Plán aplikace

Nelze doporučit žádný standardní plán (tj. jednu, dvě nebo tři aplikace v intervalu 24 hodin). Vzorky ze studií s prodlouženým režimem podávání jsou přijatelné, pokud se u těchto studií prokáží pozitivní výsledky, nebo – v případě negativních studií – pokud byla prokázána toxicita nebo byla uplatněna limitní dávka a podávání pokračuje až do okamžiku odběru. Zkoušené látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tzn. dvě dávky v týž den v rozmezí ne více než několika hodin, aby bylo usnadněno podávání velkých objemů materiálu.

Test může být proveden dvěma způsoby:

- a) zkoušená látka se aplikuje zvířatům jednou. Vzorky kostní dřeně se odeberou alespoň dvakrát, přičemž první odběr se provede nejdříve 24 hodin po aplikaci a poslední nejpozději 48 hodin po aplikaci a s přiměřeným odstupem mezi odběry. Odběr dříve než 24 hodin po aplikaci musí být zdůvodněn. Vzorky periferní krve se odeberou alespoň dvakrát, přičemž první odběr se provede nejdříve 36 hodin po aplikaci a poslední nejpozději 72 hodin po aplikaci a po prvním odběru se dodrží odpovídající odstup. Je-li po prvním odběru pozorována pozitivní odpověď, není další odběr nutný;

▼B

- b) jsou-li podávány dvě nebo více dávek denně (např. dvě nebo více dávek v intervalu 24 hodin), měly by být vzorky při použití kostní dřeně odebrány jednou po 18 až 24 hodinách po poslední aplikaci a při použití periferní krve jednou po 36 až 48 hodinách po poslední aplikaci (12).

Podle potřeby mohou být navíc použity jiné doby odběru.

1.5.3 Dávkování

Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu dávek, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, jež se použijí v hlavní studii (13). V případě toxicity se pro první odběr použijí tři úrovně dávky. Tyto úrovně dávky by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou. Při pozdějším odběru stačí, když bude použita pouze nejvyšší dávka. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly při stejném režimu dávkování podle očekávání k letalitě. Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající v kostní dřeni některé známky toxicity (např. snížení podílu nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů v kostní dřeni nebo v periferní krvi).

1.5.4 Limitní zkouška

Jestliže zkouška s jednou dávkou alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávky za nezbytnou. U déle trvajících studií je limitní dávkou pro 14denní aplikaci 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den a pro delší než 14denní aplikaci je limitní dávkou 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti/den. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 Podávání dávek

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, nebo intraperitoneální injekcí. Jiné způsoby podávání jsou v odůvodněných případech přijatelné. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán nitrožaludečně nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušební objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

▼B**1.5.6 Příprava kostní dřeně nebo krve**

Buňky kostní dřeně se obvykle získávají z femuru nebo tibie ihned po usmrcení. Buňky se odeberou z femuru nebo tibie a zavedenými metodami se preparují a obarví. Periferní krev se získává z ocasní žíly nebo jiné vhodné krevní cévy. Krevní buňky se ihned supraviválně obarví (8, 9, 10), nebo se připraví preparáty roztěrem a poté se obarví. Použitím barviva specifického pro DNA (např. akridinová oranž (14) nebo Hoechst 33258 a pyronin-Y (15)) se lze vyhnout některým artefaktům spojeným s použitím barviva nespecifického pro DNA. Tato výhoda nebrání použití konvenčních barviv (např. Giemsa). Přídavné systémy (např. celulosová kolona k odstranění buněk obsahujících jádra (16)) lze použít za předpokladu, že se prokázala odpovídající funkčnost těchto systémů pro preparaci mikrojadér v laboratoři.

1.5.7 Analýza

Pro každé zvíře se stanoví podíl nezralých erytrocytů z celkového (nezralé + zralé) množství erytrocytů, přičemž se v případě kostní dřeně použije celkově alespoň 200 erytrocytů a v případě periferní krve alespoň 1 000 erytrocytů (17). Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. U každého zvířete se vyšetří alespoň 2 000 nezralých erytrocytů na výskyt mikrojadér v nezralých erytrocytech. Další informace mohou být získány vyšetřením zralých erytrocytů na výskyt mikrojadér. Při mikroskopické analýze by neměl být podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů menší než 20 % kontrolní hodnoty. Jestliže jsou zvířata exponována nepřetržitě čtyři týdny nebo déle, lze také vyšetřit na výskyt mikrojadér alespoň 2 000 zralých erytrocytů na jedno zvíře. Systémy pro automatickou analýzu (analýza obrazu a průtoková cytometrická analýza buněčné suspenze) jsou po odpovídajícím zdůvodnění a validaci přijatelnými alternativami manuálního hodnocení.

2. ÚDAJE**2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Pro každé analyzované zvíře by měl být uveden počet vyšetřených nezralých erytrocytů, počet nezralých erytrocytů s mikrojádry a počet nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů. Jestliže jsou zvířata exponována nepřetržitě čtyři týdny nebo déle, měly by být také uvedeny údaje o zralých erytrocytech, byly-li shromažďovány. Pro každé zvíře se uvede podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů a případně množství erytrocytů s mikrojádry vyjádřené v procentech. Neexistuje-li důkaz o rozdílu v odpovědi mezi pohlavími, mohou být pro statistickou analýzu údaje pro obě pohlaví zkombinovány.

▼B**2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ**

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst počtu buněk s mikrojádry v závislosti na dávce nebo jasný nárůst počtu buněk s mikrojádry pro skupinu s určitou dávkou a k určitému okamžiku odběru. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (18, 19). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď. Dvojznačné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagení.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky testu na mikrojádra znamenají, že zkoušená látka indukuje mikrojádra, jež jsou důsledkem chromozomového poškození nebo poškození mitotického aparátu erytroblastu testovacího druhu. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neprodukuje mikrojádra v nezralých erytrocytech testovacího druhu.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka nebo její metabolity dostanou do krevního oběhu, nebo specificky do cílové tkáně (např. systémová toxicita).

3. ZPRÁVY**PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto údaje:

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- zdroj, podmínky chovu, strava atd.,
- individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

- údaje k pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontrole,
- údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,

▼ B

- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- údaje o přípravě zkoušené látky,
- údaje o podání zkoušené látky,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- popřípadě metody ověření, zda se zkoušená látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,
- případně přepočítání mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),
- podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,
- podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,
- metody přípravy preparátů,
- metody stanovení toxicity,
- kritéria hodnocení mikrojader v nezralých erytrocytech,
- počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojnásobnou.

Výsledky:

- známky toxicity,
- podíl nezralých erytrocytů z celkového množství erytrocytů,
- počet nezralých erytrocytů s mikrojádry uvedený samostatně pro každé zvíře,
- střední hodnota ± směrodatná odchylka počtu nezralých erytrocytů s mikrojádry ve skupině,
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- případné statistické analýzy a metody,
- údaje o souběžné a dosavadní negativní kontrole,
- údaje o souběžné pozitivní kontrole.
- Rozbor výsledků.
- Závěry.

4. **LITERATURA**

- 1) Heddle, J.A. (1973). A Rapid *In Vivo* Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, 187–190.
- 2) Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, 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: 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, 29–80.

▼B

- 5) MacGregor, J.T., Schlegel, R. Choy, W.N., and Wehr, C.M. (1983). Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice. in: „Developments in Science and Practice of Toxicology“, Ed. A.W. Hayes, R.C. Schnell and T.S. Miya, Elsevier, Amsterdam, 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: 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: 513–522.
- 8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1990). The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides. *Mutation Res.*, 245, 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, 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, 153–159.
- 11) Hayashi, M., Tice, R.R., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blackey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr.F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). *In Vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.*, 312, 293–304.
- 12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995). An optimal, generalized sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test. *Mutagenesis*, 10, 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, 313–319.
- 14) Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Res.*, 120, 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 Pyronin Y. *Mutation Res.*, 120, 269–275.
- 16) Romagna, F. and Staniforth, C.D. (1989). The automated bone marrow micronucleus test. *Mutation Res.*, 213, 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, 97–99.

▼ B

- 18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assay. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity tests. UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I, revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.
- 19) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. 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, s. 184–232.

▼B**B.13/14 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA REVERZNÍ MUTACE S BAKTERIEMI****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 471 – Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (1997).

1.1 ÚVOD

Při zkoušce na reverzní mutace s bakteriemi se používají bakteriální kmeny závislé na aminokyselinách *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*, k detekci bodových mutací, které zahrnují substituci, adici a delecí jednoho nebo několika párů bází DNA (1, 2, 3). Podstata této zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi spočívá v detekci mutací, které revertují mutace obsažené v testovacích kmenech, a obnovují tak funkční schopnost bakterií syntetizovat esenciální aminokyseliny. Bakterie po reverzi jsou detekovány díky své schopnosti růst v nepřítomnosti aminokyselin, které jsou vyžadovány mateřským testovacím kmenem.

Bodové mutace a podobné jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka a existuje mnoho důkazů o tom, že bodové mutace v onkogenech a v genech somatických buněk tlumících nádory mají podíl na tvorbě rakoviny u člověka a u pokusných zvířat. Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi je rychlá, nenákladná a relativně snadná. Mnoho testovacích kmenů má řadu vlastností, díky nimž jsou citlivější na detekci mutací, včetně responsivenesských DNA na reverzních místech, zvýšené permeability buněk pro velké molekuly a eliminaci reparačních systémů DNA nebo zlepšení reparačních procesů DNA náchylných k chybám. Specifičnost testovacích kmenů může poskytnout některé užitečné informace o typech mutací, jež jsou indukovány genotoxickými činidly. Pro zkoušky na reverzní mutací s bakteriemi je k dispozici velmi rozsáhlá databáze výsledků pro širokou škálu struktur a dále byly vyvinuty dobře vyzkoušené metody zkoušení chemických látek, včetně těkavých sloučenin, s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Zkouška na reverzní mutace: s bakteriemi *Salmonella typhimurium* nebo *Escherichia coli* slouží k detekci mutací v kmeni vyžadujícím aminokyseliny (histidin resp. tryptofan), přičemž vzniká kmen nezávislý na vnějším přísunu aminokyseliny.

Mutageny substituce párů bází: činidlo, jež způsobují změny v bázích DNA. Při zkoušce reverzních mutací se mohou tyto změny vyskytnout na místě původní mutace nebo jiném místě bakteriálního genomu.

Posunové mutageny: činidlo, jež způsobují adici nebo delecí jednoho nebo více párů bází DNA a posunují tak čtecí rámec RNA.

▼ B

1.3 VÝCHOZÍ ÚVAHY

Při zkouškách na reverzní mutace s bakteriemi se využívají prokaryotické buňky, které se liší od buněk savců faktory, jako jsou příjem, metabolismus, chromozomová struktura a reparační procesy DNA. Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Metabolické aktivační systémy *in vitro* nemohou zcela napodobit podmínky *in vivo* u savců. Zkouška tedy neposkytuje přímou informaci o mutagenním a karcinogenním potenciálu látky pro savce.

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi je zpravidla využívána pro počáteční vyšetření genotoxické aktivity, a zejména aktivity vyvolávající bodové mutace. Z rozsáhlé databáze vyplývá, že mnoho chemických látek, které jsou v této zkoušce pozitivní, vykazují mutagenní aktivitu i v jiných zkouškách. Existují příklady mutagenních činitelů, které nejsou detekovány touto zkouškou. Příčiny těchto skutečností lze spatřovat ve specifické povaze detekovaného konečného jevu, v rozdílech v metabolické aktivaci nebo v rozdílech v biologické dostupnosti. Na druhé straně faktory, které zvyšují citlivost zkoušky na reverzní mutace na bakteriích, mohou vést k nadhodnocení mutagenní aktivity.

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi nemusí být vhodná pro určité třídy chemických látek, například vysoce baktericidní sloučeniny (např. určitá antibiotika) a pro chemické látky, o nichž se předpokládá (nebo o nichž se ví), že specificky zasahují do replikačního systému buněk savců (např. některé inhibitory topoisomerasy a některé analogy nukleosidů). V takových případech mohou být vhodnější zkoušky mutagenity u savců.

Přestože mnoho sloučenin, pro něž je tato zkouška pozitivní, je karcinogenní pro savce, není korelace absolutní. Závisí na chemické třídě a existuje mnoho karcinogenů, jež nejsou detekovány touto zkouškou, neboť působí jinými, negenotoxickými mechanismy, nebo mechanismy, které v bakteriálních buňkách neexistují.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Suspenze bakteriálních buněk jsou vystaveny zkoušené látce, a to za přítomnosti vnějšího metabolického aktivačního systému a bez něho. Ve standardním miskovém testu se suspenze smíchají s vrchním agarem a ihned se nanesou na minimální půdu. V preinkubační metodě se zkoušená směs inkubuje a poté se před nanesením na minimální půdu smíchá s vrchním agarem. Při obou technikách se po dvou nebo třech dnech inkubace spočítají kolonie revertantů a provede se srovnání s počtem kolonií spontánních revertantů na kontrolní misce s rozpouštědlem.

Je popsáno několik postupů provedení zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi. Mezi běžně používané patří standardní miskový test (1, 2, 3, 4), preinkubační metoda (2, 3, 5, 6, 7, 8), fluktuální test (9, 10) a suspenzní metoda (11). Metody pro zkoušení plynů a par jsou popsány (12).

▼B

Zde popsané postupy se týkají hlavně standardního miskového testu a preinkubačních metod. Každá z nich je přijatelná pro provádění experimentů jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Některé látky lze účinněji detekovat za použití preinkubační metody. Tyto látky patří do chemických tříd, do nichž patří mezi jiným krátké alifatické nitrosaminy, dvojjazné kovy, aldehydy, azobarviva a diazoniové sloučeniny, pyrrolizidinové alkaloidy, allylové sloučeniny a nitrosloučeníny (3). Přitom se připouští, že určité třídy mutagenů nelze vždy detekovat standardními postupy, jako je standardní miskový test nebo preinkubační metoda. Měly by být považovány za „zvláštní případy“ a k jejich detekci se důrazně doporučuje použít alternativní postupy. Je možné identifikovat tyto „zvláštní případy“ (společně s příklady postupů jejich detekce): azobarviva a diazoniové sloučeniny (3, 5, 6, 13), plyny a těkavé chemické látky (12, 14, 15, 16) a glykosidy (17, 18). Odchyłka od standardního postupu musí být vědecky zdůvodněna.

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 Přípravky

1.5.1.1 *Bakterie*

Čerstvé kultury bakterií by měly být kultivovány do pozdní exponenciální fáze nebo do časně stacionární fáze růstu (přibližně 10^9 buněk na ml). Buňky v pozdní stacionární fázi by neměly být použity. Je důležité, aby měly použité bakterie vysoký titr životaschopných bakterií. Titr může být prokázán buď na základě dosavadních kontrolních údajů o růstové křivce, nebo pro každou zkoušku stanovením počtu životaschopných buněk na miskách.

Doporučená inkubační teplota je 37 °C.

Mělo by být použito alespoň pět kmenů bakterií. Mezi nimi by měly být čtyři kmeny *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 nebo TA97a nebo TA97; TA98; TA100), jejichž odpověď se ukázala v různých laboratořích jako spolehlivá a reprodukovatelná. Tyto čtyři kmeny *S. typhimurium* mají pár bází GC na primárním reverzním místě a je známo, že jejich prostřednictvím nelze detekovat určité oxidační mutageny, činitele způsobující překřížení vláken DNA a hydraziny. Tyto látky mohou být detekovány kmeny *E. coli* WP2 strains nebo *S. typhimurium* TA102 (19), které mají na primárním reverzním místě pár bází AT. Doporučená kombinace kmenů je tedy tato:

— *S. typhimurium* TA1535,

— *S. typhimurium* TA1537 nebo TA97 nebo TA97a,

— *S. typhimurium* TA98,

— *S. typhimurium* TA100 a

— *E. coli* WP2 uvrA, nebo *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), nebo *S. typhimurium* TA102.

Pro detekci mutagenů způsobujících překřížení vláken DNA může být vhodnější zařadit TA102 nebo přidat kmen *E. coli* (např. *E. coli* WP2 nebo *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼ B

Měly by být použity zavedené postupy přípravy kmenové kultury, verifikace markeru a skladování. Potřeba aminokyseliny pro růst by měla být prokázána pro každou zmrazenou kmenovou kulturu (histidin pro kmeny *S. typhimurium* a tryptofan pro *E. coli*). Podobně by měly být kontrolovány jiné fenotypové charakteristiky, jmenovitě podle potřeby přítomnost nebo nepřítomnost R-faktoru plasmidů (tj. ampicilinová rezistence u kmenů TA98, TA100 a TA97a nebo TA97, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101) a ampicilinová a tetracyklinová rezistence u kmene TA102); přítomnost charakteristických mutací (tj. rfa mutací u *S. typhimurium* citlivostí na krystalovou violet a uvrA mutace u *E. coli* nebo uvrB mutací u *S. typhimurium*, citlivostí na ultrafialové světlo) (2)(3). Kmeny by měly rovněž dávat počty kolonií spontánních revertantů na misce v rozmezí četností očekávaných na základě dosavadních údajů laboratorních kontrol a nejlépe v rozmezí uvedeném v literatuře.

1.5.1.2 *Médium*

Použije se vhodný minimální agar (např. obsahující minimální půdu E (Vogel-Bonner) a glukosu) a vrchní agar obsahující histidin a biotin nebo tryptofan umožňující několik buněčných dělení (1, 2, 9).

1.5.1.3 *Metabolická aktivace*

Bakterie by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodným systémem metabolické aktivace a bez něho. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem doplněná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců ošetřených prostředkem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (1, 2) nebo fenobarbitonu a β -naftoflavonu (18, 20, 21). Postmitochondriální frakce je obvykle používána v koncentracích v rozmezí 5 až 30 % obj. ve směsi S9. Volba a podmínky metabolického aktivačního systému může záviset na třídě zkoušené chemické látky. V některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci postmitochondriální frakce. U azobarviv a diazoniových sloučenin může být vhodnější použití redukčního metabolického aktivačního systému (6, 13).

1.5.1.4 *Zkoušená látka nebo přípravek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací na bakterie rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacím systémům a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené chemické látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

Rozpouštědlo/vehikulum by mělo být mimo podezření, že reaguje se zkoušenou látkou, a mělo by být slučitelné s přežitím bakterií a s aktivitou S9 (22). Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Při zkoušení látek nestálých ve vodě by měla být použita organická rozpouštědla neobsahující vodu.

▼ B1.5.2 **Zkušební podmínky**1.5.2.1 *Zkušební kmeny (viz 1.5.1.1)*1.5.2.2 *Expoziční koncentrace*

Mezi kritéria, která mají být zohledněna při stanovení nejvyššího množství zkoušené látky patří cytotoxicita a rozpustnost v konečné směsi pro aplikaci.

Může být užitečné stanovit toxicitu a nerozpustnost v předběžných experimentech. Cytotoxicita může být detekována snížením počtu kolonií revertantů, vymizením nebo zeslabením bakteriálního podkladu nebo snížením stupně přežití exponovaných kultur. Cytotoxicita látky se může změnit v přítomnosti metabolických aktivačních systémů. Nerozpustnost by měla být posouzena na základě viditelného srážení v konečné směsi za skutečných zkušebních podmínek.

Doporučená maximální zkušební koncentrace pro rozpustné necytotoxické látky je 5 mg/misku nebo 5 µl/misku. U necytotoxických látek nerozpustných při koncentracích 5 mg/misku nebo 5 µl/misku by měla být jedna nebo více zkušebních koncentrací takových, aby látky byly v konečné směsi pro aplikaci nerozpustné. Zkoušené látky, které jsou cytotoxické již při koncentracích nižších než 5 mg/misku nebo 5 µl/misku, by měly být zkoušeny až do cytotoxické koncentrace. Sraženina by neměla vadit při vyšetřování.

Mělo by být použito alespoň pět různých analyzovatelných koncentrací zkoušené látky, přičemž při prvním experimentu by měly být intervaly mezi zkušebními body rovny přibližně polovině dílku logaritmické stupnice (tj. $\sqrt{10}$). Menší intervaly jsou vhodné v případě, kdy se vyšetřuje křivka závislosti odpovědi na koncentraci. Zkoušení koncentrací vyšších než 5 mg/misku nebo 5 µl/misku může být zváženo při hodnocení látek obsahujících významné množství potenciálně mutagenních nečistot.

1.5.2.3 *Negativní a pozitivní kontroly*

Součástí každého stanovení by měly být kmenově specifické pozitivní a negativní (rozpuštědlo nebo vehikulum) kontroly s metabolickou aktivací a bez ní. Pro pozitivní kontrolu by měly být vybrány koncentrace dokládající účinnost každé zkoušky.

V případě zkoušek s použitím metabolického aktivačního systému by měla být látka(látky) pro pozitivní kontrolu vybrána(vybrány) na základě typu použitého kmene bakterií.

Příkladem vhodné pozitivní kontroly u zkoušky s metabolickou aktivací jsou tyto látky:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
9,10-dimethylantracen	781-43-1	212-308-4
7,12-dimethylbenzo[<i>a</i>]anthracen	57-97-6	200-359-5
benzo[<i>a</i>]pyren	50-32-8	200-028-6
2-aminoanthracen	613-13-8	210-330-9

▼ B

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
cyklofosfamid	50-18-0	
cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	200-015-4

Tato látka je vhodnou pozitivní kontrolou pro metodu redukční metabolické aktivace:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
CI Direct Red 28	573-58-0	209-358-4

2-aminoanthracen by neměl být použit jako jediný indikátor účinnosti směsi S9. Při použití 2-aminoanthracenu by měla být každá šarže S9 charakterizována mutagenem, který vyžaduje metabolickou aktivaci mikrosomálními enzymy, například benzo[a]pyren nebo 7,12-dimethylbenzo[a]anthracen.

Příkladem kmenověspecifické pozitivní kontroly u zkoušky bez vnější metabolické aktivace jsou tyto látky:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS	Kmen
azid sodný	26628-22-8	247-852-1	TA1535 a TA100
2-nitrofluoren	607-57-8	210-138-5	TA98
9-aminoakridin	90-45-9	201-995-6	TA1537, TA97 a TA97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA1537, TA97 a TA97a
kumenhydroperoxid	80-15-9	201-254-7	TA102
mitomycin C	50-07-7	200-008-6	WP2uvrA a TA102
1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
4-nitrochinolin-1-oxid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2 uvrA a WP2 uvrA (pKM101)
α [(5-nitro-2-furyl)methyliden]furan-2-acetamid (AF2)	3688-53-7		kmeny obsahující plasmidy

Pro pozitivní kontrolu mohou být použity jiné vhodné referenční látky. Pro pozitivní kontrolu by mělo být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici.

Měly by být použity negativní kontroly skládající se ze samotného rozpouštědla nebo vehikula, bez zkoušené látky, zpracované jinak stejným způsobem jako exponované skupiny. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud žádné kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagení účinky.

▼ B**1.5.3 Postup**

U standardní miskové metody (1, 2, 3, 4) bez metabolické aktivace se obvykle smíchá 0,05 ml nebo 0,1 ml zkušebních roztoků, 0,1 ml čerstvé bakteriální kultury (obsahující přibližně 10^8 životaschopných buněk) a 0,5 ml sterilního pufru s 2,0 ml vrchního agaru. V případě zkoušky s metabolickou aktivací se obvykle smíchá 0,5 ml metabolické aktivační směsi obsahující přiměřené množství postmitochondriální frakce (v rozmezí 5 až 30 % obj. v metabolické aktivační směsi) s vrchním agarem (2,0 ml) a zároveň s bakteriemi a zkoušenou látkou nebo zkušebním roztokem. Obsah každé zkumavky se promíchá a přelije přes povrch minimálního agaru na misce. Před inkubací se nechá vrchní agar ztuhnout.

U preinkubační metody (2, 3, 5, 6) se zkoušená látka nebo zkoušený roztok před smícháním s vrchním agarem a přelitím přes povrch minimálního agaru na misce obvykle 20 minut nebo déle preinkubuje s testovacím kmenem (obsahujícím přibližně 10^8 životaschopných buněk) a sterilním pufrem nebo metabolickým aktivačním systémem (0,5 ml) při 30–37 °C. Obvykle se smíchá 0,05 nebo 0,1 ml zkoušené látky nebo zkušebního roztoku, 0,1 ml bakterií a 0,5 ml směsi S9 nebo sterilního pufru s 2,0 ml vrchního agaru. Zkumavky by měly být během inkubace provzdušňovány na třepačce.

K dostatečnému odhadu odchylky by měly být při každé úrovni dávky použity 3 misky. Použití dvou misek je přijatelné po vědeckém zdůvodnění. Případná ztráta misky nemusí znamenat znehodnocení zkoušky.

Plynné nebo těkavé látky by měly být zkoušeny vhodnými metodami, např. v těsně uzavřených kultivačních nádobách (12, 14, 15, 16).

1.5.4 Inkubace

Všechny misky v dané zkoušce by měly být inkubovány při 37 °C po 48–72 hodinách. Po uplynutí inkubační doby se zjistí počet kolonií revertantů na misku.

2. ÚDAJE**2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Předloženými údaji by měly být počty kolonií revertantů připadající na misku. Měl by být rovněž uveden počet kolonií revertantů jak na miskách s negativní kontrolou (kontrola rozpouštědla a případně neexponovaná kontrola), tak na miskách s pozitivní kontrolou. Počty na jednotlivých miskách, střední hodnoty počtu kolonií revertantů na misku a směrodatná odchylka by měly být předloženy pro zkoušenou látku a pozitivní a negativní kontrolu (neexponovanou kontrolu a/nebo kontrolu rozpouštědla).

Ověření jasně pozitivní odpovědi se nepožaduje. Dvojnásobné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek. Negativní výsledky musí být potvrzeny případ od případu. V případech, kdy se nepovažuje potvrzení negativních výsledků za nezbytné, by mělo být podáno zdůvodnění. Změna parametrů studie s cílem rozšířit rozsah posuzovaných podmínek by měla být zvážena v následných experimentech. K parametrům studie, které by mohly být změněny, patří rozmezí koncentrací, metoda zpracování (standardní misková metoda nebo preinkubace v kapalném médiu) a podmínky metabolické aktivace.

▼B

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst počtu kolonií revertantů na misku nad testovaný rozsah u alespoň jednoho kmene s metabolickým aktivačním systémem nebo bez něho, a to v závislosti na koncentraci, nebo reprodukovatelný nárůst tohoto počtu pro jednu nebo více koncentrací (23). Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (24). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojnásobně nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na reverzní mutace s bakteriemi znamenají, že zkoušená látka indukuje v genomu kmenů *Salmonella typhimurium a* nebo *Escherichia coli* bodové mutace substitucí bází nebo posunem čtecího rámce. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka není za podmínek zkoušky pro testovací druhy mutagenní.

3. ZPRÁVY

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Kmeny:

- použité kmene,
- počet buněk v kultuře,
- charakteristiky kmene.

Zkušební podmínky:

- množství zkoušené látky na misku (mg/misku nebo µl/misku) s odůvodněním výběru dávky a počtu misek na koncentraci,
- použitá média,
- typ a složení použitého metabolického aktivačního systému, včetně kritérií přijatelnosti,
- postup expozice.

Výsledky:

- známky toxicity,
- známky srážení,
- počty na jednotlivých miskách,

▼B

- střední hodnota počtu kolonií revertantů na misku a směrodatná odchylka,
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- případné statistické analýzy,
- údaje o souběžné negativní (rozpuštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- dosavadní údaje o negativní (rozpuštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

- 1) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347–364.
- 2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173–215.
- 3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994). Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays. *Mutation Res.*, 312, 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, 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, 91–96.
- 6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980). Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests. In: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*. Ed. Norpoth K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. s. 273–285.
- 7) Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, s. 13–61.
- 8) Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 167–177.
- 9) Green, M.H.L., Muriel, W.J. and Bridges, B.A. (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens. *Mutation Res.*, 38, 33–42.
- 10) Hubbard, S.A., Green, M.H.L., Gatehouse, D. and J.W. Bridges (1984). The Fluctuation Test in Bacteria. In: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. 2nd Edition. Ed. Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141–161.

▼B

- 11) Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*. *Environmental Mutagenesis*, 3, 453–465.
- 12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and T. Matsushima (1994). Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag. *Mutation Res.*, 307, 335–344.
- 13) Prival, M.J., Bell, S.J., Mitchell, V.D., Reipert, M.D. and Vaughn, V.L. (1984). Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay. *Mutation Res.*, 136, 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, 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, s. 249–258.
- 16) Hughes, T.J., Simmons, D.M., Monteith, I.G. and Claxton, L.D. (1987). Vaporization Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay. *Environmental Mutagenesis*, 9, 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, 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, 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, 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, s. 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, 175–177.
- 22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B.N. (1981). Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test. *Mutation Res.*, 88, 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, 83–91.

▼B

- 24) Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, s. 28–65.

▼ B

**B.15 ZKOUŠENÍ MUTAGENY A SCREENING KARCINOGENITY
– ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE U *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

1. METODA

1.1 ÚVOD

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Není uvedena.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Různé haploidní a diploidní kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* mohou být použity ke stanovení chemicky indukovaných genových mutací za přítomnosti metabolické aktivace nebo bez ní.

Jsou využívány přímé mutační systémy u haploidních kmenů, jako měření mutací z červených mutantů vyžadujících adenin (*ade-1*, *ade-2*) na dvojité bílé mutanty vyžadující adenin, a selektivní systémy, jako je indukce rezistence vůči kanavinu a cykloheximidu.

V nejlépe ověřeném reverzním mutačním systému se využívá haploidního kmene XV 18514C s nonsense mutacemi (ochre) *ade 2-1*, *arg 4-17*, *lys 1-1* and *trp 5-48*, které jsou vratné působením mutagenů vyvolávajících záměnu bází, indukujících mutace ve specifickém místě nebo ochre-supresorové mutace. XV 185-14C nese rovněž marker *his 1-7* missense mutaci, revertovanou převážně mutacemi v dalším místě, a marker *hom 3-10*, který je revertován posunovými mutageny.

U diploidních kmenů *S. cerevisiae* je jediným široce využívaným kmenem D₇, který je homozygotní pro *ilv 1-92*.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Příprava

Roztoky zkoušených chemických látek a kontrol se připraví těsně před zkoušením za použití vhodného vehikula. U organických látek, které nejsou rozpustné ve vodě, se použije nejvýše 2 % (obj.) roztok v organických rozpouštědlech, jako jsou ethanol, aceton nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Konečná koncentrace vehikula nesmí významně ovlivnit životaschopnost buněk a charakteristiky růstu.

▼ B**Metabolická aktivace**

Buňky se exponují zkoušeným chemickým látkám jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného vnějšího metabolického aktivačního systému.

Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců, upravovaná činidly indukujícími enzymy. Použití jiných druhů, tkání, postmitochondriálních frakcí nebo postupů může být rovněž vhodné pro metabolickou aktivaci.

*Zkušební podmínky***Zkušební kmeny**

Nejpoužívanější kmeny pro studie genových mutací jsou haploidní kmen XV 185-14C a diploidní kmen D₇. Jiné kmeny mohou být rovněž vhodné.

Média

Pro určení počtu přežívajících a mutovaných buněk se použijí vhodná kultivační média.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Souběžně se nasadí pozitivní kontroly, neexponované kontroly a kontroly s rozpouštědlem. Pro každou specifickou mutační změnu se použijí odpovídající pozitivní kontrolní chemické látky.

Expoziční koncentrace

Použije se nejméně pět dostatečně odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. U toxických látek nemá nejvyšší zkoušená koncentrace snižovat přežití na méně než 5–10 %. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se za použití vhodných postupů zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

Podmínky inkubace

Misky se inkubují v temnu čtyři až sedm dní při 28 až 30 °C.

Frekvence spontánních mutací

Použijí se subkultury s četností spontánních mutací v obvyklém přijatelném rozmezí.

▼ B**Počet misek**

Pro stanovení počtu prototrofních buněk vznikajících genovými mutacemi a pro stanovení životaschopnosti buněk se použijí nejméně tři misky na jednu koncentraci. U experimentů s markery, jako je *hom 3-10* s nízkou mutační rychlostí, se počet misek zvýší, aby byly získány statisticky relevantní údaje.

Postup

Expozice kmenů *S. cerevisiae* se obvykle provede v kapalném prostředí a zahrnuje buď buňky ve stacionární fázi, nebo rostoucí buňky. Výchozí experimenty se provedou na rostoucích buňkách: $1 - 5 \times 10^7$ buněk/ml se za protřepávání vystaví zkoušené látce na dobu až 18 hodin při 28 až 37 °C; podle potřeby se v průběhu expozice přidá odpovídající množství metabolické aktivací směsi. Na konci expoziční doby se buňky centrifugují, promyjí a naočkují na vhodné kultivační médium. Po inkubaci se na miskách spočítají přežívající buňky a buňky s indukovanými genovými mutacemi. Jestliže je první experiment negativní, provede se druhý experiment s buňkami ve stacionární fázi. Jestliže je první experiment pozitivní, potvrdí se vhodným nezávislým experimentem.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet kolonií, počet mutací, četnost přežívajících buněk a četnost mutací. Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem. Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- použitý kmen,
- zkušební podmínky: buňky ve stacionární fázi nebo rostoucí buňky, složení médií, teplota a délka inkubace, metabolický aktivací systém,
- podmínky expozice: úroveň expozice, postup a délka expozice, teplota při expozici, pozitivní a negativní kontroly,
- počet kolonií, počet mutantů, četnost přežívajících buněk a četnost mutací, podle možnosti vztah dávky a účinku, statistické hodnocení údajů,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼ B**B.16 ZKOUŠKA NA MITOTICKOU REKOMBINACI U *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Mitotickou rekombinaci u *Saccharomyces cerevisiae* lze detekovat mezi geny (obecněji mezi genem a jeho centromerou) a uvnitř genů. První případ je nazýván mitotické překřížení a vytváří reciproční produkty, zatímco druhý případ je většinou nerekiproční a nazývá se genová konverze. Překřížení se obecně stanoví na základě tvorby recesivních homozygotních kolonií nebo sektorů vzniklých u heterozygotních kmenů, zatímco genová konverze se stanoví na základě tvorby prototrofních revertant vzniklých u auxotrofního heteroalelického kmene, který nese dvě různé defektní alely téhož genu. Nejčastěji používanými kmeny pro detekci mitotické genové konverze jsou D₄ (heteroalelický v *ade 2* a *trp 5*) D₇ (heteroalelický v *trp 5*) BZ₃₄ (heteroalelický v *arg 4*) a JDI (heteroalelický v *his 4* a *trp 5*). Mitotické překřížení produkující červené a růžové homozygotní sektory lze stanovit u D₅ nebo D₇ (který slouží rovněž k měření mitotické genové konverze a reverzních mutací v *ilv 1-92* oba kmeny jsou heteroalelické pro komplementární alely *ade 2*).

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY*Příprava*

Roztoky zkoušených chemických látek a kontrol nebo referenčních sloučenin se připraví těsně před zkoušením za použití vhodného vehikula. U organických látek, které nejsou rozpustné ve vodě, se použije nejvýše 2 % (obj.) roztok v organických rozpouštědlech, jako jsou ethanol, aceton nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Konečná koncentrace vehikula nesmí významně ovlivnit životaschopnost buněk a charakteristiky růstu.

Metabolická aktivace

Buňky se exponují zkoušeným chemickým látkám jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného vnějšího metabolického aktivačního systému. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce připravená z jater hlodavců, upravovaná činidly indukujícími enzymy. Použití jiných druhů, tkání, postmitochondriálních frakcí nebo postupů může být rovněž vhodné pro metabolickou aktivaci.

▼ B*Zkušební podmínky*

Zkušební kmeny

Nejpoužívanějšími kmeny jsou diploidní kmeny D₄, D₅, D₇ a JD1. Jiné kmeny mohou být rovněž vhodné.

Média

Pro určení počtu přežívajících buněk a četnosti mitotické rekombinace se použijí vhodná kultivační média.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Souběžně se nasadí pozitivní kontroly, neexponované kontroly a kontroly s rozpouštědlem. Pro každou specifickou rekombinační změnu se použijí odpovídající pozitivní kontrolní chemické látky.

Expoziční koncentrace

Použije se nejméně pět dostatečně odstupňovaných koncentrací zkoušené chemické látky. Mezi faktory, které mají být zohledněny, patří cytotoxicita a rozpustnost. Nejnižší koncentrace nesmí mít vliv na životaschopnost buněk. U toxických látek nemá nejvyšší zkoušená koncentrace snižovat přežití na méně než 5–10 %. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se za použití vhodných postupů zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

Buňky mohou exponovány zkoušené chemické látce buď ve stacionární fázi, nebo během růstu po dobu až 18 hodin. Dlouhodobě exponované kultury však mají být mikroskopicky kontrolovány na tvorbu spor, jejichž přítomnost zkoušku znehodnocuje.

Podmínky inkubace

Misky se inkubují v temnu čtyři až sedm dní při 28 až 30 °C. Misky použité pro průkaz červených a růžových homozygotních sektorů tvořených mitotickým překřížením se před počítáním umístí v chladničce (při přibližně 4 °C) na další 1–2 dny, aby se mohly vytvořit odpovídající pigmentované kolonie.

Četnost spontánní mitotické rekombinace

Použijí se subkultury s četností spontánní mitotické rekombinace v obvyklém přijatelném rozmezí.

▼ B**Počet misek**

Pro stanovení počtu prototrofních buněk vznikajících mitotickou genovou konverzí a pro stanovení životaschopnosti buněk se použijí nejméně tři misky na jednu koncentraci. Pro stanovení recesivní homozygocity tvořené mitotickým překřížením se počet misek zvýší, aby bylo dosaženo dostatečného počtu kolonií.

Postup

Expozice kmenů *S. cerevisiae* se obvykle provede v kapalném prostředí a zahrnuje buď buňky ve stacionární fázi, nebo rostoucí buňky. Výchozí experimenty se provedou na rostoucích buňkách. $1 - 5 \times 10^7$ buněk/ml se za protřepávání vystaví zkoušené látce na dobu až 18 hodin při 28 až 37 °C; podle potřeby se v průběhu expozice přidá odpovídající množství metabolické aktivační směsi.

Na konci expoziční doby se buňky centrifugují, promyjí a naočkují na vhodné kultivační médium. Po inkubaci se na miskách spočítají přežívající buňky a počet indukci mitotické rekombinace.

Jestliže je první experiment negativní, provede se druhý experiment s buňkami ve stacionární fázi. Jestliže je první experiment pozitivní, potvrdí se vhodným nezávislým experimentem.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet kolonií, počet rekombinací, četnost přežívajících buněk a četnost rekombinací.

Výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- použitý kmen,
- zkušební podmínky: buňky ve stacionární fázi nebo rostoucí buňky, složení médií, teplota a délka inkubace, metabolický aktivační systém,
- podmínky expozice: úroveň expozice, postup a délka expozice, teplota při expozici, pozitivní a negativní kontroly,
- počet kolonií, počet rekombinací, četnost přežívajících buněk a četnost rekombinací, podle možnosti vztah dávky a účinku, statistické vyhodnocení údajů,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

▼B

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.17 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VITRO*****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 476, Zkouška na genové mutace v buňkách savců *in vitro* (1997).

1.1 ÚVOD

Zkoušku na genové mutace v buňkách savců *in vitro* lze použít pro detekci genových mutací indukovaných chemickými látkami. Mezi vhodné buněčné linie patří buňky lymfomu L5178Y myši, buněčné linie CHO, CHOAS52 a V79 křečka čínského a lymfoblastoidní buňky TK6 člověka (1). U těchto buněčných linií jsou nejpoužívanější mírou genetických účinků mutace genů pro thymidinkinazu (TK) a hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferasu (HPRT) a transgen xanthin-guaninfosforibosyltransferasy (XPRT). Zkoušky na mutace TK, HPRT a XPRT detekují různé spektrum genetických událostí. Autosomální lokace TK a XPRT může umožnit detekci genetických událostí (např. rozsáhlé delece), které nelze detekovat v HPRT lokusu na X chromosomech (2, 3, 4, 5, 6).

Ve zkoušce na genové mutace v buňkách savců *in vitro* lze použít kultury zavedených linií buněk nebo buněčné kmeny. Buňky se vybírají podle schopnosti růstu v kultuře a stálosti četnosti spontánních mutací.

Zkoušky prováděné *in vitro* obecně vyžadují použití vnějšího zdroje metabolické aktivace. Tento metabolický aktivační systém nemůže zcela napodobit podmínky *in vivo* u savců. Je třeba se zcela vyvarovat podmínek, které by vedly k pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vlastní mutagenitu. K pozitivním výsledkům, jež neodrážejí vlastní mutagenitu, může dojít změnou pH, osmolality nebo vysokých úrovní cytotoxicity (7).

Tato zkouška se používá ke zjištění možných mutagenů a karcinogenů pro savce. Mnoho sloučenin, pro něž je tato zkouška pozitivní, jsou karcinogeny savců; mezi touto zkouškou a karcinogenitou však není absolutní korelace. Korelace závisí na chemické třídě a přibývají důkazy o tom, že existují karcinogeny, které nejsou zjištěny touto zkouškou, neboť zřejmě působí jinými, negenotoxickými mechanismy, nebo mechanismy, které v bakteriálních buňkách neexistují (6).

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Přímá mutace: genová mutace výchozího typu mutované formy, která způsobuje změnu nebo ztrátu enzymatické aktivity kódovaných bílkovin.

Mutageny substituce párů bází: látky, které způsobují substituci jednoho nebo více párů bází v DNA.

Posunové mutageny: látky, které způsobují adici nebo deleci jednoho nebo více párů bází v molekule DNA.

▼B

Doba exprese fenotypu: doba, během níž vymizí z nově mutovaných buněk nezměněné genové produkty.

Četnost mutantů: počet pozorovaných mutantních buněk dělený počtem životaschopných buněk.

Relativní celkový růst: nárůst počtu buněk v čase ve srovnání s kontrolní populací buněk; vypočte se jako součin poměru rychlosti růstu v suspenzi a v negativní kontrole a relativní účinnosti klonování vzhledem k negativní kontrole.

Relativní růst v suspenzi: nárůst počtu buněk v průběhu exprese vzhledem k negativní kontrole.

Životaschopnost: účinnost klonování buněk v okamžiku nasazení na misku za selektivních podmínek po expresi.

Přežití: účinnost klonování buněk při nasazení na misku na konci období expozice; přežití je obvykle vyjádřeno v poměru k přežití kontrolní populace buněk.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Buňky, které v důsledku mutace $TK^{+/-} \rightarrow TK^{-/-}$ neobsahují thymidinkinasu (TK) jsou rezistentní k cytotoxickým účinkům analogu pyrimidinu trifluorthymidinu (TFT). Buňky produkující thymidinkinasu jsou citlivé na TFT, což způsobuje inhibici buněčného metabolismu a zastavuje další buněčné dělení. Mutantní buňky jsou tedy schopny proliferace za přítomnosti TFT, zatímco normální buňky, které obsahují thymidinkinasu tuto schopnost nemají. Podobně lze u buněk s deficientním HPRT nebo XPRT provést selekci prostřednictvím rezistence k 6thioguaninu (TG) nebo 8azaguaninu (AG). Vlastnosti zkoušené látky by měly být pečlivě zváženy, jestliže je ve zkoušce na genové mutace v buňkách savců zkoušen analog báze nebo sloučenina podobná selekčnímu činidlu. Mělo by být například vyšetřeno jakékoli podezření na selektivní toxicitu zkoušené látky pro mutantní nebo nemutantní buňky. Při zkoušení chemických látek, které mají podobnou strukturu jako selekční činidlo, musí tedy být potvrzena účinnost systému nebo činidla pro selekci (8).

Buňky v suspenzní nebo jednovrstevné kultuře jsou vhodnou dobu vystaveny zkoušené látce jak s metabolickou aktivací, tak bez ní, a subkultivovány za účelem stanovení cytotoxicity a za účelem exprese fenotypu před selekcí mutantů (9, 10, 11, 12, 13). Cytotoxicita se obvykle zjistí stanovením relativní účinnosti klonování (přežití) nebo stanovením relativního celkového růstu kultur po uplynutí doby expozice. Exponované kultury se udržují v růstovém médiu po vhodnou dobu charakteristickou pro každý zvolený lokus a typ buněk, aby nastala přibližně optimální fenotypová exprese indukovaných mutací. Četnost mutantů se stanoví tak, že se nasadí známý počet buněk do média obsahujícího selekční činidlo pro detekci mutantních buněk a do média bez selekčního činidla, aby byla stanovena účinnost klonování (životaschopnost). Po vhodné inkubační době se spočítají kolonie. Četnost mutantů se vypočte z počtu mutantních kolonií v selekčním médiu a počtu kolonií v médiu bez selekčního činidla.

▼ B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Přípravky

1.4.1.1 *Buňky*

Pro použití v této zkoušce jsou k dispozici různé typy buněk, včetně subklonů buněk L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 nebo TK6. Typy buněk v této zkoušce by měly vykazovat citlivost k chemickým mutagenům, vysokou klonovací schopnost a stabilní frekvenci spontánních mutací. Buňky by měly být kontrolovány, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty, a v případě kontaminace by neměly být použity.

Zkoušky by měly být navrženy tak, aby měly předem stanovenou citlivost a váhu. Počet použitých buněk, kultur a koncentrací zkoušené látky by měl tyto definované parametry odrážet (14). Minimální počet buněk, které přežijí expozici a které budou použity v každém stadiu zkoušky, by měl být založen na četnosti spontánních mutací. Obecným pravidlem je, aby byl použit počet buněk, který je desetinásobkem převrácené hodnoty četnosti spontánních mutací. Je však doporučeno, aby bylo použito alespoň 10^6 buněk. Měly by být k dispozici dostatečné dosavadní údaje o použitém buněčném systému, aby byla doložena konzistentní výpovědní hodnota zkoušky.

1.4.1.2 *Média a kultivační podmínky*

Pro udržování kultur by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky (kultivační nádoby, koncentrace CO_2 teplota a vlhkost). Média by měla být zvolena podle selekčních systémů a typů buněk použitých při zkoušce. Je zvláště důležité, aby kultivační podmínky byly zvoleny tak, aby byly zajištěny optimální růst buněk během období exprese a schopnost jak mutovaných, tak nemutovaných buněk tvořit kolonie.

1.4.1.3 *Příprava kultur*

Buňky by měly být získávány z kmenových kultur, nasazeny do kultivačního média a inkubovány při 37 °C. Před použitím v této zkoušce může být nezbytné odstranit z kultury již přítomné mutantní buňky.

1.4.1.4 *Metabolická aktivace*

Buňky by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodným systémem metabolické aktivace a bez něho. Nejčastěji používaným systémem je kofaktorem dotovaná postmitochondriální frakce (S9) připravená z jater hlodavců zpracovaná činidlem indukujícím enzymy, jako je Aroclor 1254 (15, 16, 17 a 18), nebo směs fenobarbitonu a β -naftoflavonu (19, 20).

Postmitochondriální frakce je v konečném testovacím médiu obvykle používána v koncentracích 1–10 % obj. Volba a podmínky metabolického aktivačního systému může záviset na třídě zkoušené chemické látky. V některých případech může být vhodné použít více než jednu koncentraci postmitochondriální frakce.

▼ B

Řada výsledků vývoje, včetně přípravy geneticky modifikovaných buněčných linií exprimujících specifické aktivační enzymy, poskytuje možnosti pro endogenní aktivaci. Volba použitých buněčných linií by měla být vědecky zdůvodněna (např. důležitostí isoenzymu cytochromu P450 pro metabolismus zkoušené látky).

1.4.1.5 Příprava zkoušené látky

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací na buňky rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalně zkoušené látky mohou být přidány přímo k testovacím systémům a/nebo mohou být před aplikací zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 Zkušební podmínky**1.4.2.1 Rozpouštědlo/vehikulum**

Rozpouštědlo/vehikulum by mělo být mimo podezření, že reaguje se zkoušenou látkou, a mělo by být slučitelné s přežitím buněk a s aktivitou S9. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul. Při zkoušení látek nestálých ve vodě by měla být použita organická rozpouštědla neobsahující vodu. Vodu lze odstranit přidáním molekulového síta.

1.4.2.2 Expoziční koncentrace

Mezi kritéria, která mají být zohledněna při stanovení nejvyšší koncentrace, patří cytotoxicita, rozpustnost v testovacím systému a změny pH nebo osmolality.

Cytotoxicita by měla být stanovena s metabolickou aktivací a bez ní v hlavním experimentu za použití vhodných indikátorů buněčné integrity a růstu, jako jsou relativní účinnost klonování (přežití) nebo relativní celkový růst. Může být výhodné stanovit cytotoxicitu a rozpustnost v předběžném experimentu.

Měly by být použity alespoň čtyři analyzovatelné koncentrace. V případě toxicity by měly tyto koncentrace pokrývat rozmezí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou, což bude obvykle znamenat, že by se koncentrace měly lišit faktorem 2 až $\sqrt{10}$. Je-li maximální koncentrace odvozena od cytotoxicity, mělo by být výsledkem přibližně 10–20 % (ale nejméně 10 %) přežití (relativní účinnost klonování) nebo relativní celkový růst. V případě relativně necytotoxických látek by měla být maximální zkušební koncentrace 5 $\mu\text{l/ml}$, 5 mg/ml nebo 0,01 M, podle toho, která z nich je nejvyšší.

▼B

Relativně nerozpustné látky by měly být zkoušeny až k mezi rozpustnosti za kultivačních podmínek, nebo až za tuto mez. Měla by být stanovena případná nerozpustnost v konečném médiu, ve kterému jsou buňky exponovány. Může být užitečné stanovit rozpustnost na začátku a na konci expozice, neboť koncentrace v testovacím systému se může v průběhu expozice měnit v důsledku přítomnosti buněk, séra S9 atd. Nerozpustnost lze zjistit vizuálně. Sraženina by neměla vadit při vyšetřování.

1.4.2.3 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpouštědlo nebo vehikulum) kontroly jak s metabolickou aktivací, tak bez ní. Při použití metabolické aktivace by měla být pro pozitivní kontrolu použita chemická látka, která k mutagenní reakci vyžaduje aktivaci.

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

Stav metabolické aktivace	Lokus	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
Bez vnější metabolické aktivace	HPRT	ethyl-methansulfonát	62-50-0	200-536-7
		1-ethyl-1-nitrosomočovina	759-73-9	212-072-2
	TK (malé a velké kolonie)	methyl-methansulfonát	66-27-3	200-625-0
		XPRT	ethyl-methansulfonát	62-50-0
	1-ethyl-1-nitrosomočovina		759-73-9	212-072-2
	S vnější metabolickou aktivací	HPRT	3-methylcholanthren	56-49-5
<i>N</i> -nitrosodimethylamin			62-75-9	200-549-8
7,12-dimethylbenzoanthracen			57-97-6	200-359-5
TK (malé a velké kolonie)		cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
		cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	
		benzo[<i>a</i>]pyren	50-32-8	200-028-5
		3-methylcholanthren	56-49-5	200-276-5
XPRT		<i>N</i> -nitrosodimethylamin (pro vysoké úrovně S9))	62-75-9	200-549-8
		benzo[<i>a</i>]pyren	50-32-8	200-028-5

Mohou být použity také jiné referenční látky pro pozitivní kontrolu, např. má-li laboratoř databázi dosavadních údajů o 5-brom-2'-deoxyuridinu (CAS 59-14-3, EINECS 200-415-9), může být tato referenční látka rovněž použita. Pro pozitivní kontrolu by mělo být pokud možno vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy.

▼ B

Měly by být použity negativní kontroly tvořené médiem obsahujícím samotné rozpouštědlo nebo vehikulum a zpracované jinak stejným způsobem jako exponované skupiny. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud žádné kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

1.4.3 **Postup**1.4.3.1 *Expozice zkoušené látky*

Proliferující buňky by měly být vystaveny zkoušené látce jak za přítomnosti metabolického aktivačního systému, tak bez něho. Expozice by měla trvat vhodnou dobu (obvykle je účinná doba 3 až 6 hodin). Expoziční doba může být prodloužena na jeden nebo více buněčných cyklů.

Pro každou zkušební koncentraci mohou být použity duplicitní kultury nebo jedna exponovaná kultura. Je-li použita jedna kultura, měl by být počet koncentrací zvýšen tak, aby byl zajištěn odpovídající počet kultur pro analýzu (např. alespoň osm analyzovatelných koncentrací). Měly by být použity duplicitní negativní kontrolní kultury (kontrola rozpouštědla).

Plynné nebo těkavé látky by měly být zkoušeny vhodnými metodami, např. v těsně uzavřených kultivačních nádobách (21, 22).

1.4.3.2 *Stanovení přežití, životaschopnosti a četnosti mutací*

Na konci expoziční doby se buňky promyjí a kultivují za účelem stanovení přežití a za účelem umožnění exprese fenotypu mutantu. Se stanovením cytotoxicity prostřednictvím stanovení relativní účinnosti klonování (přežití) nebo relativního celkového růstu kultur se započne obvykle po expoziční době.

Každý lokus má definované minimální časové nároky, aby umožnil přibližně optimální fenotypovou expresi nově indukovaných mutantů (HPRT a XPRT vyžadují alespoň 6 až 8 dnů, TK alespoň dva dny). Buňky jsou kultivovány v médiu se selekčním činidlem (selekčními činidly) a bez něho (bez nich) za účelem stanovení počtu mutantů a klonovací účinnosti. Se stanovením životaschopnosti (použité pro výpočet četnosti mutantů) se započne na konci doby exprese nasazením na misku bez selekčního činidla.

Je-li zkoušená látka pozitivní ve zkoušce L5178Y TK^{+/-}, mělo by být provedeno alespoň na jedné ze zkušebních kultur (s nejvyšší pozitivní koncentrací) a na negativních a pozitivních kontrolách rozdělení kultury podle velikosti kolonií. Je-li zkoušená látka ve zkoušce L5178Y TK^{+/-} negativní, mělo by být rozdělení kultury podle velikosti kolonií provedeno na negativních a pozitivních kontrolách. Při studiích za použití TK6TK^{+/-} může být také provedeno rozdělení kultury podle velikosti kolonií.

▼ B2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Údaje by měly zahrnovat stanovení cytotoxicity a životaschopnosti, počtu kolonií a četnosti mutantů pro exponované a kontrolní kultury. V případě pozitivní odpovědi na zkoušku L5178Y TK^{+/−} se kolonie vyšetřují alespoň u jedné koncentrace zkoušené látky (nejvyšší pozitivní koncentrace) a u negativní a pozitivní kontroly za použití kritéria malá kolonie – velká kolonie. Molekulární a cytogenetická povaha jak mutantů tvořících velké kolonie, tak mutantů tvořících malé kolonie byla podrobně zkoumána (23, 24). Ve zkoušce TK^{+/−} jsou kolonie vyšetřovány za použití kritéria kolonie s normálním růstem (velká) a kolonie s pomalým růstem (malá) (25). U mutantních buněk, které utrpěly nejrozsáhlejší genetické poškození, se prodloužily doby zdvojení, a tvoří tedy malé kolonie. Poškození má obvykle rozsah od ztrát celého genu až po karyotypické viditelné chromosomové aberace. Indukce mutantů tvořících malé kolonie se spojuje s chemickými látkami, které indukují silné chromosomové aberace (26). Méně závažně postižené buňky mutantů rostou podobným tempem jako mateřské buňky a tvoří velké kolonie.

Mělo by být udáno přežití (relativní účinnost klonování) nebo relativní celkový růst. Četnost mutantů by měla být vyjádřena jako počet mutantů k počtu přeživších buněk.

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé kultury. Dále by měly být všechny údaje shrnuty ve formě tabulky.

Ověření jasně pozitivní odpovědi se nepožaduje. Dvojnásobné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek. Negativní výsledky musí být potvrzeny případ od případu. V případech, kdy se nepovažuje potvrzení negativních výsledků za nezbytné, by mělo být podáno zdůvodnění. Změna parametrů studie s cílem rozšířit rozsah posuzovaných podmínek by měla být zvažena v následných experimentech jak pro dvojnásobné výsledky, tak pro negativní výsledky. K parametrům studie, které by mohly být změněny, patří rozmezí koncentrací a podmínky metabolické aktivity.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst četnosti mutantů v závislosti na koncentraci, nebo reprodukovatelný nárůst této četnosti. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody. Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nesplňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagení.

▼ B

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojnásobné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na genové mutace v buňkách savců *in vitro* znamenají, že zkoušená látka indukuje v použitých kultivovaných buňkách savců genové mutace. Reprodukovatelná pozitivní závislost odpovědi na koncentraci je velmi významná. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v použitých kultivovaných buňkách savců genové mutace.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby rozpouštědla/vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Buňky:

- typ a zdroj buněk,
- počet buněčných kultur,
- případně počet pasáží,
- případně metody udržování buněčné kultury,
- nepřítomnost mykoplasm.

Zkušební podmínky:

- odůvodnění výběru koncentrací a počtu kultur, včetně např. údajů o cytotoxicitě a mezích rozpustnosti, jsou-li k dispozici,
- složení média, případně koncentrace CO₂,
- koncentraci zkoušené látky,
- objem vehikula a přidané zkoušené látky,
- inkubační teplota,
- inkubační doba,
- délka expozice,
- případně hustota buněk během expozice,
- typ a složení použitého metabolického aktivačního systému, včetně kritérií přijatelnosti,
- pozitivní a negativní kontroly,

▼B

- délka doby exprese (případně včetně počtu nasazených buněk, subkultur a výměny média),
- selekční činidla,
- kritéria klasifikace zkoušky na pozitivní, negativní nebo dvojnásobnou,
- metody použité k počítání životaschopných a mutantních buněk,
- definice kolonií podle velikosti a typu (případně včetně kritérií pro malé a velké kolonie).

Výsledky:

- známky toxicity,
- známky srážení,
- údaje o pH a osmolalitě během expozice zkoušené látky, pokud byly stanoveny,
- velikost kolonií, byla-li vyšetřována, alespoň pro negativní a pozitivní kontroly,
- popřípadě předpoklady laboratoře detekovat mutanty tvořící malé kolonie systémem L5178Y TK^{+/-},
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- případné statistické analýzy,
- údaje o souběžné negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole,
- dosavadní údaje o negativní (rozpouštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- četnost mutantů.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

- 1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, F.J. and Tindall, K. R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 2) Chu, E.H.Y. and Malling, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306–1312.
- 3) Liber, H.L. and Thilly, W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467–485.
- 4) Moore, M.M., Harington-Brock, K., Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394–403.

▼B

- 5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. *Mutation Res.*, 223, 121–128.
- 6) Aaron, C.S., Bolesfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. *Mutation Res.*, 312, 235–239.
- 7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Res.*, 257, 147–204.
- 8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 115, 225–251.
- 9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, 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 Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.*, 196, 17–36.
- 10) Li, A.P., Carver, J.H., Choy, W.N., Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, 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, 135–141.
- 11) Liber, H.L., Yandell, D.W. and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. *Mutation Res.*, 216, 9–17.
- 12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R. and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191- Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate -and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. *Mutation Res.*, 160, 133–147.
- 13) Turner, N.T., Batson, A.G. and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/TK^{+/−} – TK^{+/−} Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science Publishers, New York, s. 239–268.
- 14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D. J., Ed., Cambridge University Press, s. 66–101.
- 15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. *Mutation Res.*, 46, 365–373.
- 16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347–364.

▼B

- 17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK^{+/−} Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61–108.
- 18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173–215.
- 19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175–177.
- 20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, s. 85–88.
- 21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, s. 91–103.
- 22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795–801.
- 23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51–55.
- 24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A. G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFT^r) Mutants of L5178Y/TK^{+/−} Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161–174.
- 25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, 89–102.
- 26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK^{+/−} - 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609–614.

▼B**B.18 ZKOUŠKA NA POŠKOZENÍ A REPARACI DNA – NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA – V SAVČÍCH BUŇKÁCH *IN VITRO*****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Není uvedena.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na neplánovanou syntézu DNA (UDS) umožňuje měřit reparační syntézu DNA po vyštěpení a nahrazení části DNA obsahující oblast poškození indukovaného chemickými nebo fyzikálními faktory. Zkouška je založena na inkorporaci značeného thymidinu (³H-TdR) do DNA savčích buněk, které nejsou v S-fázi buněčného cyklu. Inkorporace ³H-TdR je stanovena autoradiograficky nebo kapalinovou scintilační spektrometrií (LSC) DNA exponovaných buněk. Savčí buněčné kultury, pokud ne přímo primární buněčné kultury hepatocytů potkana, se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak i v nepřítomnosti vnějšího metabolického aktivčního systému. UDS může být také stanovena *in vivo*.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**Příprava**

Zkoušené chemické látky a kontroly nebo referenční látky se připraví v kultivačním médiu nebo se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vehikulech a poté se pro účely stanovení zředí kultivačním médiem. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivňovat životaschopnost buněk.

Pro stanovení se použijí primární kultury hepatocytů potkana, lidských lymfocytů, nebo zavedených buněčných linií (lidských diploidních fibroblastů).

Buňky se exponují zkoušené chemické látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vhodného metabolického aktivčního systému.

Zkušební podmínky**Počet kultur**

Pro každý experimentální bod je potřeba nejméně dvou buněčných kultur pro autoradiografii a šesti kultur (nebo méně, jeli to vědecky zdůvodnitelné) pro metodu stanovení UDS pomocí LSC.

▼ B**Použití negativních a pozitivních kontrol**

Do každého experimentu se nasadí souběžně pozitivní a negativní (neexponované a/nebo s vehikulem) kontroly v přítomnosti i v nepřítomnosti metabolického aktivačního systému.

Příkladem pozitivní kontroly pro stanovení s hepatocyty potkana je 7,12-dimethylbenzoanthracen (7,12-DMBA) nebo N-(fluoren-2-yl)acetamid (2-AAF). Příkladem pozitivní kontroly pro zavedené buněčné linie jak pro autoradiografii, tak i pro LSC prováděné bez metabolické aktivace je 4-nitrochinolin-N-oxid (4-NQO); N-nitrosodimethylamin je příkladem chemické látky pro pozitivní kontrolu při použití metabolického aktivačního systému.

Expoziční koncentrace

Použije se několik koncentrací zkoušené látky v rozsahu přiměřeném pro stanovení odezvy. Nejvyšší koncentrace musí vyvolávat cytotoxické účinky. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se zkouší až k mezi rozpustnosti. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

Buňky

Pro udržování kultur se použijí vhodná kultivační média, koncentrace CO₂, teplota a vlhkost. U zavedených buněčných linií musí být pravidelně kontrolováno, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty.

Metabolická aktivace

U primárních kultur hepatocytů se nepoužívá metabolický aktivační systém. Zavedené buněčné linie a lymfocyty se exponují zkoušené látce za přítomnosti i nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému.

Postup**Příprava kultur**

Zavedené buněčné linie se pomnoží ze zásobních kultur (trypsinací nebo setřepáním buněk z povrchu kultivační nádoby), naočkují se do kultivačních nádob ve vhodné hustotě a inkubují se při teplotě 37 °C.

Krátkodobé kultury hepatocytů potkana se připravují tak, že se umožní, aby se čerstvě izolované hepatocyty přichytily ve vhodném médiu k povrchu kultivační nádoby.

Kultury lidských lymfocytů se založí vhodnou metodou.

▼B**Expozice kultur zkoušené látky****Primární hepatocyty potkana**

Čerstvě izolované hepatocyty potkana se vhodnou dobu exponují zkoušené látky v médiu obsahujícím $^3\text{H-TdR}$. Po ukončení expozice se médium z buněk odstraní, buňky se promyjí, fixují a vysuší. Preparáty se ponoří do autoradiografické emulze (může být použita také sloupávací fólie), emulze se exponuje, vyvolá, obarví a vyhodnotí.

Zavedené buněčné linie a lymfocyty

Autoradiografické techniky: Buněčné kultury se vhodnou dobu exponují zkoušené látky a poté se vystaví $^3\text{H-TdR}$. Doba expozice je závislá na druhu zkoušené látky, na aktivitě metabolického systému a na typu buněk. K zachycení vrcholu UDS je třeba $^3\text{H-TdR}$ přidat současně se zkoušenou látkou nebo několik minut po expozici. Výběr mezi těmito postupy závisí na možné interakci mezi zkoušenou látkou a $^3\text{H-TdR}$. K rozlišení UDS od semikonzervativní replikace DNA se používá médium deficientní na arginin, nízký obsah séra nebo hydroxymočovina v kultivačním médiu, což působí inhibiči semikonzervativní replikace DNA.

Stanovení UDS pomocí LSC: Před expozicí zkoušené látky se zablokuje vstup buněk do S-fáze, jak bylo uvedeno výše; buňky se poté exponují zkoušené látky způsobem popsaným pro autoradiografii. Na konci kultivace se DNA extrahuje z buněk a stanoví se celkový obsah DNA a rozsah zabudování $^3\text{H-TdR}$.

Použijí-li se ve výše uvedených metodách lidské lymfocyty, je v nestimulovaných kulturách suprese semikonzervativní replikace DNA zbytečná.

Analýza**Vyhodnocení autoradiografie**

Při vyhodnocování UDS v buněčné kultuře se jádra v S-fázi nehodnotí. Pro každou koncentraci se hodnotí nejméně 50 buněk. Preparáty se před hodnocením opatří kódem. V každém preparátu se hodnotí několik náhodně vybraných vzájemně vzdálených polí. Množství zabudovaného $^3\text{H-TdR}$ v cytoplazmě se určí v zóně o velikosti tří jader v cytoplazmě každé hodnocené buňky.

Vyhodnocení LSC

Pro stanovení UDS pomocí LSC se použije přiměřený počet kultur pro každou koncentraci a pro kontroly.

▼ B

Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě.

2.1 VYHODNOCENÍ AUTORADIOGRAFIE

Rozsah zabudování ^3H -TdR do cytoplazmy a počet zrn nalezených mimo buněčné jádro se zaznamenají odděleně.

Distribuci rozsahu zabudování ^3H -TdR do cytoplazmy a počet zrn v jádře lze popsat střední hodnotou, mediánem a mode.

2.2 VYHODNOCENÍ LSC

U LSC se rozsah zabudování ^3H -TdR zaznamená v dpm/ μg DNA. Distribuci zabudování lze popsat střední hodnotou dpm/ μg DNA a směrodatnou odchylkou.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- použité buňky, hustota a počet pasáží v době expozice kultury, počet buněčných kultur,
- metody použité k udržování buněčné kultury, včetně média, teploty a koncentrace CO_2 ,
- zkoušená látka, vehikulum, koncentrace a zdůvodnění výběru koncentrací pro zkoušku,
- podrobné údaje o metabolickém aktivačním systému,
- plán expozice,
- pozitivní a negativní kontroly,
- použitá autoradiografická technika,
- postupy použité k blokování vstupu buněk do S-fáze,
- postupy použité k extrakci DNA a ke stanovení celkového obsahu DNA u metody LSC,
- vztah dávka/odezva, jeli to možné,
- statistické vyhodnocení,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

▼B

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.19 ZKOUŠKA NA VÝMĚNU SESTERSKÝCH CHROMATID *IN VITRO*****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Stanovení výměny sesterských chromatid (SCE) je krátkodobou zkouškou zaměřenou na detekci reciproční výměny DNA mezi dvěma sesterskými chromatidami replikujícího se chromozomu. SCE představuje vzájemnou výměnu produktů replikace DNA v lokusech jevících se jako homogenní. Proces výměny pravděpodobně zahrnuje zlom a opětovné spojení DNA, ačkoliv zatím existuje málo znalostí o molekulárním základu tohoto procesu. Detekce SCE vyžaduje rozdílné značení sesterských chromatid; toho se dosahuje zabudováním bromdeoxyuridinu (BrdU) do chromosomální DNA na dobu dvou buněčných cyklů.

Savčí buňky *in vitro* se exponují zkoušené látce podle potřeby za přítomnosti i nepřítomnosti savčího vnějšího metabolického aktivčního systému a kultivují se po dobu dvou replikačních cyklů v médiu obsahujícím BrdU. Ke konci kultivace se buňky zpracují inhibitorem dělicího vřetenka (např. kolchicinem), aby se akumulovaly buňky v C-metafázi mitózy; kultury se sklídí a připraví se preparáty pro analýzu chromozomů.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1 Příprava**

— Pro stanovení se mohou používat primární kultury (lidské lymfocyty) nebo zavedené buněčné linie (např. ovariální buňky křečka čínské). U buněk musí být pravidelně kontrolováno, zda nejsou kontaminovány mykoplasmaty.

— Použijí se vhodná kultivační média a inkubační podmínky (teplota, kultivační nádoby, koncentrace CO₂ a vlhkost).

— Před exponováním buněk se zkoušené látky rozpustí nebo suspendují v kultivačním médiu nebo ve vhodných vehikulech. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivnit životaschopnost buněk nebo rychlost růstu; vliv na četnost SCE se sleduje kontrolou s rozpouštědlem.

▼ B

- Buňky se exponují zkoušené látce jak v přítomnosti, tak v nepřítomnosti vnějšího savčího metabolického aktivačního systému. Pokud se použijí buněčné typy s vnitřní metabolickou aktivitou, mělo by být známo, že úroveň a vlastnosti této aktivity jsou vhodné pro zkoušenou třídu chemických látek.

1.6.2 *Zkušební podmínky***Počet kultur**

Pro každý experimentální bod se použijí nejméně dvě kultury.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí pozitivní kontroly využívající jak přímo působící chemickou látku, tak látku vyžadující metabolickou aktivaci; rovněž se použije kontrola s vehikulem.

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

- přímo působící látky:
 - ethyl-methansulfonát,
- nepřímo působící látky:
 - cyklofosfamid.

Podle potřeby se zařadí další pozitivní kontrola ze stejné třídy chemických látek, jako je zkoušená látka.

Expoziční koncentrace

Zkoušejí se nejméně tři dostatečně odstupňované koncentrace zkoušené látky. Nejvyšší koncentrace musí vyvolat významné toxické účinky, avšak zároveň musí umožnit přiměřenou replikaci buněk. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se zkouší až k mezi rozpustnosti za použití vhodných postupů. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

1.6.3e *Postup***Příprava kultur**

Zavedené buněčné linie se pomnoží ze zásobní kultury (např. trypaninací nebo setřepáním buněk z povrchu kultivační nádoby), naočkují se do kultivačních nádob ve vhodné hustotě a inkubují se při teplotě 37 °C. Pro jednovrstevné kultury se stanoví takový počet buněk v kultivační nádobě, aby v době sklizně nepřesáhly 50 % konfluenci. Lze také použít suspenzní kultury. Lidské lymfocytární kultury se připraví vhodnými postupy z heparinované krve a inkubují při teplotě 37 °C.

▼B**Expozice**

Buňky v exponenciální fázi růstu se vhodnou dobu exponují zkoušené látce; ve většině případů stačí jedna až dvě hodiny, avšak expozice může být v určitých případech prodloužena až na dva úplné buněčné cykly. Buňky, které nemají dostatečnou vnitřní metabolickou aktivitu, musí být exponovány zkoušené chemické látce za přítomnosti i za nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Na konci expoziční doby se z buněk vymyje zkoušená látka a buňky se kultivují v přítomnosti BrdU po dva replikační cykly. Je možné rovněž exponovat buňky současně zkoušené látce a BrdU po dobu dvou buněčných cyklů.

Lidské lymfocytární kultury se exponují, dokud jsou v semisynchronizovaném stavu.

Buňky se analyzují v druhém mitotickém dělení po expozici, přičemž se zajistí, aby expozice chemické látky proběhla v nejcitlivějším stádiu buněčného cyklu. Všechny kultury s přidaným BrdU se udržují až do sklizně v temnu nebo za slabého osvětlení žárovkou, aby se minimalizovala fotolýza DNA, ve které je zabudován BrdU.

Sklizeň buněk

Jednu až čtyři hodiny před sklizní buněk se kultury zpracují inhibitorem dělicího vřetenka (např. kolchicinem). Každá kultura se sklídí a samostatně zpracuje pro přípravu preparátů pro analýzu chromosomů.

Příprava preparátů pro analýzu chromosomů a barvení

Preparáty pro analýzu chromosomů se připraví standardními cytogenetickými technikami. Barvení preparátů ke znázornění SCE lze provést několika technikami (např. fluorescenční metodou plus Giemsa).

Analýza

Počet analyzovaných buněk závisí na spontánní četnosti SCE v kontrole. Obvykle se hodnotí nejméně 25 dobře rozprostřených metafází na kulturu. Preparáty se před analýzou opatří kódem. V lidských lymfocytech se analyzují pouze metafáze s 46 centromerami. U zavedených linií se analyzují pouze metafáze, které se liší o ± 2 centromery od modálního počtu centromer. Je třeba stanovit, zda se za SCE považuje změna v barvení v oblasti centromery. Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě. Pro všechny exponované kultury a kontroly se samostatně zaznamená počet SCE pro každou metafázi a počet SCE/chromosom pro každou metafázi.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

▼B**3. ZPRÁVY****3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- použité buňky, metody udržování buněčné kultury,
- zkušební podmínky: složení média, koncentrace CO₂, koncentrace zkoušené látky, použité vehikulum, inkubační teplota, inkubační doba, délka expozice, použitý inhibitor mitózy, jeho koncentrace a délka jeho působení, typ použitého savčího metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly,
- počet kultur na každý experimentální bod,
- podrobné údaje o způsobu přípravy preparátů,
- počet analyzovaných metafází (odděleně pro každou kulturu),
- střední hodnota počtu SCE/buňku a SCE/chromosom (odděleně pro každou kulturu),
- kritéria hodnocení SCE,
- zdůvodnění výběru koncentrací,
- vztah dávka/odezva, jeli to možné,
- statistické vyhodnocení,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼ B**B.20 ZKOUŠKA NA RECESIVNÍ LETÁLNÍ MUTACE VÁZANÉ NA POHLAVÍ U *DROSOPHILA MELANOGASTER*****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na recesivní letální mutace vázané na pohlaví (SLRL) u *Drosophila melanogaster* umožňuje detekci mutací, a to jak bodových mutací, tak i malých delecí v zárodečných buňkách hmyzu. Tato zkouška je zkouškou na přímé mutace vhodnou pro screening v přibližně 800 lokusech chromosomu X; to představuje asi 80 % všech lokusů chromosomu X. Chromosom X představuje přibližně jednu pětinu celého haploidního genomu.

Mutace v chromosomu X *Drosophila melanogaster* se fenotypicky projeví u samců nesoucích mutovaný gen. Když je mutace letální v hemizygotním stavu, lze na její přítomnost usuzovat z absence jednoho ze dvou typů samčích potomků, kteří se obvykle rodí heterozygotní samici. Ve zkoušce na SLRL se tyto skutečnosti využívají prostřednictvím speciálně označených a uspořádaných chromosomů.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY*Příprava***Zdroje**

Mohou být použiti samci dobře definované divoké linie a samice linie Muller-5. Mohou být použity i jiné vhodně značené linie samic s vícenásobnou inverzí chromosomu X.

Zkoušená látka

Zkoušené látky se rozpustí ve vodě. Látky, které jsou nerozpustné ve vodě, se mohou rozpustit nebo suspendovat ve vhodných vehikulech (např. ve směsi ethanolu a Tween-60 nebo 80) a před aplikací se dále ředí vodou nebo fyziologickým roztokem. Použití dimethylsulfoxidu (DMSO) jako vehikula je třeba se vyhnout.

▼ B**Počet zvířat**

Citlivost a síla zkoušky se stanoví předem. Četnost spontánních mutací pozorovaná v příslušné kontrolní skupině významně ovlivní počet exponovaných chromosomů, které je třeba analyzovat.

Způsob podávání

Expozice zkoušené látky může být orální, injekční nebo může jít o expozici plynům nebo parám. Při orální aplikaci (zkrmování) se zkoušená látka podává v cukerném roztoku. Podle potřeby lze zkoušenou látku rozpustit v 0,7 % roztoku NaCl a injekčně nastříknout do hrudní nebo břišní dutiny.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Nasadí se negativní kontroly (s vehikulem) a pozitivní kontroly. Jsou-li k dispozici vhodné laboratorní údaje z dřívějších pokusů s kontrolami, není třeba nasazovat žádné souběžné kontroly.

Úrovně expozice

Použijí se tři úrovně expozice. Pro předběžný orientační odhad se použije jedna úroveň expozice rovnající se buď maximální tolerované koncentraci, nebo úrovni vyvolávající známky toxicity. U netoxických látek se použije nejvyšší dosažitelná koncentrace.

Postup

Samci divokého typu (ve stáří 3–5 dnů) se exponují zkoušené látce a jednotlivě jsou připouštěni k více dosud nepřipuštěným samicím z linie Muller-5 nebo z jiné vhodně značené linie (s vícenásobnou inverzí chromosomu X). Samice se vymění za čerstvé dosud nepřipuštěné samice každé dva až tři dny, aby se pokryl celý buněčný cyklus zárodečných buněk. U potomků těchto samic se sleduje letální účinek odpovídající účinkům na zralé spermie, na spermatidy ve středním nebo pozdním stadiu, na časně spermatidy, spermatocyty a spermatogonie v době expozice.

Heterozygotní samice generace F_1 narozené z tohoto křížení se dále kříží jednotlivě (tj. jedna samice/zkumavku) se svými bratry. V generaci F_2 se v každé kultuře zaznamená absence samců divokého typu. Jestliže se v kultuře F_1 rodí samice nesoucí letální mutaci v rodičovském chromosomu X (tj. nejsou nalezeni žádní samci s ovlivněným chromosomem), testují se dcery těchto samic se stejným genotypem, aby se zjistilo, zda se letalita opakuje v příští generaci.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě; uvede se počet hodnocených chromosomů X, počet afertilních samců a počet chromosomů s letální mutací pro každou koncentraci, pro každé období křížení a pro každého exponovaného samce. Zaznamenává se počet klastrů různých velikostí na každého samce. Výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

▼B

Zkouška na recesivní letální mutace vázané na pohlaví se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami. Nahromadění recesivních letálních mutací vzniklých v jednom samci se zpracuje a zhodnotí vhodným statistickým způsobem.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- zdroje: použité linie nebo kmeny druhu *Drosophila*, věk hmyzu, počet exponovaných samců, počet sterilních samců, počet vzniklých kultur F₂, počet kultur F₂ bez potomků, počet zjištěných chromosomů nesoucích letální mutaci v každém stadiu zárodečných buněk,
- kritéria pro velikost exponovaných skupin,
- podmínky zkoušky: podrobný popis plánu expozice a odběru vzorků, úroveň expozice, údaje o toxicitě, podle potřeby negativní kontroly (s rozpouštědlem) a pozitivní kontroly,
- kritéria hodnocení letálních mutací,
- vztah expozice/účinek, jeli to možné,
- hodnocení údajů,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼ B**B.21 ZKOUŠKY NA TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK *IN VITRO*****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Kultury savčích buněk lze použít pro detekci fenotypických změn *in vitro* indukovaných chemickými látkami spojovanými s maligní transformací *in vivo*. Často používanými buňkami jsou C3H10T_{1/2}, 3T3, SHE, buňky potkanů Fischer a zkouška se opírá o změny buněčné morfolgie, tvorbu ložisek nebo změny v uchycení v polotuhém agaru. Méně často se používají systémy detekující ostatní fyziologické či morfologické změny v buňkách po expozici karcinogenním chemickým látkám. Žádný výsledek zkoušky *in vitro* není důkazem karcinogenity. Některé systémy jsou schopny detekovat promotory tumorů. Cytotoxicita se zjistí měřením účinku zkoušeného materiálu na schopnost vytvářet kolonie (účinnosti klonování) nebo rychlosti růstu kultur. Stanovením cytotoxicity lze zjistit, zda byla expozice zkoušené látky toxikologicky relevantní, nelze ji však použít k určení četnosti transformace ve všech experimentech, protože u některých mohlo dojít k prodloužení inkubace nebo k replatingu.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanoveny.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY*Příprava***B u ň k y**

Pro různé zkoušky transformace existuje řada použitelných buněčných linií a primárních kultur. Experimentátor musí zajistit, že buňky použité v testu transformace vykazují příslušné fenotypické změny po expozici známým karcinogenům a že zkouška používaná v jeho laboratoři je ověřena a že je dokumentována její validita a spolehlivost.

M é d i u m

Použitá média a experimentální podmínky musí být vhodné pro použitou zkoušku na transformace.

▼B**Zkoušená látka**

Před exponováním buněk je možné zkoušené látky rozpustit nebo suspendovat v kultivačním médiu nebo ve vhodných vehikulech. Konečná koncentrace vehikula v kultuře nesmí ovlivnit životaschopnost buněk, rychlost růstu nebo výskyt transformace.

Metabolická aktivace

Buňky by měly být vystaveny zkoušené látce, a to s vhodnou metabolickou aktivací a bez ní. Pokud se použijí buněčné typy s vnitřní metabolickou aktivitou, mělo by být známo, že úroveň a vlastnosti této aktivity jsou vhodné pro zkoušenou třídu chemických látek.

*Zkušební podmínky***Použití negativních a pozitivních kontrol**

Do každého experimentu se nasadí pozitivní kontroly využívající jak přímo působící chemickou látku, tak látku vyžadující metabolickou aktivaci; rovněž se použije kontrola s vehikulem.

Příkladem pozitivní kontroly mohou být tyto látky:

— přímo působící látky:

— ethyl-methansulfonát,

— propano-3-lakton,

— látky vyžadující metabolickou aktivaci:

— N-(fluoren-2-yl)acetamid,

— 4-dimethylaminoazobenzen,

— 7,12-dimethylbenzoanthracen.

Podle potřeby se zařadí další pozitivní kontrola ze stejné třídy chemických látek, jako je zkoušená látka.

Expoziční koncentrace

Použije se několik koncentrací zkoušené látky. Tyto koncentrace musí vyvolávat toxický účinek závislý na koncentraci, přičemž nejvyšší koncentrace má vést k nízké úrovni přežití buněk a úroveň přežití buněk při nejnižší koncentraci má být přibližně stejná jako u negativní kontroly. Látky, které jsou relativně nerozpustné ve vodě, se zkouší až k mezi rozpustnosti za použití vhodných postupů. Nejvyšší koncentrace u netoxických látek dobře rozpustných ve vodě se určí případ od případu.

▼ B*Postup*

Buňky se exponují dostatečnou dobu v závislosti na použitém zkušebním systému; při delší expozici může být nezbytná opakovaná expozice spojená s výměnou média (a podle potřeby s výměnou čerstvé metabolické aktivační směsi). Buňky, které nemají dostatečnou vnitřní metabolickou aktivitu, musí být exponovány zkoušené chemické látky za přítomnosti i za nepřítomnosti vhodného metabolického aktivačního systému. Na konci expoziční doby se z buněk vymyje zkoušená látka a buňky se kultivují za vhodných podmínek, aby se mohl projevit sledovaný transformovaný fenotyp; poté se zaznamená výskyt transformace. Všechny výsledky se potvrdí nezávislým experimentem.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě; podle použité zkoušky jimi mohou být např. počet misek, počet misek s transformací nebo počet transformovaných buněk. Podle potřeby se přežití buněk vyjádří v procentech přežití v kontrolní kultuře a četnost transformací se vyjádří jako podíl transformovaných buněk a životaschopných buněk. Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- typ použitých buněk, počet buněčných kultur, metody udržování buněčných kultur,
- zkušební podmínky: koncentrace zkoušené látky, použité vehikulum, doba inkubace, délka a frekvence expozice, hustota buněk během expozice, typ použitého vnějšího metabolického aktivačního systému, pozitivní a negativní kontroly, specifikace sledovaného fenotypu, použitý selekční systém (podle potřeby), zdůvodnění výběru koncentrací,
- metody počítání životaschopných a transformovaných buněk,
- statistické vyhodnocení,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.22 DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dominantní letální účinky způsobují embryonální nebo fetální smrt. Indukce dominantních letálních mutací po expozici chemické látky dokazuje, že tato látka poškozuje zárodečné tkáně zkušebního druhu. Obecně se má za to, že dominantní letální mutace jsou způsobeny poškozením chromosomů (strukturní a numerické abnormality). Smrt embrya exponované samice může být také výsledkem toxických účinků.

Samci jsou zpravidla exponováni zkoušené látce a páření s neexponovanými, dosud nepřipuštěnými samicemi. Různá stadia zárodečných buněk mohou být testována odděleně použitím po sobě jdoucích intervalů páření. Nárůst mrtvých implantací na samici v exponované skupině nad počet mrtvých implantací na samici v kontrolní skupině odpovídá postimplantačním ztrátám. Preimplantační ztráty se hodnotí na základě počtu žlutých tělísek nebo porovnáním všech implantací na samici v exponované a kontrolní skupině. Celková dominantní letalita je součtem preimplantačních a postimplantačních ztrát. Výpočet celkové dominantní letality je založen na porovnání počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací na samici v kontrolní skupině. Snížení počtu implantací v některých intervalech může být způsobeno zánikem buněk (tj. spermatocytů a/nebo spermatogonií).

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanoveny.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY*Příprava*

Zkoušená látka se pokud možno rozpustí nebo suspenduje v isotonicím fyziologickém roztoku. Látky, které jsou nerozpustné ve vodě, se mohou rozpustit nebo suspendovat ve vhodných vehikulech. Použití vehikulum nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani vyvolávat toxické účinky. Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky.

▼ B*Zkušební podmínky***Způsob podávání**

Zkoušená látka se obvykle podává pouze jednou. Na základě toxikologických informací lze podávat látku opakovaně. Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

Pokusná zvířata

Jako zkušební druh se doporučuje potkan nebo myš. Provede se náhodný výběr zdravých, pohlavně dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

Počet a pohlaví

Použije se dostatečný počet exponovaných samců s ohledem na spontánní variabilitu hodnocené biologické charakteristiky. Počet se zvolí s ohledem na předem stanovenou citlivost detekce a statistickou významnost. V typické zkoušce se například volí takový počet samců v každé exponované skupině, aby bylo dosaženo 30–50 březích samic na dobu připouštění.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Do každého experimentu se nasadí souběžné pozitivní a negativní kontroly (neexponované s vehikulem). Jestliže jsou k dispozici přijatelné výsledky pozitivní kontroly z nedávných experimentů provedených v téže laboratoři, mohou být použity namísto souběžných pozitivních kontrol. Látky pro pozitivní kontroly se za účelem prokázání citlivosti zkoušky použijí ve vhodných nízkých dávkách (např. MMS, intraperitoneálně, 10 mg/kg).

Úrovně dávek

Obvykle se použijí tři úrovně dávek. Nejvyšší dávka má u exponovaných zvířat vyvolat známky toxicity nebo snížené fertility. V některých případech může být postačující jedna vysoká dávka.

Limitní zkouška

Netoxické látky se podávají v množství 5 g/kg při jednorázovém podávání nebo v dávce 1 g/kg na den při opakovaném podávání.

Postup

Existuje několik plánů expozice. Nejčastěji se používá jednorázové podávání. Mohou však být použity jiné plány expozice.

Jeden samec je opakovaně křížen s jednou nebo dvěma neexponovanými, dosud nepřipouštěnými samicemi ve vhodných intervalech po expozici. Samice musí být u samců ponechány nejméně po dobu trvání jednoho estrálního cyklu, nebo dokud nedojde ke spáření prokázanému spermii ve vagině nebo přítomností vaginální zátky.

▼ B

Počet páření po expozici je dán plánem expozice a musí být dostatečný, aby zahrnul všechna stádia zárodečných buněk po expozici.

Samice se utratí v druhé polovině březosti a obsah dělohy se vyšetří za účelem určení počtu mrtvých a živých implantací. Vaječníky mohou být vyšetřeny k určení počtu žlutých tělísek.

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě a uvede se počet samců, počet březích samic a počet nezabřezlých samic. Samostatně se uvedou výsledky každého páření, včetně identifikace každého samce a samice. Pro každou samici se zaznamená týden páření, dávka, kterou obdržel samec, počet živých a mrtvých implantací.

Výpočet celkového dominantního letálního účinku je založen na porovnání počtu živých implantací na samici v exponované skupině s počtem živých implantací na samici v kontrolní skupině. Srovnání poměru mrtvých implantací k živým implantacím v exponované skupině a téhož poměru v kontrolní skupině vypovídá o postimplantačních ztrátách.

Zaznamenávají-li se údaje o časně a pozdní letalitě, musí být v tabulkách jasně odlišeny. Odhadují-li se také preimplantační ztráty, uvedou se. Preimplantační ztráty mohou být vypočítány jako rozdíl mezi počtem žlutých tělísek a počtem implantací nebo jako snížení průměrného počtu implantací na dělohu ve srovnání s kontrolou.

Údaje se vyhodnotí vhodnými statistickými metodami.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- druh, kmen, věk a hmotnost zvířat, počet zvířat každého pohlaví v exponovaných a kontrolních skupinách,
- zkoušená látka, vehikulum, zkoušené úrovně dávek a důvody jejich výběru, negativní a pozitivní kontroly, údaje o toxicitě,
- způsob podání a plán expozice,
- plán páření,
- metody průkazu spáření,
- doba usmrcení,
- kritéria pro hodnocení dominantních letálních účinků,
- vztah dávka/odezva, jeli to možné,

▼B

- statistické vyhodnocení,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.23 ZKOUŠKA NA CHROMOSOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 483 – Zkouška na chromosomové aberace ve spermatogoniích savců (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem zkoušky na chromosomové aberace ve spermatogoniích savců *in vivo* je identifikovat takové látky, které způsobují strukturní chromosomové aberace ve spermatogoniích savců (1, 2, 3, 4, 5). Rozlišují se dva typy strukturních aberací: chromosomové a chromatidové. U většiny chemických mutagenů jsou indukované aberace chromatidového typu, avšak chromosomové aberace se rovněž vyskytují. Tato metoda však není určena ke stanovení numerických aberací a není k tomuto účelu rutinně používána. Chromosomové mutace a podobné jevy jsou příčinou mnoha geneticky podmíněných chorob u člověka.

Touto zkouškou se stanovují chromosomové změny ve spermatogoniích a předpokládá se tedy, že tato zkouška poskytne předpověď indukce dědičných mutací v germinálních buňkách.

Při této zkoušce jsou rutinně používáni hlodavci. Touto cytogenetickou zkouškou *in vivo* se detekují chromosomové aberace při mitóze spermatogonií. Jiné cílové buňky nejsou předmětem této zkoušky.

Pro detekci aberací chromatidového typu ve spermatogoniích by mělo být – dříve než dojde ke ztrátě léze – vyšetřeno první mitotické buněčné dělení, které následuje po aplikaci. Další informace z exponovaných spermatogoniálních kmenových buněk lze získat meiotickou chromosomovou analýzou aberací chromosomového typu v diakinése-metafázi I, kdy se exponované buňky stávají spermatocyty.

Tato zkouška *in vivo* je navržena pro vyšetření, zda jsou mutageny somatických buněk aktivní také v germinálních buňkách. Navíc je tato zkouška se spermatogoniemi významná pro posouzení nebezpečí mutagenese, neboť umožňuje zohlednit faktory metabolismu *in vivo* farmakokinetiku a procesy reparace DNA.

Ve varlatech je přítomna řada generací spermatogonií s různou citlivostí na expozici chemické látky. Detekované aberace tedy představují souhrnnou odpověď exponované populace spermatogonií s převládajícími diferencovanými spermatogoniemi. V závislosti na své poloze ve varlatech mohou nebo nemusí být různé generace spermatogonií exponovány celkovému krevnímu oběhu v důsledku fyzikální a fyziologické bariéry Sertoliho buněk a bariéry mezi krevním oběhem a varlaty.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nebo reaktivní metabolity nedostanou do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Viz také obecný úvod, část B.

▼ B

1.2 DEFINICE

Chromatidová aberace: strukturální poškození chromozomu v podobě zlomu jednotlivých chromatid nebo zlomu a opětného spojení chromatid.

Chromozomová aberace: strukturální poškození chromozomu v podobě zlomu nebo zlomu a spojení obou chromatid v totéž místě.

Gap: achromatická léze menší než šířka jedné chromatidy a s minimální odchylkou chromatid.

Numerická aberace: odchylka počtu chromosomů od normální hodnoty u použitého typu buněk.

Polyploidie: násobek haploidního počtu chromosomových sad (n) jiný než diploidní (tj. $3n$, $4n$ atd.).

Strukturální aberace: mikroskopicky pozorovatelné změny struktury chromosomů při buněčném dělení ve stadiu metafáze; jeví se jako delece a fragmenty, intrachromosomální nebo interchromosomální změny.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zvířata jsou vhodným způsobem exponována zkoušené látce a po vhodné době po expozici usmrcena. Před usmrcením se zvířatům podá látka zastavující metafázi (např. kolchicin nebo Colcemid®). Z germinálních buněk se poté připraví preparáty chromosomů, obarví se a analyzují se chromosomové aberace metafázujících buněk.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Přípravky

1.4.1.1 *Výběr druhu zvířete*

Běžně jsou používáni samci křečka čínské a myši; lze však použít samce jakéhokoli jiného vhodného druhu savce. Použity by měly být běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých pohlavně dospělých zvířat. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

1.4.1.2 *Podmínky chovu a strava*

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

1.4.1.3 *Příprava zvířat*

Zdraví mladí pohlavně dospělí samci se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv jejich polohy minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují. Před započítáním studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

▼ B1.4.1.4 *Příprava dávek*

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalné zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 **Zkušební podmínky**1.4.2.1 *Rozpouštědlo/vehikulum*

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých hladinách dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každého experimentu by měly být pozitivní a negativní (rozpouštědlo/vehikulum) kontroly. S výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit identický proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivní kontroly by měly poskytovat strukturní aberace ve spermatogoniích *in vivo* při expozičních úrovních, u nichž se předpokládá, že poskytnou detekovatelný nárůst nad pozadí.

Dávky pozitivní kontroly by měly být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo kódovaná identifikace preparátu. Je přijatelné, aby byla pozitivní kontrola podávána jiným způsobem než zkoušená látka a aby byl odběr v jejím případě prováděn jen jednou. Pro pozitivní kontrolu navíc může být vzato v úvahu použití chemických látek ze stejné chemické třídy, jsou-li k dispozici. Příklady látek pro pozitivní kontrolu:

Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
cyklofosfamid monohydrát	6055-19-2	
cyklohexylamin	108-91-8	203-629-0
mitomycin C	50-07-7	200-008-6
akrylamid (monomer)	79-06-1	201-173-7
2,4,6-tris(aziridin-1-yl)-1,3,5-triazin	51-18-3	200-083-5

V okamžiku každého odběru by měl být proveden odběr u skupiny negativní kontroly, které je aplikováno pouze rozpouštědlo nebo vehikulum a která jinak podstupuje stejný proces jako exponované skupiny, pokud nejsou z dosavadních kontrolních údajů k dispozici přijatelné údaje o variabilitě zvířat a četnosti buněk s chromosomovými aberacemi. Kromě toho by měly být neexponované kontroly použity také tehdy, neexistují-li dosud kontrolní údaje prokazující, že zvolené rozpouštědlo/vehikulum nevyvolává žádné zhoubné nebo mutagenní účinky.

▼ B

1.5 POSTUP

1.5.1 **Počet zvířat**

Každá exponovaná i kontrolní skupina musí zahrnovat alespoň pět analyzovatelných samců.

1.5.2 **Plán expozice**

Zkoušené látky by měly být pokud možno podávány jednorázově nebo nadvakrát (tj. při jedné expozici nebo dvou expozicích). Zkoušené látky mohou být podávány také ve dvou dávkách, tzn. dvě dávky v týž den v rozmezí ne více než několika hodin, aby bylo usnadněno podávání velkých objemů materiálu. Jiné režimy podávání by měly být vědecky zdůvodněny.

Ve skupině s nejvyšší dávkou by měly být po expozici provedeny dva odběry. Poněvadž kinetika buněčného cyklu může být zkoušenou látkou ovlivněna, provede se jeden časný odběr a jeden pozdější odběr přibližně 24 hodin a 48 hodin po expozici. V případě jiné než nejvyšší dávky by měl být odběr proveden po 24 hodinách nebo po takové době expozice, která odpovídá 1,5 násobku délky buněčného cyklu, pokud není známa jiná vhodnější doba pro detekci účinku (6).

Navíc mohou být odběry provedeny také v jiné době. Například v případě chemických látek, které mohou indukovat opoždění replikace (lagging) chromosomů nebo mohou způsobovat S-nezávislé účinky, může být vhodnější časnější odběr (1).

Vhodnost plánu opakované expozice musí být určena případ od případu. V případě plánu s opakovanou expozicí by měla být zvířata usmrcena 24 hodin (1,5násobek délky cyklu) po poslední expozici. Podle potřeby mohou být prováděny další odběry v jiné době.

Před usmrcením se zvířatům intraperitoneálně podá vhodná dávka látky zastavující metafázi (např. Colcemid® nebo kolchicin). Poté se po vhodné době provede u zvířat odběr. U myši je tato doba přibližně 3–5 hodin; u křečka čínského je tato doba přibližně 4–5 hodin.

1.5.3 **Dávkování**

Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem a kmenem a za stejného režimu expozice, který se použije v hlavní studii (7). V případě toxicity se pro první odběr použijí tři úrovně dávků. Tyto úrovně dávků by měly pokrývat rozpětí dané maximální a minimální toxicitou, případně žádnou toxicitou. Při pozdějším odběru stačí, když bude použita pouze nejvyšší dávka. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly při stejném režimu dávkování podle očekávání k letalitě.

▼ B

Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Nejvyšší dávka může být také definována jako dávka vyvolávající ve spermatogoniích některé známky toxicity (např. snížení počtu spermatogonií v mitose vzhledem k první a druhé meiotické metafázi; toto snížení by nemělo překročit 50 %).

1.5.4 Limitní zkouška

Jestliže zkouška s jednou dávkou alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nepovažuje se úplná studie se třemi úrovněmi dávky za nezbytnou. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 Podávání dávek

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou, nebo intraperitoneální injekcí. Jiné způsoby podávání jsou v odůvodněných případech přijatelné. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán nitrožaludečně nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, u kterých se ve vyšších koncentracích stupňují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

1.5.6 Příprava preparátů pro analýzu chromosomů

Okamžitě po usmrcení se z jednoho nebo obou varlat získá buněčná suspenze, hypotonizuje se a fixuje. Poté se nanese na podložní sklíčka a obarví se.

1.5.7 Analýza

U každého zvířete by mělo být analyzováno alespoň 100 buněk v dobře rozprostřené metafázi (tj. minimálně 500 metafází na skupinu). Tento počet lze snížit, je-li pozorován velký počet aberací. Všechny preparáty, včetně preparátů pozitivních a negativních kontrol, by měly být před analýzou pod mikroskopem nezávisle kódovány. Poněvadž při fixaci často dochází ke chromosomálním zlomům nebo ztrátě chromosomů u částí metafází, měly by vyšetřované buňky obsahovat centromery v počtu odpovídajícím číslu $2n \pm 2$.

2 ÚDAJE**2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Údaje pro jednotlivá zvířata by měly být zpracovány ve formě tabulky. Experimentální jednotkou je zvíře. Pro každé zvíře by měl být vyhodnocen počet buněk se strukturními chromosomovými aberacemi a počet chromosomových aberací na buňku. Pro exponované a kontrolní skupiny by měly být uvedeny různé typy strukturních chromosomových aberací s jejich počtem a četností. Gapy se zaznamenávají odděleně a uvádějí se, ale nezahnují se do celkové četnosti aberací.

▼B

Je-li pozorována mitosa a také meiosa, měl by být pro stanovení možných cytotoxických účinků jako míra cytotoxicity stanoven u všech exponovaných zvířat a zvířat sloužících jako negativní kontrola poměr spermatogonií v mitose vzhledem k první a druhé meiotické metafázi, a to v celkovém vzorku 100 dělicích se buněk na jedno zvíře. Pokud je sledována pouze mitosa, nejméně v 1 000 buňkách na zvíře by měl být stanoven mitotický index.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pro stanovení pozitivního výsledku existuje několik kritérií, např. nárůst relativního počtu buněk s chromozomovými aberacemi v závislosti na dávce nebo jasný nárůst počtu buněk s aberacemi pro skupinu s určitou dávkou a k určitému okamžiku odběru. Nejdříve by měla být uvážena biologická relevance výsledků. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody (8). Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď. Dvojnásobné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením, nejlépe s úpravami experimentálních podmínek.

Zkoušená látka, jejíž výsledky nespĺňují výše uvedená kritéria, se v tomto systému považuje za nemutagenní.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojnásobné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na chromosomové aberace ve spermatogoniích savců *in vivo* znamenají, že zkoušená látka indukuje v germinálních buňkách testovacího druhu strukturní chromosomové aberace. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje v germinálních buňkách testovacího druhu chromosomové aberace.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka nebo její metabolity dostanou do cílové tkáně.

3. ZPRÁVY

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet a stáří zvířat,
- zdroj, podmínky chovu, strava atd.,
- individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

▼ B

Zkušební podmínky:

- údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,
- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- údaje o přípravě zkoušené látky,
- údaje o podávání zkoušené látky,
- zdůvodnění dob usmrcení,
- případně přepočet mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),
- podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,
- podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,
- metody stanovení toxicity,
- identifikace látky zastávající metafázi, její koncentrace a délka aplikace,
- metody přípravy preparátů,
- kritéria hodnocení aberací,
- počet analyzovaných buněk na jedno zvíře,
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojnásobnou.

Výsledky:

- známky toxicity,
- mitotický index,
- poměr spermatogonií v mitose vzhledem k první a druhé metafázi meiosis,
- typ a počet aberací uvedený samostatně pro každé zvíře,
- celkový počet aberací ve skupině,
- počet buněk s aberacemi ve skupině,
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- případně statistické analýzy,
- údaje o souběžné negativní kontrole,
- dosavadní údaje o negativní kontrole s rozpětími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- údaje o souběžné pozitivní kontrole,
- změny ploidie, pokud byly pozorovány.

Rozbor výsledků.

Závěry.

▼B4. **LITERATURA**

- 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, s. 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, s. 275–306.
- 3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289–294.
- 4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115–141.
- 5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207–209.
- 6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313–318.
- 7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, 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, 313–319.
- 8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R. K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 184–232.

▼B**B.24 SPOT TEST NA MYŠÍCH****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část E.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část E.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Jedná se o zkoušku na myších *in vivo*, při níž jsou vyvíjející se embrya exponována chemickým látkám. Cílovými buňkami u vyvíjejících se embryí jsou melanoblasty a cílovými geny jsou geny kontrolující pigmentaci srsti. Vyvíjející se embrya jsou heterozygotní pro řadu genů ovlivňujících barvu srsti. Mutace nebo ztráta (při různých genetických událostech) dominantní alely v genu melanoblastu je vyjádřena recesivním fenotypem v dceřiných buňkách vytvářejících skvrnu (spot) pozměněné barvy srsti narozené myši. Počet potomků s těmito skvrnami, mutacemi, se zaznamená a jejich četnost se porovná s četností u potomků exponovaných pouze rozpouštědlu. Spot test na myších detekuje předpokládané somatické mutace v embryonálních buňkách.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY*Příprava*

Zkoušené chemické látky se pokud možno rozpustí nebo suspendují v isotonickém fyziologickém roztoku. Látky, které jsou nerozpustné ve vodě, se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vehikulech. Použité vehikulum nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani vyvolávat toxické účinky. Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky.

Pokusná zvířata

Myši kmene T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, c^{chp}/c^{chp} ; brown, b/b; dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) se zkříží buď s kmenem HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl pe/pe), nebo s kmenem C57BL (nonagouti, a/a). Mohou být použita i jiná křížení za předpokladu, že budou vznikat nonagouti potomci, např. křížení mezi kmenem NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) a DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute d/d).

▼B**Počet a pohlaví**

Použije se dostatečný počet březích samic, aby byl zajištěn dostatečný počet živých potomků pro každou použitou úroveň dávky. Vhodná velikost vzorku závisí na počtu skvrn pozorovaných u exponovaných myší a na rozsahu kontrolních údajů. Negativní výsledky jsou přijatelné pouze tehdy, bylo-li hodnoceno nejméně 300 potomků samic exponovaných nejvyšší dávkou.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Měly by být k dispozici souběžné kontrolní údaje od myší exponovaných pouze vehikulu (negativní kontroly). Ke zvýšení citlivosti testu mohou být použity kontrolní údaje z dřívějších pokusů provedených v téže laboratoři za předpokladu, že jsou homogenní. Není-li u zkoušené látky zjištěna mutagenita, měly by být k dispozici údaje z pozitivních kontrol, které byly tímto testem získány v poslední době v téže laboratoři při expozici chemické látky se známou mutagenitou.

Způsob podávání

Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce březí myši. Podle potřeby se expozice provede inhalací nebo jiným vhodným způsobem.

Úroveň dávek

Použijí se alespoň dvě úrovně dávek, z nichž jedna vyvolává známky toxicity nebo vede ke zmenšení velikosti vrhu. U netoxických látek se použije maximální dosažitelná koncentrace.

Postup

Zvířata se obvykle exponují pouze jednou v 8., 9., nebo 10. dni březosti, přičemž se za 1. den březosti považuje den, kdy byla zjištěna vaginální zátka. Tyto dny odpovídají 7,25, 8,25 a 9,25 dne po koncepci. Během těchto dnů lze provést postupné expozice.

Analýza

U mláďat se mezi třetím a čtvrtým týdnem po vrhu spočítá a zaznamená počet skvrn. Rozlišují se tři kategorie skvrn:

- a) bílé skvrny o průměru 5 mm ve střední ventrální linii, u nichž se předpokládá, že vznikly zánikem buněk (WMVS);
- b) žluté skvrny typu agouti vyskytující se v okolí mléčných žláz, genitálií, hrdla, axil, oblasti slabín a uprostřed čela, u nichž se předpokládá, že vznikají v důsledku chybné diferenciaci (MDS), a
- c) pigmentované a bílé skvrny náhodně rozmístěné v srsti, u nichž se předpokládá, že jsou výsledkem somatických mutací (RS).

▼ B

Všechny tři kategorie se zaznamenají, avšak pouze poslední, RS, je geneticky relevantní. Obtíže s odlišením MDS od RS lze vyřešit pozorováním chlupů ve fluorescenčním mikroskopu.

Zaznamenávají se nápadné makroskopické morfologické malformace potomků.

2. **ÚDAJE**

Uvede se celkový počet sledovaných potomků a počet mláďat s jednou nebo více skvrnami vyvolanými podle předpokladu somatickými mutacemi. Údaje získané u kontrolních a exponovaných skupin se porovnávají vhodnými metodami. Uvedou se rovněž údaje vztažené na velikost vrhu.

3. **ZPRÁVY**

3.1 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- kmen použitý ke křížení,
- počet březích samic v experimentálních a v kontrolních skupinách,
- průměrná velikost vrhu v experimentálních a v kontrolních skupinách při vrhu a při odstavení,
- úroveň(úrovně) dávky zkoušené chemické látky,
- použité rozpouštědlo,
- den březosti, ve kterém byla podána zkoušená látka,
- způsob podání,
- celkový počet sledovaných potomků a počet potomků s kategoriemi skvrn WMVS, MDS a RS v experimentálních a kontrolních skupinách,
- makroskopické morfologické malformace,
- vztah dávka/odezva u kategorie skvrn RS, je-li to možné,
- statistické vyhodnocení,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 **HODNOCENÍ A INTERPRETACE**

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.25 ZKOUŠKA NA DĚDIČNOU TRANSLOKACI U MYŠÍ****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na dědičnou translokaci u myši detekuje strukturní a numerické chromosomové změny v savčích zárodečných buňkách zachycené v první generaci potomků. U pozorovaných chromosomových změn se jedná o reciproční translokace a u samičích potomků o ztráty chromosomu X. Nositelé translokací a samice X0 vykazují sníženou fertilitu, která se využívá pro výběr potomstva F₁ pro cytogenetickou analýzu. Úplná sterilita je způsobena některými typy translokací (autosomální translokací X a translokací typu centromera-telomera). Translokace se analyzují v meiotických buňkách samců ve stadiu diakinézy-metafáze I, tzn. buď u samců generace F₁ nebo samčích potomků samic generace F₁. Samice X0 jsou cytogeneticky identifikovány přítomností pouhých 39 chromosomů v mitózách z kostní dřevě.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY*Příprava*

Zkoušené chemické látky se rozpustí v isotonickém fyziologickém roztoku. Látky nerozpustné ve vodě se rozpustí nebo suspendují ve vhodných vehikulech. Použijí se čerstvě připravené roztoky zkoušené látky. Jestliže bylo pro usnadnění dávkování látky použito rozpouštědlo, nesmí interferovat se zkoušenou látkou ani vyvolávat toxické účinky.

Způsob podávání

Obvyklými způsoby podávání jsou orální aplikace sondou nebo intraperitoneální injekce. Mohou být vhodné i jiné způsoby aplikace.

Pokusná zvířata

Z důvodu snadnějšího křížení a cytologické verifikace se tyto experimenty provádějí na myších. Nepožaduje se žádný specifický kmen myši. Průměrná velikost vrhu u kmene by však měla být větší než osm potomků a měla by být poměrně stálá.

Používají se zdravá pohlavně dospělá zvířata.

▼ B**Počet zvířat**

Nezbytný počet zvířat závisí na četnosti spontánních translokací a na minimálním počtu indukovaných translokací požadovaném pro pozitivní výsledek.

Zkouška se obvykle provádí analýzou samců generace F_1 . Zkouší se nejméně 500 samců generace F_1 na každou exponovanou skupinu. Jestliže se zahrnou také samice generace F_1 , je potřeba 300 samců a 300 samic.

Použití negativních a pozitivních kontrol

Měly by být k dispozici vhodné kontrolní údaje ze souběžné kontroly a z dřívějších pokusů. Jestliže jsou k dispozici přijatelné výsledky pozitivní kontroly z nedávných experimentů provedených v téže laboratoři, mohou být použity namísto souběžných pozitivních kontrol.

Úrovně dávek

Zkouší se jedna úroveň dávky, obvykle nejvyšší dávka vyvolávající minimální toxické účinky, avšak bez vlivu na reprodukční chování nebo přežití. Pro stanovení vztahu dávka/odezva je třeba dvou dalších, nižších dávek. U netoxických látek se použije maximální dosažitelná koncentrace.

*Postup***Expozice a páření**

Používají se dva plány expozice. Nejčastěji se volí jedno podání zkoušené látky. Je rovněž možné podávat zkoušenou látku sedm dní v týdnu po 35 dnů. Počet oplodnění po expozici se řídí plánem expozice a je třeba zajistit, aby byla analyzována všechna exponovaná buněčná stádia zárodečných buněk. Na konci období páření se samice umístí do oddělených klecí. U každého vrhu se zaznamená datum, velikost vrhu a pohlaví mláďat. Všichni samčí potomci se odstaví a samičí potomci se vyloučí, pokud se nepoužijí v experimentu.

Zjišťování translokačních heterozygotů

Používá se jedna ze dvou možných metod:

- test fertility potomků F_1 a následná verifikace možných nositelů translokací cytogenetickou analýzou,
- cytogenetická analýza všech samců generace F_1 bez předchozího výběru testem fertility.

a) Test fertility

Sníženou fertilitu zvířat v generaci F_1 lze stanovit z velikosti vrhu a/nebo analýzou obsahu dělohy samic.

Kritéria určení běžné a snížené fertility musí být stanovena pro každý použitý kmen myši.

▼ B

Pozorování velikosti vrhu: samci generace F_1 určení k testování jsou umístěni samostatně do klecí se samicemi buď ze stejného experimentu, nebo ze stejné kolonie. Klece jsou kontrolovány denně počínaje 18. dnem po spáření. Velikost vrhu a pohlaví generace F_2 se při vrhu zaznamenají a vrh se poté vyloučí. Jestliže jsou testovány samice generace F_1 , ponechá se generace F_2 malých vrhů pro další zkoušení. Samice, nositelky translokací, se zjistí cytogenetickou analýzou translokací u jakéhokoliv jejich samčího potomka. Samice X_0 se rozpoznají ze změny poměru samců a samic u jejich potomků z 1:1 na 1:2. V následném kroku se normální zvířata generace F_1 vyřadí z dalšího testování, jestliže první vrh generace F_2 dosahuje předem určené normální hodnoty nebo ji překračuje; v opačném případě se pozoruje druhý nebo třetí vrh generace F_2 .

Zvířata generace F_1 , která po vyhodnocení tří vrhů generace F_2 nemohou být klasifikována jako normální, se dále testují buď analýzou obsahu dělohy, nebo se přímo podrobí cytogenetické analýze.

Analýzy obsahu dělohy: Snižování velikosti vrhu u nositelů translokací je způsobena smrtí embryí, takže vysoký počet mrtvých implantací naznačuje přítomnost translokací u testovaných zvířat. Samci generace F_1 kteří mají být testováni, jsou připouštěni každý ke 2–3 samicím. Oplodnění se zjišťuje denní ranní kontrolou vaginální zátky. Samice se usmrtí po 14–16 dnech a zaznamenají se živé a mrtvé zárodky v jejich děloze.

b) Cytogenetická analýza

Zhotoví se mikroskopické preparáty z varlat usušené na vzduchu. Nosiči translokací se identifikují na základě přítomnosti multivalentních konfigurací ve stádiu diakinézy – metafáze I v primárních spermatocytech. Nález nejméně dvou buněk s multivalentními asociacemi je požadovaným důkazem, že testované zvíře je nositelem translokace.

Jestliže nebyl proveden výběr testem fertility, vyšetří se všichni samci generace F_1 cytogeneticky. U každého samce se mikroskopicky vyšetří nejméně 25 buněk ve stádiu diakinézy – metafáze I. Analýza mitotických metafází ve spermatogoniích nebo v kostní dřeni je nezbytná u samců generace F_1 s malými varlaty a potlačením meiózy před diakinézí, nebo u samic generace F_1 s podezřením na X_0 . Přítomnost neobvykle dlouhého a/nebo krátkého chromosomu v každé z 10 buněk je důkazem existence částečné samčí translokační sterility (typu centromera-telomera). Některé translokace mezi autosomálními chromosomy a chromozomem X způsobující samčí sterilitu mohou být identifikovány pouze proužkovacími technikami analýzy mitotických chromosomů. Přítomnost 39 chromosomů ve všech 10 mitózách je důkazem, že se jedná o samice X_0 .

2. ÚDAJE

Údaje se zpracují v tabulkové formě.

Pro každý interval páření se zaznamená průměrná velikost vrhu a poměr pohlaví při narození a při odstavení.

▼B

Údaje o fertilitě zvířat generace F_1 musí zahrnovat průměrnou velikost vrhu u všech normálních páření a individuální velikosti vrhů u nositelů translokací generace F_1 . U analýzy obsahu dělohy se uvede průměrný počet živých a mrtvých zárodků u normálních páření a individuální počty živých a mrtvých zárodků pro každé páření nositelů translokací generace F_1 .

U cytogenetické analýzy diakinéze-metafáze I se pro každého nositele translokací uvede počet typů multivalentních konfigurací a celkový počet buněk.

U sterilních jedinců generace F_1 se uvede počet páření a jejich délka. Uvede se hmotnost varlat a podrobné údaje o cytogenetické analýze.

U samic X_0 se uvede průměrná velikost vrhu, poměr pohlaví u generace F_2 a výsledky cytogenetické analýzy.

Pokud byli testem fertility předběžně vybráni možní nositelé translokací generace F_1 , uvede se v tabulkách informace o tom, kolik z nich bylo potvrzeno jako translokační heterozygoti.

Uvedou se údaje z experimentů s negativními a pozitivními kontrolami.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- kmen myši, stáří a hmotnost exponovaných zvířat,
- počet rodičovských zvířat každého pohlaví v exponovaných a kontrolních skupinách,
- zkušební podmínky, podrobný popis expozice, úrovně dávek, rozpouštědla, použité schéma páření,
- počet a pohlaví mláďat na samici, počet a pohlaví potomků určených pro analýzu translokací,
- doba a kritéria analýzy translokací,
- počet a podrobný popis nositelů translokací, včetně údajů o březosti a popřípadě o obsahu dělohy,
- popis cytogenetické metody a mikroskopické analýzy, pokud možno s obrázky,
- statistické vyhodnocení,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

▼B

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.26 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA HLODAVČÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)****1. METODA**

Popisovaná metoda zkoušení subchronické orální toxicity se řídí hlavními zásadami metody OECD TG 408 (1998).

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze stanovení subchronické orální toxicity s opakovanou aplikací provést až po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity a toxicity při 28denní opakované aplikaci. 90denní studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by mohlo vzniknout vlivem opakované expozice v průběhu delšího období, zahrnující vývoj po odstavení až do dospělosti. Studie poskytne informace o hlavních toxických účincích, určí cílové orgány a možnou kumulaci a může poskytnout odhad hladiny bez pozorovatelného nepříznivého účinku, kterou lze použít při výběru úrovní dávek pro chronické studie a pro stanovení bezpečnostních kritérií pro expozici člověka.

Metoda klade dále důraz na neurologické příznaky a naznačuje možné imunologické účinky a účinky na reprodukci. Důraz se klade také na pečlivé klinické pozorování zvířat s cílem získat co nejvíce informací. Tato studie by měla umožnit identifikaci chemických látek, které by mohly vyvolat neurotoxické nebo imunologické účinky nebo mít nepříznivý vliv na reprodukční orgány, a může odůvodnit další hlubší zkoumání.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost (v g, mg) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v mg na kg) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm).

Dávkování: obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

NOAEL: anglická zkratka pro termín „no observed adverse effect level“ (hladina bez pozorovaného nepříznivého účinku) a odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky související s podáním látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

▼B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 **Příprava zvířat**

Použijí se zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky nejméně 5 dnů před zahájením zkoušky a nebyla vystavena žádným experimentálním zásahům. Musí být popsán druh, kmen, původ, pohlaví a hmotnost a/nebo věk pokusných zvířat. Zvířata by měla být náhodně přiřazena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti by mělo být přiřazeno samostatné identifikační číslo.

1.4.2 **Příprava dávek**

Zkoušená látka se podává sondou nebo v potravě či v pitné vodě. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušené látky.

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. U nevodných vehikul by měla být známa jejich toxická charakteristika. Měla by být stanovena stálost zkoušené látky v podmínkách podávání.

1.4.3 **Zkušební podmínky**1.4.3.1 *Pokusná zvířata*

Dává se přednost potkanům, ale lze použít i jiný druh hlodavců, např. myši. Použity by měly být běžně používané kmeny mladých zdravých zvířat. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení a v každém případě dříve, než zvířata dosáhnou stáří devíti týdnů. Na začátku studie by měly být odchylky hmotnosti zvířat minimální a neměly by překročit ± 20 % střední hodnoty pro každé pohlaví. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita zvířata stejného kmene a stejného původu.

1.4.3.2 *Počet a pohlaví*

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců). Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Na základě dřívějších poznatků o chemické látce nebo jí blíže příbuzné látce by se mělo zvážit i přidání další satelitní skupiny 10 zvířat (5 zvířat každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou, aby se po ukončení aplikace mohlo posoudit, zda jsou případné účinky vratné nebo trvalé. Trvání tohoto období po expozici by mělo být vhodné stanoveno s ohledem na pozorované účinky.

▼ B1.4.3.3 *Úrovně dávek*

S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz bod 1.4.3.4), by měly být použity nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek je možno stanovit na základě výsledků studií při opakované aplikaci nebo orientačních studií a měly by zohlednit jakékoli existující dostupné toxikologické a toxikokinetické údaje o zkoušené látce nebo o příbuzné látce. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené látky, měla by být nejvyšší úroveň dávky zvolena s cílem vyvolat toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než přibližně 6 až 10).

Kontrolní skupině se nepodává žádná látka, nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené látky vehikulum používá. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Jestliže je použito vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Jestliže se zkoušená látka podává v potravě a způsobuje-li omezení příjmu potravy, doporučuje se použít paralelně skupinu se stejným omezením potravy, aby se odlišil vliv snížení příjmu potravy nechutenstvím od toxikologických změn

V případě potřeby by měly být vzaty v úvahu následující charakteristiky vehikula a ostatních přísad: účinky na vstřebávání, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky; dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a vliv na spotřebu potravy nebo vody nebo na nutriční stav zvířat.

1.4.3.4 *Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nevyvolá pozorovatelné nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří dávek nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5 **POSTUP**1.5.1 **Podání dávek**

Zkoušená látka se zvířatům podává 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů. Jakýkoli jiný režim podávání, např. 5 dní v týdnu, musí být zdůvodněn. Pokud se zkoušená látka podává sondou, aplikuje se zvířatům jen v jediné dávce sondou nebo kanylou. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kdy lze použít 2 ml na 100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, u kterých se ve vyšších koncentracích zhoršují účinky, by měly být rozdíly ve zkušebním objemu minimalizovány úpravou koncentrace tak, aby byl při všech úrovních dávek podáván konstantní objem.

▼ B

U látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je 90denní studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná dieta.

1.5.2 **Pozorování**

Doba pozorování by měla být nejméně 90 dní. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po vhodné dobu bez expozice, aby se posoudilo, zda nastalo zotavení, nebo toxické účinky přetrvávají.

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Zaznamenává se klinický stav zvířat. Nejméně dvakrát denně, obvykle na začátku a na konci každého dne, se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

Nejméně jednou před prvním podáním látky a dále jednou týdně se provede důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intraindividuálního srovnání). Toto pozorování by se mělo provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Pozorování by měla být pečlivě zaznamenávána, nejlépe za použití systému bodování explicitně definovaného ve zkušební laboratoři. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Vyšetření by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, přítomnost sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (slzení, zjevení srsti, velikost zornic, poruchy dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, držení těla a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo bizarního chování (např. sebepoškození, chůze pozpátku) (1).

Před podáním zkoušené látky a při zakončení studie by mělo být provedeno vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem nejlépe u všech zvířat, alespoň však ve skupině s vysokou dávkou a v kontrolní skupině. Jsou-li zjištěny změny na očích, měla by být vyšetřena všechna zvířata.

Ke konci doby expozice, a v každém případě ne dříve než v jedenáctém týdnu, by mělo být provedeno posouzení reakce na smyslové podněty různého typu (1) (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní podněty) (2, 3, 4), změní se síla úchopu (5) a motorická aktivita (6). Další informace o postupech, které lze použít, jsou uvedeny v příslušné literatuře. Místo postupů popsaných v této literatuře však lze použít alternativní postupy.

Pozorování funkčních poruch prováděná ke konci studie lze vynechat, pokud jsou údaje o pozorování funkčních poruch dostupná z jiných studií a pokud denní klinická pozorování neprokáží žádné funkční poruchy.

▼ B

Pozorování funkčních poruch lze výjimečně vynechat u skupin, které vykazují příznaky toxicity v takové míře, že by při posuzování funkčního stavu vadily.

1.5.2.1 *Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody*

Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážit. Příjem potravy by se měl provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně zaznamenat spotřeba vody. Spotřeba vody by měla být vzata v úvahu také v případě studií s podáváním v potravě nebo sondou, v jejichž průběhu může dojít ke změně příjmu tekutin.

1.5.2.2 *Hematologická a klinická biochemická vyšetření*

Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa a v případě potřeby by se měly skladovat za vhodných podmínek. Na konci zkušebního období se vzorky odeberou těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu.

Na konci zkušebního období a při případném odběru krevních vzorků v průběhu zkoušky by měla být provedena následující hematologická vyšetření: stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a stanoví se protrombinový čas.

Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáň a zejména na játra a ledviny se provedou na krevních vzorcích odebraných každému zvířeti před utracením nebo v jeho průběhu (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky). Podobně jako hematologická vyšetření může být v průběhu zkoušky prováděn odběr vzorků pro klinické biochemické zkoušky. Před odebráním krevních vzorků se doporučuje ponechat zvířata přes noc nalačno⁽¹⁾. Vyšetření plazmy a séra zahrnuje stanovení sodíku, draslíku, glukosy, celkového cholesterolu, močoviny, dusíku močoviny, kreatininu, celkových proteinů a albuminu, nejméně dvou enzymů indikujících účinky na jaterní buňky (jako alaninaminotransferasa, aspartátaminotransferasa, alkalická fosfatasa, gamaglutamyltranspeptidasa a sorbitoldehydrogenasa). Zahrnout lze také stanovení dalších enzymů (jaterního nebo jiného původu) a žlučových kyselin, které může za určitých okolností poskytnout užitečné informace.

Dále je možné v průběhu posledního týdne studie provést následující analýzy moči za použití časově definovaného sběru: vzhled, objem, osmolalita nebo specifická hmotnost, pH, bílkoviny, glukosa a krev/-krvinky.

Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání v séru. Další vyšetření by mělo být provedeno, pokud mohou známé vlastnosti zkoušené látky ovlivnit určité metabolické funkce, včetně vápníku, fosforu, triglyceridů nalačno, specifických hormonů, methemoglobinu a cholinesterasy. Účinnost těchto vyšetření se posuzuje podle příslušnosti chemické látky do určitých skupin nebo případu od případu.

⁽¹⁾ Pro řadu stanovení v séru a plazmě, zejména pro glukosu, by bylo vhodné ponechat zvířata nalačno přes noc. Hlavním důvodem je, že u nehladovějících zvířat je vyšší variabilita výsledků, která by mohla maskovat jemné změny a ztížit interpretaci. Na druhé straně by hladovění přes noc mohlo mít vliv na celkový metabolismus a při podávání v potravě by zasáhlo do pravidelnosti expozice zkoušené látce. Pokud se odebírá krev nalačno, měla by být klinická biochemická vyšetření provedena až po pozorování funkčních poruch v rámci studie.

▼ B

Obecně je třeba postupovat pružně v závislosti na druhu a na pozorovaných a/nebo předpokládaných účincích dané látky.

Pokud nejsou údaje o dosavadních výchozích hodnotách dostatečné, mělo by se zvážit stanovení hematologických a klinických biochemických parametrů před začátkem zkoušky; obecně se nedoporučuje tyto údaje získávat před expozicí (7).

1.5.2.3 *Pitva*

U všech pokusných zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, děloha, vaječníky, brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených v agónii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by měly být zbaveny všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

Následující tkáně by měly být přechovány v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s lézemi, mozek (reprezentativní oblasti, včetně předního mozku, mozečku a prodloužené míchy), mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a lumbální), hypofýza, štítná žláza, příštítná tělíška, brzlík, jícen, slinné žlázy, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, slinivka břišní, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, průdušnice a plíce (konzervované naplněním fixačním roztokem a ponořením), aorta, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčná žláza, prostata, močový měchýř, žlučník (myši), lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*), přednostně v blízkosti svalu, řez kostní dřevě (a/nebo čerstvý nátěr z nasáklé kostní dřevě), kůže a oči (jestliže byly při oftalmologických vyšetřeních pozorovány změny). Podle klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Všechny orgány považované za možné cílové orgány pro působení zkoušené látky by měly být uchovány.

1.5.2.4 *Histopatologická vyšetření*

U všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou by mělo být provedeno celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

1.5.2.5 *Vyšetření všech makroskopických lézí*

V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

▼ B**2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ****2.1 ÚDAJE**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Kromě toho by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a doba úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1 Zkoušená látka

- fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,
- identifikační údaje,
- vehikulum (je-li potřeba): zdůvodnění volby vehikula, není-li použita voda.

2.2.2 Testovací druh:

- použitý druh a kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

2.2.3 Zkušební podmínky:

- zdůvodnění výběru úrovně dávek,
- podrobné údaje o složení látky nebo úpravě potravy, o dosažené koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,
- podrobné údaje o způsobu aplikace zkoušené látky,
- skutečné denní dávky (mg/kg tělesné hmotnosti) a popřípadě přepočet koncentrace zkoušené látky v potravě/pitné vodě (ppm) na skutečnou dávku,
- podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

2.2.4 Výsledky:

- tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,
- spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,

▼B

- charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),
- výsledky oftalmologického vyšetření,
- posouzení reaktivity na smyslové podněty, úchopové síly a motorické aktivity (je-li dostupné),
- hematologické vyšetření s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,
- klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími normálními hodnotami,
- konečná tělesná hmotnost, hmotnost orgánů a poměry hmotnosti orgánů a tělesné hmotnosti,
- pitevni nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- údaje o absorpci, pokud jsou dostupné,
- statistické zpracování číselných výsledků, kde je to možné.

Rozbor výsledků.

Závěry.

3. LITERATURA

- 1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- 2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999–1003.
- 3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J.Toxicol. Environ. Health*, 9, 691–704.
- 4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, 267–283.
- 5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxivol.*, 1, 233–236.
- 6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L. W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599–609.
- 7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies“, *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, 198–201.

▼B**B.27 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY NA NEHLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)****1. METODA**

Popisovaná metoda zkoušení subchronické orální toxicity se řídí hlavními zásadami metody OECD TG 409 (1998).

1.1 ÚVOD

Při posouzení a hodnocení toxických vlastností chemické látky lze stanovení subchronické orální toxicity s opakovanou aplikací provést až po získání prvních informací o toxicitě ze zkoušek akutní toxicity a toxicity při 28denní opakované aplikaci. 90denní studie poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by mohlo vzniknout vlivem opakované expozice v průběhu období rychlého růstu a mladé dospělosti. Studie poskytne informace o hlavních toxických účincích, určí cílové orgány a možnost akumulace a může poskytnout odhad hladiny bez pozorovatelného nepříznivého účinku, kterou lze použít při výběru úrovní dávek pro chronické studie a pro stanovení bezpečnostních kritérií pro expozici člověka.

Tato zkušební metoda umožňuje zjistit nepříznivé účinky vyvolané chemickou látkou na nehlodavcích a měla by být použita pouze tehdy, pokud:

- účinky pozorované v jiných studiích naznačují potřebu je objasnit nebo charakterizovat na dalším druhu, a to na nehlodavcích, nebo
- toxikokinetické studie naznačují, že použití specifického druhu nehlodavce je nejvhodnější volbou laboratorního zvířete, nebo
- existují jiné specifické důvody, které zdůvodňují použití nehlodavce.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost (v g, mg) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v mg/kg) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm).

Dávkování: obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

NOAEL: anglická zkratka pro termín „no observed adverse effect level“ (hladina bez pozorovaného nepříznivého účinku) a odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé účinky související s podáním látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně orálně podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat; každé skupině se podává jedna úroveň dávky 90 dnů. V průběhu období podávání se zvířata každý den pečlivě pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula nebo byla utracena, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

▼ B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Výběr druhu zvířat

Obvykle používaným druhem nehlodavce je pes, musí jít o definované plemeno, často se používá beagle. Dále lze použít jiné druhy, např. prase nebo miniprase. Primáti se nedoporučují a jejich použití musí být odůvodněno. Použita by měla být mladá zdravá zvířata a v případě psů by podávání mělo začít nejlépe ve věku 4 až 6 měsíců, nejpozději v devíti měsících. Provádí-li se studie jako předběžná studie pro dlouhodobou studii chronické toxicity, měl by být v obou studiích použit tentýž živočišný druh a plemeno.

1.4.2 Příprava zvířat

Použijí se mladá zdravá zvířata, která se aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předchozím experimentálním postupům. Trvání aklimatizace závisí na vybraném testovacím druhu a původu zvířat. Doporučuje se nejméně 5 dnů pro psy nebo pro prasata chovaná pro tento účel ve vlastním chovu a nejméně 2 týdny pro zvířata z externích chovných zařízení. Musí být popsán druh, kmen, původ, pohlaví a hmotnost a/nebo věk pokusných zvířat. Zvířata by měla být náhodně přiřazena do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti by mělo být přiřazeno samostatné identifikační číslo.

1.4.3 Příprava dávek

Zkoušenou látku lze podávat v potravě nebo v pitné vodě, sondou nebo v kapslích. Metoda orálního podání závisí na účelu studie a na fyzikálně-chemických vlastnostech zkoušeného materiálu.

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku v jiných vehikulech. Pro nevodná vehikula by měla být známa jejich toxická charakteristika. Měla by být stanovena stálost zkoušené látky v podmínkách podávání.

1.5 POSTUP

1.5.1 Počet a pohlaví zvířat

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 8 zvířat (4 samice a 4 samci). Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, je nutno zvýšit celkový počet zvířat o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Počet zvířat při zakončení studie musí být dostatečný pro smysluplné vyhodnocení toxických účinků. Na základě dřívějších poznatků o zkoušené chemické látce nebo jí blízké příbuzné látce by mělo být vzato v úvahu zařazení dodatečné sate- litní skupiny 8 zvířat (4 zvířata každého pohlaví) do kontrolní skupiny a do skupiny s nejvyšší dávkou pro účely pozorování vrat- nosti nebo přetrvávání jakýchkoli toxických účinků v období po expozici. Trvání tohoto období po expozici by mělo být vhodné stanoveno s ohledem na pozorované účinky.

▼ B**1.5.2 Dávkování**

S výjimkou případů, kdy se provede limitní zkouška (viz bod 1.5.3), by měly být použity nejméně tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Úrovně dávek je možno stanovit na základě výsledků studií při opakované aplikaci nebo orientačních studií a měly by zohlednit jakékoli existující toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo příbuzné materiály. Nebrání-li tomu fyzikálně-chemická povaha nebo biologické účinky zkoušené látky, měla by být nejvyšší úroveň dávky zvolena s cílem vyvolat toxicitu, ne však uhynutí nebo velké utrpení. Měla by být zvolena sestupná řada úrovní dávek s cílem prokázat účinky související s dávkou a nepřítomnost nepříznivých účinků při nejnižší úrovni dávky (NOAEL). Často je pro stanovení sestupných úrovní dávek optimální dvoj- až čtyřnásobný interval mezi dávkami a je vhodnější přidat čtvrtou experimentální skupinu než použít velmi velké intervaly (odpovídající např. faktoru většímu než 6 až 10).

Kontrolní skupině se nepodává žádná látka, nebo se jí podává vehikulum, jestliže se při podávání zkoušené látky vehikulum používá. S výjimkou podávání zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Jestliže je použito vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Jestliže se zkoušená látka podává v potravě a způsobuje-li omezení příjmu potravy, doporučuje se použít paralelně skupinu se stejným omezením potravy, aby se odlišil vliv snížení příjmu potravy nechutenstvím od toxikologických změn

V případě potřeby by měly být vzaty v úvahu následující charakteristiky vehikula a ostatních přísad: účinky na absorpci, distribuci, metabolismus nebo vylučování zkoušené látky; dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a účinky na spotřebu potravy nebo vody nebo na nutriční stav zvířat.

1.5.3 Limitní zkouška

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den nevyvolá pozorovatelné nepříznivé účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití tří dávek nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5.4 Podání dávek

Zkoušená látka se zvířatům podává 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů. Jakýkoli jiný režim podávání, např. 5 dní v týdnu, musí být zdůvodněn. Pokud se zkoušená látka podává sondou, podává se zvířatům v jediné dávce za použití žaludeční sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Zpravidla se udržuje co nejnižší objem. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušebního objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

▼B

U látek podávaných v potravě nebo v pitné vodě je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivňovalo normální výživu nebo vodní rovnováhu. Podává-li se zkoušená látka v potravě, může se použít buď konstantní koncentrace (v ppm), nebo konstantní dávkování ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete; použitá možnost musí být specifikována. Aplikuje-li se látka sondou nebo v kapslích, mělo by se tak stát každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být podle potřeby upraveno tak, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Pokud je 90denní studie prováděna jako předběžná studie k dlouhodobé studii chronické toxicity, měla by být v obou studiích použita stejná potrava.

1.5.5 Pozorování

Doba pozorování by měla být nejméně 90 dní. Zvířata v satelitní skupině určená pro následná pozorování by měla být po vhodné dobu bez expozice, aby se posoudilo, zda nastalo zotavení, nebo toxické účinky přetrvávají.

Všeobecné klinické pozorování by se mělo provádět nejméně jednou denně, přednostně ve stejnou dobu (stejně doby) a s uvážením doby očekávaného maximálního účinku po podání látky. Zaznamenává se klinický stav zvířat. Nejméně dvakrát denně, obvykle na začátku a na konci každého dne, se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění morbidity a mortality.

Nejméně jednou před prvním podáním látky a dále jednou týdně se provede důkladné klinické vyšetření všech zvířat (za účelem intraindividuálního srovnání). Toto pozorování by se mělo, pokud je to možné, provádět mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru a přednostně pokaždé ve stejnou dobu. Je třeba se pokusit zajistit, aby byly rozdíly mezi podmínkami pozorování minimální. Příznaky toxicity by měly být pečlivě zaznamenány, včetně doby nástupu, stupně a trvání. Pozorování by mělo mimo jiné zahrnovat změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a vegetativních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklé dýchání). Zaznamenávat by se měly změny chůze, polohy a reakce na manipulaci, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění nebo opakovaného kroužení) nebo jakékoli zvláštní chování.

Před podáním zkoušené látky a při zakončení studie by mělo být provedeno vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným přístrojem nejlépe u všech zvířat, alespoň však ve skupině s vysokou dávkou a v kontrolní skupině. Jsou-li zjištěny změny na očích související s podáním látky, měla by být vyšetřena všechna zvířata.

1.5.5.1 Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody

Všechna zvířata by se měla nejméně jednou týdně zvážít. Měření spotřeby potravy by se mělo provádět nejméně jednou týdně. Pokud se látka podává v pitné vodě, měla by se nejméně jednou týdně měřit spotřeba vody. Spotřeba vody by měla být vzata v úvahu také v případě studií s podáváním v potravě nebo sondou, v jejichž průběhu může dojít ke změně příjmu tekutin.

▼B1.5.5.2 *Hematologická a klinická biochemická vyšetření*

Krevní vzorky by se měly odebírat z určeného místa a v případě potřeby by se měly skladovat za vhodných podmínek. Na konci zkušebního období se vzorky odeberou těsně před utracením zvířat nebo v jeho průběhu.

Na začátku studie a poté v měsíčních intervalech nebo uprostřed zkušebního období a na konci zkušebního období se provede hematologické vyšetření, včetně stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erytrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů, počtu trombocytů a srážlivosti krve, stanoví se protrombinový a trombinový čas.

Klinické biochemické analýzy za účelem vyšetření hlavních toxických účinků na tkáň a zejména na játra a ledviny se provedou na krevních vzorcích odebraných všem zvířatům na začátku zkušebního období a poté v měsíčních intervalech nebo uprostřed a na konci zkušebního období. Zkušební oblasti, které je vhodné stanovit jsou koncentrace elektrolytů, metabolismus cukrů a funkce jater a ledvin. Výběr specifických zkoušek ovlivní pozorování mechanismu účinku zkoušené látky. Před odběrem vzorků by měla být zvířata ponechána nalačno po dobu vhodnou pro daný druh. Navrhovaná vyšetření zahrnují stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glykémie nalačno, alaninaminotransferasy, aspartátaminotransferasy, ornitindekarboxylasy, gama-glutamyltranspeptidasy, dusíku močovininy, albuminu, kreatininu, celkového bilirubinu a celkových bílkovin v séru.

Analýzy moči za použití časově definovaného sběru by se měly provést alespoň na začátku, uprostřed a na konci studie. Analýzy moči zahrnují vyšetření vzhledu, objemu, osmolality nebo specifické hmotnosti, pH, bílkovin, glukosy a krve/krvinek. Zkoumání pozorovaného účinku (pozorovaných účinků) lze v případě potřeby rozšířit o další analýzy.

Dále by se mělo uvážit vyšetření indikátorů celkového poškození tkání. Mezi jiná stanovení, která mohou být potřebná pro úplné toxikologické hodnocení, patří analýza lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu a aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být v případě potřeby použity pro širší vyšetření pozorovaných účinků. Tyto profily je třeba identifikovat pro chemické látky určitých skupin nebo případ od případu.

Obecně je třeba postupovat pružně v závislosti na druhu a na pozorovaných a/nebo předpokládaných účincích dané látky.

1.5.5.3 *Pitva*

U všech pokusných zvířat zařazených do studie by měla být provedena celková, podrobná pitva, zahrnující pečlivé vyšetření vnějšího povrchu těla, všech otvorů a lebeční, hrudní a břišní dutiny a jejich obsahu. Játra se žlučníkem, ledviny, nadledvinky, varlata, nadvarlata, vaječníky, děloha, štítná žláza (s příštítnými tělísky), brzlík, slezina, mozek a srdce všech zvířat (kromě zvířat nalezených v agonii a/nebo zvířat utracených v průběhu zkoušky) by měly být zbaveny všech ulpělých tkání a co nejdříve po sekci se ve vlhkém stavu zváží, aby nedošlo k vyschnutí.

▼ B

Následující tkáně by měly být přechovány v nejvhodnějším fixačním médiu s ohledem na typ tkáně a plánovaná následná histopatologická vyšetření: všechny tkáně s lézemi, mozek (reprezentativní oblasti, včetně předního mozku, mozečku a prodloužené míchy), mícha (ve třech úrovních: krční, střední hrudní a lumbální), hypofýza, oči, štítná žláza, příštítná tělíska, brzlík, jícen, slinné žlázy, žaludek, tenké i tlusté střevo (včetně Peyerových plátů), játra, žlučník, slinivka břišní, ledviny, nadledvinky, slezina, srdce, průdušnice a plíce, aorta, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, samičí mléčná žláza, prostata, močový měchýř, žlučník (myší), lymfatické uzliny (přednostně jedna pro oblast aplikace a jedna vzdálená pro pokrytí systémových účinků), periferní nerv (*n. ischiadicus* nebo *n. tibialis*), přednostně v blízkosti svalu, řez kostní dřevě (a/nebo čerstvý nátěr z nasáklé kostní dřevě) a kůže. Podle klinických nebo jiných nálezů může být nezbytné zkoumat i další tkáně. Všechny orgány považované za možné cílové orgány pro působení zkoušené látky by měly být uchovány.

1.5.5.4 *Histopatologická vyšetření*

Celkové histologické vyšetření uchovaných orgánů a tkání by mělo být provedeno nejméně u všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou. Toto vyšetření by mělo být rozšířeno na zvířata všech ostatních dávkových skupin, pokud jsou u skupiny s vysokou dávkou pozorovány změny orgánů vyvolané zkoušenou dávkou.

Měly by být zkoumány všechny makroskopické léze.

V případě použití satelitní skupiny by mělo být provedeno histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**2.1 ÚDAJE**

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat nalezených uhynulých v průběhu zkoušky nebo utracených z humánních důvodů a dobu úmrtí nebo humánního utracení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis toxických příznaků, včetně doby nástupu, trvání a závažnosti každého toxického účinku, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících každý typ léze.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

2.2 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

▼ B**2.2.1 Zkoušená látka**

- fyzikální povaha, čistota a fyzikálně-chemické vlastnosti,
- identifikační údaje,
- vehikulum (je-li potřeba): zdůvodnění volby vehikula, není-li použita voda.

2.2.2 Testovací druh:

- použitý druh a kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

2.2.3 Zkušební podmínky:

- zdůvodnění výběru úrovní dávek,
- podrobné údaje o složení látky nebo úpravě potravy, o dosažené koncentraci, stálosti a homogenitě přípravku,
- podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky,
- přepočítání z koncentrace látky v potravě nebo ve vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti (pokud jde o aplikaci v potravě nebo ve vodě),
- podrobné údaje o potravě a kvalitě vody.

2.2.4 Výsledky

- tělesná hmotnost/změny tělesné hmotnosti,
- spotřeba potravy a popřípadě spotřeba vody,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávky, včetně příznaků toxicity,
- charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),
- oftalmologické vyšetření,
- hematologické vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami (normami),
- klinická biochemická vyšetření s příslušnými výchozími hodnotami,
- konečná tělesná hmotnost, hmotnost orgánů a poměry hmotnosti orgánů k tělesné hmotnosti,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- údaje o absorpci, pokud jsou dostupné,
- popřípadě statistické vyhodnocení výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

▼ B**B.28 STUDIE SUBCHRONICKÉ DERMÁLNÍ TOXICITY (90DENNÍ
OPAKOVANÁ KOŽNÍ APLIKACE NA HLODAVČÍCH)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se denně po dobu 90 dní nanáší na kůži v odstupňovaných dávkách několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky. V průběhu období aplikace se zvířata každý den pozorují, aby se zjistily příznaky toxicity. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanoveny.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1 Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Krátce před zahájením zkoušky se zvířatům ostříhá srst na zádech. Vyholení srsti je rovněž možné, mělo by se však provést asi 24 hodin před zkouškou. Ostříhání nebo oholení je obvykle třeba opakovat přibližně v týdenních intervalech. Při stříhání nebo holení srsti je třeba dbát na to, aby se neporanila kůže. Pro aplikaci zkoušené látky se připraví nejméně 10 % povrchu těla. Při rozhodování o velikosti připravované plochy kůže, která má být zbavena srsti, a o velikosti krycího obvazu je třeba vzít v úvahu hmotnost zvířat. Při zkouškách pevných látek, které mohou být podle potřeby rozetřeny na prach, se zkoušená látka dostatečně navlhčí vodou, popřípadě vhodným vehikulem, aby se zajistil dobrý styk s kůží. Kapalně zkoušené látky se zpravidla aplikují neředěné. Aplikace se provádí pět až sedm dnů v týdnu.

1.6.2 Zkušební podmínky**1.6.2.1 Pokusná zvířata**

Může být použit dospělý potkan, králik nebo morče. Lze použít i jiné živočišné druhy, ale jejich použití musí být zdůvodněno. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotnosti překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty. Provádějí se subchronická dermální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a kmen.

▼B

1.6.2.2. Počet a pohlaví

Pro každou úroveň dávek se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců) se zdravou kůží. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, zvýší se celkový počet o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Kromě toho může být satelitní skupině 20 zvířat (10 zvířat každého pohlaví) podávána vysoká úroveň dávky po dobu 90 dnů a 28 dnů po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

1.6.2.3. Úrovně dávek

Použijí se nejméně tři úrovně dávek a kontrolní skupina nebo, jeli použito vehikulum, kontrolní skupina s vehikulem. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně. Zkoušená látka by měla být aplikována každý den přibližně ve stejnou dobu a dávkování by mělo být pravidelně (týdně nebo každých čtrnáct dnů) přizpůsobeno, aby bylo konstantní vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Používali se pro usnadnění aplikace vehikulum, aplikuje se kontrolní skupině stejným způsobem jako pokusným skupinám, a to ve stejném množství, jaké obdrží skupina, které se aplikuje nejvyšší dávka. Nejvyšší úroveň dávky by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší dávka tuto hodnotu překračovat. V ideálním případě by střední úroveň dávky měla vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použijeli se více než jedna mezilehlá úroveň dávky, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolních skupinách by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Vede-li aplikace zkoušené látky k závažnému podráždění kůže, je třeba snížit koncentraci, což u vysoké úrovně dávky může vést k omezení nebo vyloučení ostatních toxických účinků. Došlo-li k závažnému poškození kůže, je nutné zkoušku ukončit a provést ji znovu s nižšími koncentracemi.

1.6.3. Limitní zkouška

Nevyvolá-li při předběžné studii aplikace dávky 1 000 mg/kg nebo vyšší dávky, která odpovídá možné expozici člověka, jeli známa, žádné toxické účinky, není další zkoušení potřebné.

1.6.4. Doba pozorování

Zvířata se pozorují denně s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamenají se doba uhynutí a čas, ve kterém se objevily a opět odezněly toxické účinky.

▼B1.6.5. *Postup*

Zvířata se chovají jednotlivě v klecích. Zvířatům se aplikuje zkoušená látka denně nejlépe 7 dní v týdnu po dobu 90 dnů.

Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, se pozorují dalších 28 dnů bez aplikace, aby se posoudilo zotavení z otravy nebo přetrvávání toxických účinků. Doba expozice by měla být nejméně šest hodin denně.

Zkoušená látka se nanese rovnoměrně na plochu, která činí asi 10 % celkového povrchu těla. V případě vysoce toxických látek může být tato plocha menší; měla by se však porýt co největší část této plochy co nejslabší a nejstejnějším vrstvou.

Během expozice se zkoušená látka udržuje ve styku s kůží pomocí porézního mulového obvazu a nedráždivé náplasti. Zkušební plocha se dále vhodným způsobem překryje, aby se mulový obvaz a zkoušená látka fixovaly a aby zvířata zkoušenou látku nepožila. K zamezení požití látky je možno použít i prostředky pro omezení volnosti pohybu, úplné znehybnění se však nedoporučuje.

Po uplynutí doby expozice se odstraní zbytky zkoušené látky pokud možno vodou nebo jiným vhodným způsobem očištění kůže.

Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se známky toxicity včetně doby nástupu, závažnosti a trvání. Pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonómie a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Měření spotřeby potravy a hmotnosti zvířat se provádějí týdně. Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Na konci zkoušky se všechna zvířata, která přežila, s výjimkou satelitních skupin, pitvají. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

U všech zvířat včetně kontrolních se obvykle provádějí následující vyšetření:

- a) oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným vhodným přístrojem se provede před podáním zkoušené látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, alespoň však u skupiny s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Jsou-li zjištěny oční změny, vyšetří se všechna zvířata;
- b) na konci zkoušky se provede hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erythrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve, změří se například doba srážlivosti, prothrombinový čas, thrombinový čas nebo počet trombocytů;

▼ B

c) na konci zkoušky se provede biochemická analýza krve. Pro tyto studie je vhodné analyzovat koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických zkoušek bude určen pozorováním způsobu účinku látky. Navrhovaná vyšetření zahrnují stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (délka doby hladovění se volí podle živočišného druhu), hladiny sérové glutamát-pyruvát transaminasy ⁽¹⁾, glutamát-oxalacetát transaminasy ⁽²⁾, ornitindekarboxylasy, gama-glutamyltranspeptidasy, dusíku močoviny, albuminu, kreatininu, celkového bilirubinu a celkových bílkovin v séru. Mezi další stanovení, která mohou být nezbytná pro správné toxikologické hodnocení, patří stanovení lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu a aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být použity, je-li nezbytné provést širší vyšetření pozorovaných účinků;

d) analýza moči se běžně nevyžaduje, provádí se pouze na základě očekávané nebo pozorované toxicity.

Pokud nejsou kontrolní údaje z dřívějších pozorování vhodné, zváží se stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před začátkem aplikace.

Pitva

U všech zvířat se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny včetně jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny a varlata se co nejdříve po sekci zváží, aby nedošlo k vysychání. Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickými lézemi, mozek – v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice a plíce, srdce, aorta, (slinné žlázy), játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha (přidatné pohlavní orgány), (kůže), jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samičí mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, hrudní kost s kostní dřeví, (oči), (kost stehenní včetně kloubních ploch), (mícha ve třech úrovních – krční, střední hrudní a bederní) a (slzné žlázy). Tkáně v závorkách se vyšetřují pouze v případě, že lze na jejich postižení usuzovat z příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

Histopatologická vyšetření

a) Úplné histopatologické vyšetření normální a exponované kůže, orgánů a tkání se provede u všech zvířat kontrolní skupiny a u zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka.

b) Vyšetří se všechny makroskopické léze.

⁽¹⁾ Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

▼B

- c) Vyšetří se cílové orgány v jiných dávkových skupinách.
- d) Použijí-li se potkani, plíce zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se histopatologicky vyšetří k zjištění příznaků infekce, neboť to umožňuje vhodné posouzení zdravotního stavu zvířat. Další histopatologická vyšetření se u zvířat těchto skupin nemusí provádět rutinně, musí se však provést vždy na orgánech, na kterých byly zjištěny léze ve skupině s vysokou dávkou.
- e) V případě použití satelitní skupiny se provede histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy lézí. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,
- zkušební podmínky,
- úroveň dávek (včetně vehikula, pokud je použito) a koncentrace,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky,
- úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxických nebo jiných účinků,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
- údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- provedená biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků případných analýz moči),
- pitevní nálezy,

▼B

- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼ B**B.29 STUDIE SUBCHRONICKÉ INHALAČNÍ TOXICITY (90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE NA HLODAVCÍCH)****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Několik skupin pokusných zvířat se denně po 90 dní vystaví po definovanou dobu zkoušené látce v odstupňovaných koncentracích, a to každá skupina jedné koncentraci. Je-li použito pro usnadnění přípravy vhodné koncentrace zkoušené látky v ovzduší vehikulum, použije se kontrolní skupina exponovaná vehikulu. Během expozice se zvířata denně pozorují a zjišťují se toxické účinky. Zvířata, která v průběhu zkoušky uhynula, i zvířata, která do konce zkoušky přežila, se pitvají.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1 Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v takových podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se náhodně přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Je-li to nezbytné, přidá se ke zkoušené látce vhodné vehikulum tak, aby v ovzduší vznikla požadovaná koncentrace zkoušené látky. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná přísada, musí o nich být známo, že nemají toxické účinky. Podle možnosti lze použít dřívější údaje.

1.6.2 Zkušební podmínky**Pokusná zvířata**

Přednostně se používá potkan, pokud neexistují důvody proti tomu. Použijí se mladá zdravá dospělá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů. Na začátku zkoušky by nemělo rozpětí odchylek hmotností použitých zvířat překročit ± 20 % příslušné střední hodnoty. Provádí-li se subchronická inhalační studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a kmen.

▼B**Počet a pohlaví**

Pro každou úroveň koncentrace se použije nejméně 20 zvířat (10 samic a 10 samců). Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, zvýší se celkový počet o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie. Kromě toho může být satelitní skupině 20 zvířat (10 zvířat každého pohlaví) podávána vysoká koncentrace dávky po dobu 90 dnů a 28 dnů po podávání se pozoruje vratnost, přetrvávání nebo zpožděný výskyt toxických účinků.

Expoziční koncentrace

Použijí se nejméně tři koncentrace a kontrolní skupina nebo, v případě použití vehikula, kontrolní skupina s vehikulem (v koncentraci odpovídající koncentraci vehikula při nejvyšší úrovni zkoušené látky). S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Nejvyšší koncentrace by měla mít za následek toxické účinky, ale neměla by způsobit žádná uhynutí, nebo by měla mít za následek malý počet uhynutí. Pokud existují odhady expozice u člověka, má nejnižší koncentrace tuto hodnotu překračovat. V ideálním případě by měla střední úroveň koncentrace vyvolat minimální pozorovatelné toxické účinky. Použije-li se více než jedna mezilehlá úroveň koncentrace, měly by se úrovně lišit tak, aby vyvolaly odstupňované toxické účinky. Ve skupinách s nízkou a střední úrovní dávky a v kontrolních skupinách by měla být četnost uhynutí nízká, aby bylo možné provést smysluplné hodnocení výsledků.

Doba expozice

Denní expozice má trvat 6 hodin od ustavení rovnováhy koncentrace v expoziční komoře. Mají-li být splněny specifické požadavky, musí se zvolit jiná doba.

Zařízení

Pro pokusy se zvířaty by měla být použita inhalační zařízení, která umožňují dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Použije-li se expoziční komora, měla by její konstrukce minimalizovat shlukování pokusných zvířat a maximalizovat jejich inhalační expozici zkoušené látce. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový objem, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory. Lze použít speciální expoziční komory pro orálněnasální expozici nebo pro expozici hlavy nebo pro expozici celého těla; první dva způsoby expozice minimalizují příjem látky jinými cestami.

Doba pozorování

Zvířata se pozorují denně během expozice a zotavování s cílem zaznamenat příznaky toxicity. Zaznamenají se doba uhynutí a čas, ve kterém se objevily a opět odezněly toxické účinky.

▼ B1.6.3 *Postup*

Zvířata se vystaví zkoušené látce denně, pět až sedm dnů v týdnu, po dobu 90 dnů. Zvířata v satelitních skupinách, která jsou určena k následnému pozorování, se pozorují dalších 28 dnů bez aplikace, aby se posoudilo zotavení z otravy nebo přetrvávání toxických účinků. Teplota, při které má být zkouška provedena, by měla být udržována na 22 ± 3 °C. Relativní vlhkost má být v ideálním případě udržována nejlépe mezi 30 % a 70 %, ale v určitých případech to nemusí být realizovatelné (např. u zkoušek některých aerosolů). Během expozice se nepodává potrava ani voda.

Použije se dynamický inhalační systém s vhodným kontrolním analytickým systémem pro regulaci koncentrace. Aby bylo dosaženo vyhovujících koncentrací, doporučuje se provést předběžný experiment. Průtok by měl být nastaven tak, aby zajistil homogenní podmínky v celé expoziční komoře. Systém by měl zajistit, že stálých podmínek expozice bude dosaženo co nejrychleji.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- a) průtok vzduchu (kontinuálně);
- b) skutečná koncentrace zkoušené látky v dýchací zóně. Během denní expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %. U některých aerosolů však nelze této úroveň regulace dosáhnout a připouští se větší rozsah kolísání. Během celé studie mají být každodenní koncentrace co nejstálější. Při vývoji generátoru aerosolu je třeba analyzovat velikosti částic tak, aby byla ustavena stabilní koncentrace aerosolu. Během expozice se co nejčastěji provádí analýza za účelem zjištění konzistence distribuce velikosti částic;
- c) teplota a vlhkost;
- d) během expozice a po jejím ukončení se provádějí a systematicky zaznamenávají pozorování; záznamy se vedou pro každé jednotlivé zvíře. Všechna zvířata se pozorují denně a zaznamenávají se příznaky toxicity, včetně doby jejich nástupu, závažnosti a trvání. Pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování. Měření spotřeby potravy (a spotřeby vody při podávání zkoušené látky v pitné vodě) a hmotnosti zvířat se provádějí týdně. Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Po ukončení doby expozice se pitvají všechna zvířata, která přežila. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

U všech zvířat včetně kontrolních se obvykle provádějí následující vyšetření:

- a) oftalmologické vyšetření oftalmoskopem nebo rovnocenným vhodným přístrojem se provede před podáním zkoušené látky a na konci studie nejlépe u všech zvířat, alespoň však u skupiny s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Jsou-li zjištěny oční změny, vyšetří se všechna zvířata;

▼ B

- b) na konci zkoušky se provede hematologické vyšetření, které má zahrnovat stanovení hematokritu, koncentrace hemoglobinu, počtu erythrocytů, celkového a diferenciálního počtu leukocytů a testy srážlivosti krve, změří se například doba srážlivosti, prothrombinový čas, thrombinový čas nebo počet trombocytů;
- c) na konci zkoušky se provede biochemická analýza krve. Pro tyto studie je vhodné analyzovat koncentraci elektrolytů, metabolismus glycidů, funkci jater a ledvin. Výběr specifických zkoušek bude určen pozorováním způsobu účinku látky. Navrhovaná vyšetření zahrnují stanovení vápníku, fosforu, chloridů, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (délka doby hladovění se volí podle živočišného druhu), hladiny sérové glutamát-pyruvát transaminasy ⁽¹⁾, glutamát-oxalacetát transaminasy ⁽²⁾, ornitindekarboxylasy, gama-glutamyltranspeptidasy, dusíku močoviny, albuminu, kreatininu, celkového bilirubinu a celkových bílkovin v séru. Mezi další stanovení, která mohou být nezbytná pro správné toxikologické hodnocení, patří stanovení lipidů, hormonů, acidobasické rovnováhy, methemoglobinu a aktivity cholinesterasy. Další biochemické analýzy mohou být použity, jelí nezbytné provést širší vyšetření pozorovaných účinků;
- d) analýza moči se běžně nevyžaduje, provádí se pouze na základě očekávané nebo pozorované toxicity.

Pokud nejsou kontrolní údaje z dřívějších pozorování vhodné, zváží se stanovení hematologických a biochemických parametrů ještě před začátkem expozice.

P i t v a

U všech zvířat se provede pitva zahrnující zevní prohlídku povrchu těla, všech tělních otvorů, lební, hrudní a břišní dutiny včetně jejich obsahu. Játra, ledviny, nadledviny a varlata se co nejdříve po sekci zváží, aby nedošlo k vysychání. Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: všechny tkáně s makroskopickými lézemi, plíce – vyjmou se neporušené, zváží se a fixují vhodným médiem tak, aby se zachovala struktura plic (za vhodný postup se považuje perfusní fixace), tkáň nasofaryngu, mozek – v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku, podvěsek mozkový, štítná žláza/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice, plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha (přidatné pohlavní orgány), (kůže), žlučník (je-li přítomen), jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, (samíči mléčná žláza), (stehenní sval), periferní nerv, (oči), hrudní kost s kostní dřeví, (kost stehenní včetně kloubních ploch) a (mícha ve třech úrovních – krční, střední hrudní a bederní). Tkáně v závorkách se vyšetřují pouze v případech, že lze na jejich postižení usuzovat z příznaků toxicity nebo pokud souvisejí s cílovým orgánem.

⁽¹⁾ Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

▼ B**Histopatologická vyšetření**

- a) Úplné histopatologické vyšetření respiračního systému a ostatních orgánů a tkání se provede u všech zvířat kontrolní skupiny a u zvířat skupiny, která byla exponována nejvyšší koncentrací.
- b) Vyšetří se všechny makroskopické léze.
- c) Vyšetří se cílové orgány v jiných dávkových skupinách.
- d) Plice zvířat ve skupinách s nízkou a střední dávkou se histopatologicky vyšetří, neboť to umožňuje vhodné posouzení zdravotního stavu zvířat. Další histopatologická vyšetření se u zvířat těchto skupin nemusí provádět rutinně, musí se však provést vždy na orgánech, na kterých byly zjištěny léze ve skupině s vysokou koncentrací.
- e) V případě použití satelitní skupiny se provede histopatologické vyšetření tkání a orgánů, na kterých byly pozorovány účinky u exponovaných skupin.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, typ lézí a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy lézí. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,

— zkušební podmínky:

popis expozičního zařízení: včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy aerosolů, klimatizačního systému, popis čistění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikosti částic aerosolu.

Údaje o expozici: zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability

(např. směrodatné odchylky) a měly by pokud možno zahrnovat tyto informace:

- a) průtok inhalačním zařízením;
- b) teplota a vlhkost vzduchu;
- c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu);
- d) povaha vehikula, pokud bylo použito;

▼B

- e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;
- f) medián velikostí částic (podle možnosti);
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a koncentrace,
- úroveň bez účinku, pokud ji lze stanovit,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
- popis toxických nebo jiných účinků,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
- údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- provedená biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků případných analýz moči),
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.30 ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se obvykle podává vhodnou cestou sedm dní v týdnu, několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky, po větší část života zvířat. Během expozice zkoušené látky a po expozici se zvířata denně pozorují za účelem sledování projevů toxicity.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1 Příprava**

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

1.6.2 Zkušební podmínky

Pokusná zvířata

Upřednostňuje se potkan.

Na základě předchozích studií je možné použít i jiné druhy (hlodavce nebo nehlodavce). Použijí se mladá zdravá zvířata běžně užívaných laboratorních kmenů a s expozicí se začne co nejdříve po odstavení mláďat.

Na začátku studie by neměly odchylky hmotnosti použitých zvířat překročit $\pm 20\%$ střední hodnoty. Provádí-li se subchronická orální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh, plemeno a kmen.

Počet a pohlaví

U hlodavců se použije nejméně 40 zvířat (20 samic a 20 samců) pro každou úroveň dávky a pro souběžnou kontrolní skupinu. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, zvýší se celkový počet o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie.

▼B

V případě nehlodavců je přijatelný menší počet zvířat, avšak alespoň čtyři od každého pohlaví ve skupině.

Úrovně dávek a frekvence expozic

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a jedna souběžná kontrolní skupina. Nejvyšší úroveň dávky by měla vyvolat zřetelné známky toxicity, ale neměla by způsobit nadměrnou letalitu.

Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádné příznaky toxicity.

Střední dávka (dávky) by měla být zvolena ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Výběr dávek by měl zohledňovat údaje z předchozích zkoušek a studií toxicity.

Zvířata se obvykle exponují denně. Pokud se zkoušená látka podává v pitné vodě nebo v potravě, měla by k nim mít zvířata stálý přístup.

Kontrolní skupiny

Použije se souběžná kontrolní skupina, která je ve všech ohledech identická s exponovanými skupinami, s výjimkou expozice zkoušené látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly, nebo použije-li se pro orální podávání emulgátor, jehož biologická aktivita není charakterizována, nasadí se souběžná neexponovaná kontrolní skupina. S negativní kontrolní skupinou se zachází stejně jako s experimentálními skupinami, pouze se zvířata neexponují zkoušené látce ani žádnému vehikulu.

Způsob podávání

Dvěma hlavními způsoby podávání jsou orální a inhalační podávání. Volba způsobu podávání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách zkoušené látky a pravděpodobném způsobu expozice člověka.

Použití dermální aplikace vyvolává značné praktické problémy. Chronická systémová toxicita v důsledku kožního vstřebání může být obvykle odvozena z výsledku orálního testu a znalostí rozsahu kožního vstřebávání zjištěných z předchozích zkoušek dermální toxicity.

Orální studie

Vstřebává-li se zkoušená látka z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud neexistují důvody proti tomu. Zvířata mohou dostávat zkoušenou látku v potravě, rozpuštěnou v pitné vodě nebo podávanou v kapslích.

▼B**Inhalační studie**

V ideálním případě se látka podává sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k zotavení nebo k návratu toxicity v období bez aplikace, čímž mohou být ovlivněny výsledky a následné hodnocení. Zejména z praktických důvodů se však dávkování pětkrát týdně považuje za přijatelné.

Protože jsou inhalační studie technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o tomto způsobu podávání. Je třeba také poznamenat, že ve specifických situacích může být platnou alternativou intratracheální instilace.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané expozice člověka, přičemž je zvíře obvykle exponováno po ustálení koncentrace v expoziční komoře šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo jde-li o možnou expozici v okolním prostředí, 22–24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou denně pro krmení zvířat ve stejnou denní dobu, která se využije i pro čištění expozičního komory. V obou případech jsou zvířata obvykle exponována neměnným koncentracím zkoušené látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a kontinuální expozicí spočívá v tom, že při první z nich má zvíře 17–18 hodin, během nichž se může zotavit z účinků denní expozice; během víkendu je tato doba ještě delší.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studie a na expozici člověka, která má být simulována. Je však třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Protiváhou výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek okolního prostředí může být nezbytnost zajistit vodu a krmení během expozice a potřeba zajistit komplikovanější (a spolehlivější) přípravu aerosolu a par a monitorovací techniku.

Expoziční komory

Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech ohledech kromě expozice zkoušené látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak, aby nedocházelo k úniku zkoušené látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat stísněnost pokusných zvířat. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový objem, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- i) průtok vzduchu: průtok vzduchu komorou by měl být kontrolován nejlépe kontinuálně;

▼B

- ii) koncentrace: během denní expozice se nemá koncentrace zkoušené látky lišit od střední hodnoty o více než $\pm 15 \%$;

- iii) teplota a vlhkost: pro hlodavce by měla být teplota udržována v rozmezí $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a vlhkost v komorách 30–70 %, kromě případů, kdy je používána k rozptýlení zkoušené látky v atmosféře komory voda. Upřednostňuje se, aby byly kontinuálně kontrolovány oba parametry;

- iv) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly mít respirabilní velikost pro použité zkušební zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna během vývoje generujícího systému tak často, aby se zajistila stabilita aerosolu; během expozice pak tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

Délka studie

Období podávání by mělo trvat nejméně 12 měsíců.

1.6.3e Postup**Pozorování**

Nejméně jednou denně se provádí pečlivé klinické vyšetření. Denně se provádějí dodatečná pozorování s odpovídajícími zákroky k minimalizaci ztrát zvířat ve studii, např. pitva nebo uložení zvířat, která jsou nalezena mrtvá, do lednice a izolace nebo utracení zvířat, která jsou slabá nebo v agónii. Je třeba provádět pečlivá pozorování, aby se spolehlivě zachytil nástup a progresse všech toxických účinků a minimalizovaly se ztráty v důsledku nemoci, autolýzy nebo kanibalismu.

Zaznamenávají se klinické příznaky, včetně neurologických a očních změn u všech zvířat, a dále případy uhynutí. Zaznamenává se doba nástupu a postup toxických příznaků včetně podezření na tumor.

Tělesná hmotnost se zaznamenává individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období zkoušky a alespoň jednou za čtyři týdny po tomto období. Měření spotřeby potravy se provádí týdně během prvních 13 týdnů studie a poté přibližně ve tříměsíčních intervalech, pokud zdravotní stav nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadují jinou četnost měření.

▼B**Hematologická vyšetření**

Hematologická vyšetření (např. obsah hemoglobinu, hematokrit, celkový počet erythrocytů, celkový počet bílých krvinek, krevních destiček nebo jiné ukazatele srážlivosti) se provádějí po třech měsících, šesti měsících a poté přibližně v šestiměsíčních intervalech a po ukončení na vzorcích krve shromážděných od všech nehlodavců a od 10 potkanů každého pohlaví z každé skupiny. Vzorky se ve všech intervalech odeberou pokud možno od stejných potkanů. Kromě toho se před zkouškou odebere vzorek od nehlodavců.

Pokud klinické vyšetření zvířat naznačí zhoršený zdravotní stav zvířat během studie, měl by být stanoven diferenciální obraz bílých krvinek postižených zvířat.

Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje ve vzorcích od zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje u skupiny (skupin) s nejbližší nižší dávkou pouze tehdy, jsou-li mezi skupinou s nejvyšší dávkou a kontrolními skupinami významné odchylky nebo pokud to indikují patologické nálezy.

Analýza moči

Pro analýzu moči se shromažďují vzorky od všech nehlodavců a od 10 potkanů každého pohlaví z každé skupiny, pokud možno od stejných zvířat a ve stejných intervalech jako hematologická vyšetření. U hlodavců se provádějí následující stanovení buď na vzorcích jednotlivých zvířat, nebo na směsném vzorku pro pohlaví/skupinu:

- vzhled moči: objem a hustota u jednotlivých zvířat,
- bílkoviny, glukosa, ketolátky, okultní krvácení (semikvantitativně),
- mikroskopické vyšetření sedimentu (semikvantitativně).

Biochemické vyšetření

V přibližně šestiměsíčních intervalech a po ukončení studie se odeberou krevní vzorky pro biochemická měření od všech nehlodavců a od 10 potkanů obojího pohlaví z každé skupiny, pokud možno od týchž potkanů v každém intervalu. Kromě toho se před zkouškou odebere vzorek od nehlodavců. z těchto vzorků se připraví plasma a provedou se následující zkoušky:

- celková koncentrace bílkovin,
- koncentrace albuminu,
- testy na funkci jater (např. aktivita basické fosfatasy, aktivita glutamát-pyruvát-transaminasy ⁽¹⁾ glutamát-oxalacetát-transaminasy, gama-glutamyltranspeptidasy ⁽²⁾, ornitindekarboxylasy,
- metabolismus glycidů, např. glukosa v krvi na lačno,

⁽¹⁾ Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

⁽²⁾ Nyní známá jako aspartátaminotransferasa.

▼B

— testy na funkci ledvin, např. dusík močoviny v krvi.

Pitva

U všech zvířat, včetně těch, která uhynula během zkoušky nebo byla utracena v agónii, se provede pitva. Před utracením se odeberou vzorky krve všech zvířat pro diferenciální obraz bílých krvinek. Všechny viditelné léze, tumory nebo léze, které by mohly být tumory, se uchovávají. Měl by být proveden pokus porovnat anatomicko-patologické změny s mikroskopickými nálezy.

Všechny orgány a tkáně se uchovávají pro histopatologické vyšetření. To se obvykle týká následujících orgánů a tkání: mozek ⁽¹⁾ (v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku), podvěsek mozkový, štítná žláza (včetně příštítných tělísek), thymus, plíce (včetně průdušnice), srdce, aorta, slinné žlázy, játra ⁽¹⁾, slezina, ledviny ⁽¹⁾, nadledviny ⁽¹⁾, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, děloha, močový měchýř, lymfatické uzliny, slinivka, gonády ⁽¹⁾, přídavné pohlavní orgány, samičí mléčné žlázy, kůže, svalovina, periferní nerv, mícha (krční, hrudní a bederní), sternum s kostní dřeví a stehenní kost (včetně kloubu) a oči. Optimálním způsobem konzervace plic a močového měchýře je jejich naplnění fixativem; naplnění plic v inhalačních studiích má zásadní význam pro odpovídající histopatologické vyšetření. Ve speciálních studiích, jako jsou inhalační studie, se studuje celý respirační trakt včetně nosu, hltanu a hrtanu.

Byla-li provedena jiná klinická vyšetření, měly by být informace získané z těchto procedur k dispozici před mikroskopickým vyšetřením, protože mohou být patologovi významným vodítkem.

Histopatologická vyšetření

Všechny viditelné změny, zejména tumory a jiné léze vyskytující se v kterémkoli orgánu, se zkoumají mikroskopicky. Kromě toho se doporučují následující postupy:

a) mikroskopické vyšetření všech uchovaných orgánů a tkání s kompletním popisem všech lézí nalezených:

- 1) u všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během studie,
- 2) u všech zvířat ze skupiny s vysokou dávkou a z kontrolní skupiny;

b) orgány či tkáně vykazující abnormality způsobené nebo pravděpodobně způsobené zkoušenou látkou se zkoumají také ve skupinách s nižšími dávkami;

c) prokazují-li výsledky významné zkrácení normální délky života zvířat nebo vyvolání účinků, které by mohly ovlivnit toxickou reakci, vyšetří se výše popsaným způsobem skupina s nejbližší nižší dávkou;

⁽¹⁾ Tyto orgány odebrané deseti zvířatům každého pohlaví u hlodavců a všem nehlodavcům, a dále štítná žláza (včetně příštítných tělísek) od všech nehlodavců, se zváží.

▼B

d) informace o výskytu lézí, které se obvykle vyskytují v použitém kmeni zvířat za stejných laboratorních podmínek, tj. údaje o kontrolách z dřívějších studií, jsou nezbytné pro správné posouzení významnosti změn pozorovaných u exponovaných zvířat.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy lézí. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,
- zkušební podmínky:

3.1.1 Popis expozičního zařízení:

Včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy částic a aerosolů, klimatizačního systému, popis čištění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikostí částic aerosolu.

3.1.2 Údaje o expozici:

Zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky); měly by zahrnovat tyto informace:

- a) průtok inhalačním zařízením;
 - b) teplota a vlhkost vzduchu;
 - c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu);
 - d) druh vehikula, pokud bylo použito;
 - e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;
 - f) medián velikosti částic (podle možnosti);
- úroveň dávek (včetně vehikula, je-li použito) a koncentrace,
 - údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky,
 - úroveň bez účinku,
 - doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,

▼ B

- popis toxických nebo jiných účinků,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
- údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
- oftalmologické nálezy,
- provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- provedená biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků případných analýz moči),
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.31 STUDIE PRENATÁLNÍ VÝVOJOVÉ TOXICITY****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 414 (2001).

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení vývojové toxicity je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinku prenatální expozice na březí pokusné zvíře a na organismus vyvíjející se v děloze; tyto informace mohou zahrnovat jak hodnocení účinku na matku, tak i vliv na uhynutí, strukturální odchylky nebo změněný růst plodu. I když funkční poruchy tvoří významnou část vývoje, nejsou součástí této metody. Zkoušky na tyto poruchy mohou být prováděny v samostatné studii nebo jako doplněk této studie pomocí zkušební metody vývojové neurotoxicity. Informace o zkoušení funkčních poruch a jiných postnatálních účinků lze v případě potřeby získat z dvougenerační zkoušky toxicity pro reprodukci a zkoušky vývojové neurotoxicity.

Tato zkušební metoda může ve specifických případech vyžadovat určitou úpravu na základě specifických znalostí, např. fyzikálně-chemických nebo toxikologických vlastností zkoušené látky. Tato úprava je přijatelná, jestliže přesvědčivé vědecké důkazy svědčí o tom, že díky ní bude mít zkouška vyšší vypovídací hodnotou. V takovém případě je třeba tyto vědecké důkazy pečlivě zdokumentovat ve zprávě o studii.

1.2 DEFINICE

Vývojová toxikologie: studie nepříznivých účinků na vyvíjející se organismus, které mohou vyplývat z expozice před početím, během prenatálního vývoje nebo v postnatálním období až do doby pohlavní zralosti. Hlavní projevy vývojové toxicity zahrnují: 1) úhyn organismu, 2) strukturální odchylky, 3) změněný růst a 4) funkční poruchu. Vývojová toxikologie se původně nazývala teratologie.

Nepříznivý účinek: jakákoliv odchylka od normálního stavu spojená se zkouškou, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo se přizpůsobit prostředí. Pokud jde o vývojovou toxikologii v nejširším slova smyslu, zahrnuje tento pojem jakýkoliv účinek, který brání normálnímu vývoji plodu, a to jak před narozením, tak i po něm.

Změněný růst: změna hmotnosti nebo velikosti orgánu nebo těla u potomstva.

Odchylky (anomálie): strukturální změny ve vývoji, které zahrnují jak malformace, tak i odchylky (28).

Malformace/velká odchylka: strukturální změna považovaná za škodlivou pro zvíře (může být i letální); obvykle je vzácná.

▼ B

Malformace/malá odchylka: strukturální změna, která nemá žádný nebo má jen malý škodlivý účinek na zvíře; může být přechodná a u kontrolní populace se může vyskytovat poměrně často.

Zárodek: celkové množství derivátů oplodněného vajíčka v jakékoli fázi vývoje od oplodnění až do narození, včetně dalších zárodečných membrán, embrya nebo plodu.

Implantace (nidace): přichycení blastocytu k epitelové výstelce dělohy, včetně její penetrace do děložního epitelu a zahnízdění v děložní sliznici.

Embryo: raná nebo vývojová fáze organismu, a to zvláště plod vyvíjející se po oplodnění vajíčka poté, co se objeví dlouhá osa a dokud nejsou přítomné všechny hlavní struktury.

Embryotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst a/nebo životaschopnost embrya.

Zárodek: nenarozený potomek v post-embryonálním období.

Fetotoxicita: toxicita škodlivá pro normální strukturu, vývoj, růst a/nebo životaschopnost plodu.

Potrat: předčasné vyloučení produktů oplodnění – embrya nebo plodu neschopného života – z dělohy.

Resorpce: zárodek, který po implantaci do dělohy později odumřel a vstřebává se nebo se již vstřebal.

Raná resorpce: důkaz o zahnízdění (implantaci) bez rozeznatelného embrya/plodu.

Pozdní resorpce: mrtvé embryo nebo plod se zevními degenerativními změnami.

NOAEL: zkratka pro hladinu bez pozorovaného nepříznivého účinku; odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé nálezy související s podáním látky.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKA

Žádná.

1.4 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Obvykle se zkoušená látka podává březím zvířatům nejpozději od implantace až do dne před plánovaným usmrcením, který by se měl co nejvíce přiblížit očekávanému dni vrhu, aniž se riskuje ztráta údajů v důsledku předčasného vrhu. Zkušební metoda není určena výhradně ke zkoumání období organogeneze (např. 5.–15. den u hlodavce a 6.–18. den u králíka), ale popřípadě rovněž ke zkoumání účinků před implantací, pro celé období gestace a až do dne před císařským řezem. Krátce před císařským řezem se samice usmrtí, prozkoumá se děložní obsah a u plodů se vyhodnotí zevní viditelné anomálie, změny měkkých tkání a skeletu.

▼ B

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 Výběr živočišných druhů

Doporučuje se provádět zkoušení s nejvhodnějšími druhy a využívat laboratorní druhy a kmeny, které se běžně používají při zkoušení prenatální vývojové toxicity. Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan a upřednostňovaným druhem nehlodavce je králík. Použití jiného druhu je třeba odůvodnit.

1.5.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C ($\pm 3^\circ$) pro hlodavce 18 °C ($\pm 3^\circ$) pro králíky, relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

Páření by mělo probíhat v klecích vhodných k tomuto účelu. I když se dává přednost individuálnímu chovu spárených zvířat, přípustný je rovněž chov v malých skupinkách.

1.5.3 Příprava zvířat

Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 5 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a/nebo stáří. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech testovaných skupin stejnou hmotnost a věk. Pro každou úroveň dávek se použijí mladé dospělé samice, které by měly být nullipary. Samice se spáří se samci stejného druhu a kmene a nemělo by docházet k páření sourozenců. U hlodavců je nultým dnem gestace den, kdy se pozoruje vaginální zátka a/nebo sperma; u králíků je dnem 0 obvykle den páření nebo umělé inseminace, pokud se tato metoda používá. Oplodněné samice se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti se přidělí vlastní identifikační číslo. Náhodným výběrem se oplodněné samice rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin, a jsou-li samice pářeny v sadách, rozdělí se zvířata z jednotlivých sad rovnoměrně do všech skupin. Stejně tak se do všech skupin rozdělí samice oplodněné stejným samcem.

1.6 POSTUP

1.6.1 Počet a pohlaví zvířat

Každá experimentální a kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet samic, abych se při pitvě získalo přibližně 20 samic s implantací plodu. Skupiny s méně než 16 zvířaty s implantací plodu nejsou vhodné. Mortalita samic nemusí nutně znamenat znehodnocení studie za předpokladu, že nepřekročí přibližně 10 %.

▼B**1.6.2 Příprava dávek**

Pokud se pro usnadnění dávkování používá vehikulum nebo jiná přísada, je třeba vzít v úvahu následující typické znaky: vliv na absorpci, distribuci, metabolismus a retenci nebo vylučování zkoušené látky; vliv na chemické vlastnosti zkoušené látky, která může pozměnit svoje toxické znaky, a vliv na spotřebu potravy nebo vody anebo nutričního stavu zvířat. Vehikulum by nemělo být ani vývojově toxické, ani by nemělo mít vliv na rozmnožování.

1.6.3 Dávkování

Zkoušená látka se obvykle podává denně od implantace (např. pátý den po spáření) až do dne před plánovaným císařským řezem. Pokud z případných předběžných studií nevyplývá vysoký potenciál předimplantační ztráty, lze aplikaci prodloužit tak, aby zahrnovala celé období gestace, od spáření až do dne před plánovaným usmrcením. Je známo, že nevhodné zacházení nebo stres během březosti může vést k prenatální ztrátě. S cílem zabránit prenatálním ztrátám z důvodů, které nejsou spojeny s expozicí, je nutné zamezit jak nadbytečné manipulaci se zvířaty, tak i stresu způsobenému zevními faktory, jako je např. hluk.

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Zdravá zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin. Úrovně dávek se rozloží tak, aby byly toxické účinky odstupňovány. Pokud neexistuje žádné omezení fyzickou/chemickou podstatou nebo biologickými vlastnostmi zkoušené látky, zvolí se nejvyšší dávka s cílem vyvolat určitou vývojovou toxicitu a/nebo toxicitu pro matku (klinické znaky nebo snížení tělesné hmotnosti), ale nikoliv uhynutí nebo značné utrpení. Alespoň jedna střední úroveň dávky by měla vyvolat minimální zjiřitelné toxické účinky. Nejnižší úroveň dávky by neměla vyvolat žádnou prokazatelnou toxicitu pro matku ani vývojovou toxicitu. S ohledem na prokázání jakékoli reakce související s dávkováním a s úrovní dávky bez pozorovaného nepříznivého účinku (NOAEL) by se měla zvolit sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální dvoj- až čtyřnásobné intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté exponované skupiny než používání velkých intervalů mezi dávkami (např. lišících se faktorem 10). Ačkoliv je cílem stanovit hodnotu NOAEL pro samici, přijatelné jsou rovněž studie, které tuto hodnotu nestanoví (1).

Při výběru úrovní dávek je třeba brát v úvahu jakékoli existující údaje o toxicitě a také jako další informace o metabolismu a toxikokinetice zkoušené látky nebo látek příbuzných. Tyto informace pomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

Použije se souběžná kontrolní skupina. Tato skupina by měla tvořit zdánlivě léčenou kontrolní skupinu nebo kontrolní skupinu s vehikulem, pokud se vehikulum při podávání zkoušené látky používá. Všem skupinám se podává stejné množství zkoušené látky nebo vehikula. Se zvířaty v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) se zachází stejně jako se zvířaty v experimentální skupině. Kontrolní skupina s vehikulem by měla dostat vehikulum v nejvyšším používaném množství (jako u experimentální skupiny s nejnižší dávkou).

▼B**1.6.4 Limitní zkouška**

Pokud zkouška na jedné úrovni dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den při orálním podávání nevyvolá při použití postupů předepsaných pro tuto studii žádnou zjistitelnou toxicitu ani u březích zvířat, ani u jejich plodů, a pokud se neočekává účinek ani na základě existujících údajů (např. o sloučeninách s podobnou strukturou a/nebo metabolismem), není nutné uvažovat o kompletní studii využívající tři úrovně dávek. Je možné, že předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky (např. kožní aplikace by neměla způsobit závažnou lokální toxicitu).

1.6.5 Aplikace dávek

Zkoušená látka nebo vehikulum se obvykle podává orálně intubací. Pokud se používá jiný způsob aplikace látky, měl by experimentátor volbu zdůvodnit a objasnit, přičemž možná bude nutné provést odpovídající změny (2, 3, 4). Zkoušená látka se podává každý den přibližně ve stejnou dobu.

Dávka pro jednotlivá zvířata obvykle vychází z aktuální zjištěné tělesné hmotnosti. Je však nutné věnovat velkou pozornost úpravě dávky během posledního trimestru březosti. Dávka by se měla zvolit na základě existujících údajů, aby se zabránilo nadměrné toxicitě u samic. Pokud je však u ošetřovaných samic zaznamenána nadměrná toxicita, tato zvířata se humánně utratí. Pokud několik březích zvířat vykazuje známky nadměrné toxicity, mělo by se zvážit utracení této skupiny. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se zvířatům podávat ve formě jediné dávky pomocí hadičky k výplachu žaludku nebo vhodné intubační kanyly. Maximální objem kapaliny, kterou lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Toto množství by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti, s výjimkou vodných roztoků, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Pokud se jako vehikulum používá kukuřičný olej, nemělo by množství překročit 0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kolísání v množství zkoušené látky by se měla omezit nastavením koncentrací tak, aby se zajistilo konstantní množství na všech úrovních dávek.

1.6.6 Sledování samic

Klinická pozorování se provádějí a zaznamenávají minimálně jednou denně, a to každý den nejlépe ve stejnou dobu, a přihlédne se k době vrcholícího předpokládaného účinku po dávkování. Zaznamená se stav zvířat včetně mortality, agónie, relevantních změn chování a všech příznaků zjevné toxicity.

1.6.7 Tělesná hmotnost a spotřeba potravy

Zvířata se zváží během nultého dne gestace anebo nejpозději třetí den gestace, pokud externí chovatel dodává zvířata spářená ve stejnou dobu, první den podávání látky a minimálně každý třetí den v období podávání látky a dále v den plánovaného usmrcení.

▼B

Spotřeba potravy se zaznamená v třídením intervalu a měla by se shodovat se dny zjišťování tělesné hmotnosti.

1.6.8 Pitva

Samice se usmrtí jeden den před očekávaným dnem vrhu. Samice vykazující známky potratu nebo předčasného vrhu předcházejícího plánovanému usmrcení se usmrtí a podrobí důkladnému makroskopickému vyšetření.

Samice se v okamžiku usmrcení nebo úhynu během studie makroskopicky vyšetří na strukturní odchylky nebo patologické změny. S cílem minimalizovat neobjektivnost se posuzování samic během císařského řezu a následná fetální analýza provedou pokud možno bez znalosti experimentální skupiny.

1.6.9 Vyšetření děložního obsahu

Okamžitě po usmrcení nebo co nejdříve po uhynutí se samicím vyjme děloha a zjistí se stav březosti. Dělohy, které nesvědčí o graviditě, se dále vyšetří (např. pomocí barvení sulfidem amonným u hlodavců a pomocí Salewského barvení nebo vhodnou alternativní metodou u králíků) a potvrdí se negravidní stav (5).

Gravidní děloha včetně děložního hrdla se zváží. Hmotnost gravidní dělohy by se neměla zjišťovat u zvířat, která během studie uhynula.

U březích zvířat se zjistí počet žlutých tělísek.

U děložního obsahu se vyšetří počet úhynů embrya nebo plodu a počet životaschopných plodů. Popíše se stupeň resorpce, aby bylo možné odhadnout relativní dobu uhynutí zárodku (viz část 1.2).

1.6.10 Vyšetření plodů

Zjistí se pohlaví a tělesná hmotnost každého plodu.

U každého plodu se vyšetří zevní odchylky (6).

U plodů se vyšetří změny kostry a měkkých tkání (např. odchylky a malformace nebo anomálie) (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Kategorizace fetálních změn je vhodná, ale nikoli nezbytná. Pokud se kategorizace provede, měla by se jasně stanovit kritéria definování jednotlivých kategorií. Zvláštní pozornost je třeba věnovat rozmnožovací soustavě, která se vyšetří na přítomnost známek změněného vývoje.

U hlodavců se pitvá přibližně polovina každého vrhu, u něhož se vyšetří změny skeletu. Zbytek se pitvá a vyšetří na přítomnost změn měkkých tkání pomocí uznaných nebo vhodných metod postupných histologických řezů nebo důkladné pitvy.

▼ B

U nehlodavců, např. králíků, se prozkoumají jak změny měkkých tkání, tak změny skeletu všech plodů. Opatrným oddělením tkání se u těchto plodů vyšetří změny měkkých tkání, přičemž pitva může zahrnovat i postupy pro další vyhodnocení vnitřní stavby srdce (25). Hlavy poloviny plodů zkoumaných tímto způsobem se oddělí a použijí se k vyhodnocení změn měkkých tkání (včetně očí, mozku, nosních dutin a jazyka), a to pomocí standardních metod postupného segmentování (26) nebo stejně citlivých metod. Těla těchto i zbývajících neporušených plodů se pitvají a vyšetří na přítomnost změn skeletu za použití stejných metod popsaných pro hlodavce.

2. ÚDAJE**2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Výsledky se zaznamenají do tabulky samostatně pro samice a pro jejich potomky a u každé pokusné skupiny a každé generace se uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humánních důvodů, doba úhynu nebo humánního utracení, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis příznaků zjištěné toxicity včetně nástupu, trvání a závažnosti případných toxických účinků, typy pozorování embryí/plodů a všechny důležité údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou, přičemž jako jednotka analýzy dat se použije vrh. Použije se všeobecně uznávaná statistická metoda; zvolí se jako součást návrhu studie a musí být zdůvodněna. Rovněž se uvedou údaje získané u zvířat, která nepřežila až do plánovaného usmrcení. Tyto údaje lze v případě potřeby zahrnout do skupinového průměru. Význam údajů získaných od těchto zvířat i jejich zahrnutí nebo nezahrnutí do průměru skupiny by měly být odůvodněny a individuálně posouzeny.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky studie prenatalní vývojové toxicity se vyhodnotí na základě zjištěných účinků. Vyhodnocení bude obsahovat následující informace:

— výsledky zkoušky u samic a embrya/plodu, včetně hodnocení vazeb nebo jejich absence mezi expozicí zvířat zkoušené látky a výskytem a závažností všech nálezů,

— kritéria používaná pro kategorizaci zevních změn, změn měkkých tkání a skeletu u plodu, pokud byla tato kategorizace provedena,

▼B

- případně předchozí kontrolní údaje ke snazšímu objasnění výsledků studie,
- číselné hodnoty používané při výpočtu všech procentuálních hodnot nebo koeficientů,
- případně odpovídající statistickou analýzu výsledků studie, která by měla zahrnovat dostatečné informace o metodě analýzy, aby nezávislý posuzovatel/statistik mohl tuto analýzu přehodnotit a zrekonstruovat.

U studií, které prokazují nepřítomnost toxických účinků, je třeba zvážit další zkoušky pro zjištění absorpce a biologické dostupnosti zkoušené látky.

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Studie prenatalní vývojové toxicity poskytuje informace o účinku opakované expozice látce na březí samice a na nitroděložní vývoj jejich potomstva. Výsledky studie by měly být objasněny v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Vzhledem k tomu, že se klade důraz jak na výslednou všeobecnou toxicitu z hlediska matky, tak i na vývojovou toxicitu, umožní výsledky této studie do určité míry rozlišit mezi vývojovými účinky vyskytujícími se v nepřítomnosti všeobecné toxicity a mezi účinky vyvolanými pouze na úrovních, které jsou toxické i pro březí zvířata (27).

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující specifické informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha, a je-li to podstatné, fyzikálně-chemické vlastnosti,
- identifikační údaje, včetně čísla CAS, je-li známo nebo přiděleno,
- čistota.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet a stáří zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava atd.,
- individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění výběru úrovně dávky,
- podrobné údaje o přípravě složení zkoušené látky/stravy, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,

▼ B

- podrobné údaje o podávání zkoušené látky,
- v případě potřeby přepočet koncentrace zkoušené látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,
- podmínky prostředí,
- podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

Výsledky:

Údaje o toxických reakcích matky podle dávky, např.:

- počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat, která přežila, počet březích zvířat, počet zvířat, která potratila, a počet zvířat, která předčasně vrhla,
- den úhynu během studie anebo zda zvířata přežila až do dne usmrcení,
- uvedou se údaje o zvířatech, která nepřežila do plánovaného usmrcení, nezahrnou se však do statistických srovnání dat pro skupiny,
- den zjištění každého abnormálního klinického příznaku a jeho následný průběh,
- tělesná hmotnost, změna tělesné hmotnosti a hmotnost gravidní dělohy, včetně případných údajů o změně tělesné hmotnosti korigované o hmotnost gravidní dělohy,
- spotřeba potravy, a měří-li se, spotřeba vody,
- pitevní nálezy včetně děložní hmotnosti,
- zaznamenají se hodnoty NOAEL účinků na matku a vývojové účinky.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s implantáty, včetně:

- počtu žlutých tělísek,
- počtu zahníždění, počtu a procenta živých a mrtvých plodů a resorpcí,
- počtu procentuálního podílu pre- a postimplantačních ztrát.

Ukazatele vývojové toxicity podle dávky pro vrhy s živými plody, včetně:

- počtu a procentuálního podílu živých potomků,
- poměru pohlaví,
- fetální tělesné hmotnosti, pokud možno podle pohlaví a pro obě pohlaví dohromady,
- zevních malformací, malformací měkkých tkání a skeletu a jiných významných odchylek,
- případně kritérií kategorizace,

▼B

— celkového počtu a procentuálního podílu plodů a vrhů s jakýmkoli zevními a kosterními odchylkami, odchylkami měkkých tkání a rovněž typů a výskytů individuálních anomálií a jiných významných odchylek.

Diskuse o výsledcích.

Závěry.

4. LITERATURA

- 1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.
- 2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386–398.
- 3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Attivites* 17; 1–8.
- 4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- 5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247; 367.
- 6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- 7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.
- 8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381–391.
- 9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229–242.
- 10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- 11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291–306.
- 12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.
- 13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398–408.
- 14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.
- 15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.

▼ B

- 16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual*, s. 163–173.
- 17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.
- 18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red s Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.
- 19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.
- 20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.
- 21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- 22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, s. 251–277.
- 23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- 24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233–239.
- 25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.
- 26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, s. 126–144.
- 27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798–63826.
- 28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249–292.

▼B**B.32 ZKOUŠKA KARCINOGENITY****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává obvykle sedm dní v týdnu vhodnou cestou několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky, po větší část života zvířat. Během expozice zkoušené látky a po expozici se zvířata denně pozorují za účelem sledování projevů toxicity, zejména vývinu tumoru.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

1.6.1 Pokusná zvířata

Na základě předchozích studií je možné použít i jiné druhy (hlodavce nebo nehlodavce). Používají se mladá zdravá zvířata běžně chovaných kmenů laboratorních zvířat. Expozice by měla být započata co nejdříve po odstavení mláďat.

Na začátku studie by neměly odchylky hmotnosti použitých zvířat překročit ± 20 % střední hodnoty. Provádí-li se subchronická orální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh, plemeno a kmen.

1.6.2 Počet a pohlaví

U hlodavců se použije nejméně 100 zvířat (50 samic a 50 samců) pro každou úroveň dávky a pro souběžnou kontrolní skupinu. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, zvýší se celkový počet o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie.

▼B**1.6.3 Úrovně dávek a frekvence expozic**

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a jedna souběžná kontrolní skupina. Nejvyšší úroveň dávky by měla vyvolat příznaky minimální toxicity, jako je mírný pokles váhových přírůstků (méně než 10 %), bez podstatnějších změn normální doby života v důsledku jiných účinků než tumorů.

Nejnižší úroveň dávky by neměla mít vliv na normální růst, vývoj a délku života zvířete nebo vyvolat jakékoli známky toxicity. Obecně by neměla být nižší než 10 % nejvyšší dávky.

Střední dávka (dávky) by měla být zvolena ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Výběr úrovní dávek by měl zohledňovat údaje z předchozích zkoušek a studií toxicity.

Zvířata se obvykle exponují denně.

Pokud se zkoušená látka podává v pitné vodě nebo v potravě, měla by k nim mít zvířata stálý přístup.

1.6.4 Kontrolní skupiny

Použije se souběžná kontrolní skupina, která je ve všech ohledech identická s exponovanými skupinami, s výjimkou expozice zkoušené látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly, nebo použije-li se pro orální podávání emulgátor, jehož biologická aktivita není charakterizována, nasadí se další kontrolní skupina, která není exponována vehikulu.

1.6.5 Způsob podávání

Třemi hlavními způsoby podávání jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Volba způsobu podávání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách zkoušené látky a pravděpodobném způsobu expozice člověka.

1.6.5.1 Orální studie

Vstřebává-li se zkoušená látka z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud neexistují důvody proti tomu. Zvířata mohou dostávat zkoušenou látku v potravě, rozpuštěnou v pitné vodě nebo podávanou v kapslích.

V ideálním případě se látka podává sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k zotavení nebo k návratu toxicity v období bez aplikace, čímž mohou být ovlivněny výsledky a následné hodnocení. Zejména z praktických důvodů se však dávkování pětkrát týdně považuje za přijatelné.

1.6.5.2 Dermální studie

Dermální expozice nanesením přímo na kůži může být zvolena jako simulace hlavní cesty expozice u člověka a jako modelový systém vyvolání kožních lézí.

▼B1.6.5.3 *Inhalační studie*

Protože jsou inhalační studie technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o tomto způsobu podávání. Je třeba poznamenat, že ve specifických situacích může být platnou alternativou intratracheální instilace.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané expozice člověka, přičemž je zvíře obvykle exponováno po ustálení koncentrace v inhalační komoře šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo jde-li o možnou expozici v okolním prostředí, 22–24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou denně pro krmení zvířat ve stejnou denní dobu, která se využije i pro čištění expozičního komory. v obou případech jsou zvířata obvykle exponována neměnným koncentracím zkoušené látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a kontinuální expozicí spočívá v tom, že při první z nich má zvíře 17–18 hodin, během nichž se může zotavit z účinků denní expozice; během víkendu je tato doba ještě delší.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studie a na expozici člověka, která má být simulována. Je však třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Protiváhou výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek okolního prostředí může být nezbytnost zajistit vodu a krmení během expozice a potřeba zajistit komplikovanější (a spolehlivější) přípravu aerosolu a par a monitorovací techniku.

1.6.6 *Expoziční komory*

Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřený obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech ohledech kromě expozice zkoušené látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak, aby nedocházelo k úniku zkoušené látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat stísněnost pokusných zvířat. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory.

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- i) průtok vzduchu: průtok vzduchu komorou by měl být kontrolován nejlépe kontinuálně,
- ii) koncentrace: během denní expozice se nemá koncentrace zkoušené látky lišit od střední hodnoty o více než ± 15 %; Každodenní koncentrace mají být během celé studie co nejstálejší,

▼B

- iii) teplota a vlhkost: pro hlodavce by měla být teplota udržována v rozmezí 22 ± 2 °C a vlhkost v komorách 30–70 %, kromě případů, kdy je používána k rozptýlení zkoušené látky v atmosféře komory voda. Upřednostňuje se, aby byly oba parametry kontrolovány kontinuálně,
- iv) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly mít respirabilní velikost pro použité zkušební zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna během vývoje generujícího systému tak často, aby se zajistila stabilita aerosolu; během expozice pak tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

1.6.7 Délka studie

Zkouška karcinogenity zahrnuje větší část obvyklé doby života pokusných zvířat. Zkouška by měla být ukončena po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana; u některých kmenů zvířat s delší dobou života a/nebo s nízkým spontánním výskytem tumorů by však měla být ukončena po 24 měsících (u myši a křečka) a po 30 měsících (u potkana). Ukončení takové prodloužené studie je také přijatelné, pokud počet přeživajících zvířat ve skupině s nejnižší dávkou nebo v kontrolní skupině klesne na 25 %. Při ukončení zkoušky, ve které je zřetelný rozdíl v reakci u různých pohlaví, se každé pohlaví posuzuje zvlášť. Pokud předčasně uhynie ze zjevných toxických příčin jen skupina s vysokou dávkou, nemusí to nutně vést k ukončení celé zkoušky za předpokladu, že toxické projevy nečiní problémy u ostatních skupin. Negativní výsledek zkoušky lze uznat, pokud nejsou ztráty zvířat v důsledku autolýzy, kanibalismu nebo laboratorně-technických chyb v žádné skupině větší než 10 % a přežití ve všech skupinách neklesne pod 50 % po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana.

1.6.8 Postup

1.6.8.1 Pozorování

Denní pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomie a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování.

Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat, např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Zvířata nalezená v agónii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

▼ B

Klinické příznaky a mortalita se zaznamenávají u všech zvířat. Zvláštní pozornost se věnuje vývoji tumorů: doba objevení, lokalizace, rozměry, vzhled a progresse každého viditelného nebo hmatného tumoru se zaznamenává.

Měření spotřeby potravy (a vody, je-li zkoušená látka podávána v pitné vodě) se provádí týdně během prvních 13 týdnů studie a poté přibližně v tříměsíčních intervalech, pokud zdravotní stav nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadují jinou četnost měření.

Tělesná hmotnost se zaznamenává individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období zkoušky a alespoň jednou za čtyři týdny po tomto období.

1.6.8.2 *Klinická vyšetření**Hematologie*

Pokud pozorování zvířat v klecích svědčí o zhoršeném zdravotním stavu zvířat během studie, provede se stanovení diferenciálního obrazu bílých krvinek postižených zvířat.

Po 12 měsících, 18 měsících a před utracením zvířat se provede krevní nátěr od všech zvířat. Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje ve vzorcích od zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Pokud je to podle údajů, zejména údajů získaných před utracením nebo údajů z vyšetření patologických změn, nutné, vyšetří se diferenciální obraz i u skupiny s nejbližší nižší dávkou.

Pitva

U všech zvířat, včetně těch, která uhynula během zkoušky nebo byla utracena v agónii, se provede kompletní pitva. Všechny viditelné tumory nebo léze nebo léze, které by mohly být tumory, se uchovávají.

Následující orgány a tkáně je třeba přechovávat ve vhodném médiu s ohledem na možná pozdější histopatologická vyšetření: mozek (v řezech medula/pons, kůra mozku a mozečku), podvěsek mozkový, štítná žláza/příštítná tělíska, všechny thymické tkáně, průdušnice a plíce, srdce, aorta, slinné žlázy, játra, slezina, ledviny, nadledviny, slinivka břišní, gonády, děloha, přídatné pohlavní orgány, kůže, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, reprezentativní lymfatické uzliny, samičí mléčná žláza, stehenní sval, periferní nerv, hrudní kost s kostní dřeví, kost stehenní (včetně kloubu), mícha ve třech úrovních (krční, střední hrudní a bederní) a oči.

Optimálním způsobem konzervace plic a močového měchýře je jejich naplnění fixativem; naplnění plic v inhalačních studiích má zásadní význam pro odpovídající histopatologické vyšetření. v inhalačních studiích se uchovává celý respirační trakt včetně dutiny nosní, hltanu a hrtanu.

▼ B**Histopatologická vyšetření**

- a) Úplné histopatologické vyšetření orgánů a tkání se provede u všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během studie, u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny.
- b) Všechny tumory viditelné okem a léze, které by mohly být tumory, se mikroskopicky vyšetří u všech skupin.
- c) Je-li významný rozdíl ve výskytu neoplastických lézí mezi skupinou s vysokou dávkou a kontrolní skupinou, provede se histopatologické vyšetření v daném orgánu či tkáni i v dalších skupinách.
- d) Je-li přežití ve skupině s vysokou dávkou podstatně nižší než u kontrolní skupiny, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší nižší dávkou.
- e) Jsou-li ve skupině s vysokou dávkou důkazy o vyvolání toxic-
kých nebo jiných účinků, které by mohly ovlivnit neoplastickou
odpověď, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší
nižší úrovní dávky.

2. ÚDAJE

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících tumory zjištěné během zkoušky, doba jejich zjištění a počet zvířat s tumory po utracení. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,

— zkušební podmínky:

3.1.1 Popis expozičního zařízení:

Včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy částic a aerosolů, klimatizačního systému, popis čištění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíše se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikostí částic aerosolu.

▼ B

3.1.2 Údaje o expozici

Zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky); měly by zahrnovat tyto informace:

- a) průtok inhalačním zařízením;
 - b) teplota a vlhkost vzduchu;
 - c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu);
 - d) druh vehikula, pokud bylo použito;
 - e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;
 - f) medián velikosti částic (podle možnosti);
- úroveň dávek (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace,
 - incidence tumorů podle pohlaví, dávky a typu tumoru,
 - doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování,
 - výskyt toxických účinků podle pohlaví a dávky,
 - popis toxických nebo jiných účinků,
 - doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
 - údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
 - provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,
 - pitevní nálezy,
 - podrobný popis všech histopatologických nálezů,
 - statistické zpracování výsledků a popis použitých metod,
 - diskuse o výsledcích,
 - interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.33 KOMBINOVANÁ ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY A KARCINOGENITY****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Cílem kombinované zkoušky chronické toxicity/karcinogenity je stanovit chronické a karcinogenní účinky látky u některého druhu savců po dlouhodobé expozici.

Pro tento účel je zkouška karcinogenity doplněna alespoň jednou exponovanou satelitní skupinou a kontrolní satelitní skupinou. Dávka použitá pro tuto exponovanou satelitní skupinu může být vyšší než nejvyšší dávka použitá při zkoušce karcinogenity. Zvířata ve zkoušce karcinogenity se vyšetřují jak na obecnou toxicitu, tak na reakci na karcinogenní účinky. Zvířata v exponované satelitní skupině se vyšetřují na obecnou toxicitu.

Zkoušená látka se podává obvykle sedm dní v týdnu vhodnou cestou několika skupinám pokusných zvířat, každé skupině jedna úroveň dávky, po větší část života zvířat. Během expozice zkoušené látky a po expozici se pokusná zvířata denně pozorují za účelem sledování projevů toxicity, zejména vývinu tumoru.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a krmení, v jakých budou během experimentu. Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin.

1.6.1 Pokusná zvířata

Upřednostňuje se potkan. Na základě předchozích studií je možné použít i jiné druhy (hlodavce nebo nehlodavce). Používají se mladá zdravá zvířata běžně chovaných kmenů laboratorních zvířat; expozice by měla být započata co nejdříve po odstavení mláďat.

Na začátku studie by neměly odchylky hmotnosti použitých zvířat překročit ± 20 % střední hodnoty. Provádí-li se subchronická orální studie jako předběžná studie před dlouhodobou studií, měl by být v obou studiích použit stejný živočišný druh a plemeno/kmen.

▼B**1.6.2 Počet a pohlaví**

U hlodavců se použije nejméně 100 zvířat (50 samic a 50 samců) pro každou úroveň dávky a pro souběžnou kontrolní skupinu. Samice musí být nullipary a nesmějí být březí. Pokud se budou zvířata usmrcovat v průběhu studie, zvýší se celkový počet o počet zvířat, která budou usmrcena před ukončením studie.

Exponovaná satelitní skupina (nebo skupiny) pro hodnocení patologie jiné, než jsou tumory, by měla obsahovat 20 zvířat každého pohlaví, zatímco satelitní kontrolní skupina by měla obsahovat 10 zvířat každého pohlaví.

1.6.3 Úrovně dávek a frekvence expozic

Pro zkoušení karcinogenity se použijí alespoň tři úrovně dávek a jedna souběžná kontrolní skupina. Nejvyšší úroveň dávky by měla vyvolat příznaky minimální toxicity, jako je mírný pokles váhových přírůstků (méně než 10 %), bez podstatnějších změn normální doby života v důsledku jiných účinků než tumorů.

Nejnižší úroveň dávky by neměla mít vliv na normální růst, vývoj a délku života zvířete nebo vyvolat jakékoli známky toxicity. Obecně by neměla být nižší než 10 % nejvyšší dávky.

Střední dávka (dávky) by měla být zvolena ve středním pásmu mezi vysokou a nízkou dávkou.

Výběr dávek by měl zohledňovat údaje z předchozích zkoušek a studií toxicity.

Pro účely zkoušení chronické toxicity se do zkoušky zahrnou další exponované skupiny a souběžná satelitní kontrolní skupina. Vysoká dávka by měla u exponovaných zvířat v satelitní skupině vyvolat zřetelné příznaky toxicity.

Zvířata se obvykle exponují denně. Pokud se zkoušená látka podává v pitné vodě nebo v potravě, měla by k nim mít zvířata stálý přístup.

1.6.4 Kontrolní skupiny

Použije se souběžná kontrolní skupina, která je ve všech ohledech identická s exponovanými skupinami, s výjimkou expozice zkoušené látky.

Ve zvláštních případech, jako jsou inhalační studie s aerosoly, nebo použije-li se pro orální podávání emulgátor, jehož biologická aktivita není charakterizována, nasadí se další kontrolní skupina, která není exponována vehikulu.

1.6.5 Způsob podávání

Třemi hlavními způsoby podávání jsou orální podávání, dermální aplikace a inhalační podávání. Volba způsobu podávání závisí na fyzikálních a chemických charakteristikách zkoušené látky a pravděpodobném způsobu expozice člověka.

▼ B1.6.5.1 *Orální studie*

Vstřebává-li se zkoušená látka z gastrointestinálního traktu a je-li požití jedna z cest, jimiž může být exponován člověk, dává se přednost orální aplikaci, pokud neexistují důvody proti tomu. Zvířata mohou dostávat zkoušenou látku v potravě, rozpuštěnou v pitné vodě nebo podávanou v kapslích.

V ideálním případě se látka podává sedm dní v týdnu, protože dávkování pět dnů v týdnu může vést k zotavení nebo k návratu toxicity v období bez aplikace, čímž mohou být ovlivněny výsledky a následné hodnocení. Zejména z praktických důvodů se však dávkování pětkrát týdně považuje za přijatelné.

1.6.5.2 *Dermální studie*

Dermální expozice nanesením přímo na kůži může být zvolena jako simulace hlavní cesty expozice u člověka a jako modelový systém vyvolání kožních lézí.

1.6.5.3 *Inhalační studie*

Protože inhalační studie jsou technicky komplikovanější než jiné způsoby aplikace, jsou zde uvedeny podrobněji informace o tomto způsobu podávání. Je třeba poznamenat, že ve specifických situacích může být platnou alternativou intratracheální instilace.

Dlouhodobé expozice obvykle napodobují předpokládané expozice člověka, přičemž je zvíře obvykle exponováno po ustálení koncentrace v inhalační komoře šest hodin denně po pět dnů v týdnu (přerušovaná expozice), nebo jde-li o možnou expozici v okolním prostředí, 22–24 hodin denně po sedm dní v týdnu (kontinuální expozice), s přibližně jednou hodinou denně pro krmení zvířat ve stejnou denní dobu, která se využije i pro čištění expozičního komory. V obou případech jsou zvířata obvykle exponována neměnným koncentracím zkoušené látky. Hlavní rozdíl mezi přerušovanou a kontinuální expozicí spočívá v tom, že při první z nich má zvíře 17–18 hodin, během nichž se může zotavit z účinků denní expozice; během víkendu je tato doba ještě delší.

Volba přerušované nebo kontinuální expozice závisí na cílech studie a na expozici člověka, která má být simulována. Je však třeba vzít v úvahu určité technické obtíže. Protiváhou výhody kontinuální expozice pro simulaci podmínek okolního prostředí může být nezbytnost zajistit vodu a krmení během expozice a potřeba zajistit komplikovanější (a spolehlivější) přípravu aerosolu a par a monitorovací techniku.

1.6.6 *Expoziční komory*

Zvířata se exponují v inhalačních komorách, jejichž konstrukce zaručuje dynamické proudění vzduchu s výměnou vzduchu nejméně 12krát za hodinu, aby byly zajištěny přiměřené obsah kyslíku a rovnoměrné rozdělení látky v expoziční atmosféře. Kontrolní a expoziční komory by měly mít identickou konstrukci, aby byly expoziční podmínky srovnatelné ve všech ohledech kromě expozice zkoušené látky. Uvnitř komory se obvykle udržuje mírný podtlak, aby nedocházelo k úniku zkoušené látky do okolního prostředí. Komory by měly minimalizovat stísněnost pokusných zvířat. Pro zajištění stálosti atmosféry v komoře by obecně neměl celkový „objem“, který zaujímají pokusná zvířata, přesáhnout 5 % objemu expoziční komory.

▼B

Provádí se měření nebo monitorování těchto veličin:

- i) průtok vzduchu: průtok vzduchu komorou by měl být kontrolován nejlépe kontinuálně,
- ii) koncentrace: Během denní expozice se nemá koncentrace lišit od střední hodnoty o více než $\pm 15\%$. Každodenní koncentrace mají být během celé studie co nejstálější,
- iii) teplota a vlhkost: pro hlodavce by měla být teplota udržována v rozmezí 22 ± 2 °C a vlhkost v komorách 30–70 %, kromě případů, kdy je používána k rozptýlení zkoušené látky v atmosféře komory voda. Upřednostňuje se, aby byly oba parametry kontrolovány kontinuálně,
- iv) měření velikosti částic: měla by být stanovena distribuce velikosti částic v atmosféře komor u tekutých nebo pevných aerosolů. Aerosolové částice by měly mít respirabilní velikost pro použité zkušební zvíře. Vzorky atmosféry komor se odebírají z dýchací zóny zvířat. Vzorek vzduchu by měl být reprezentativní pro distribuci částic, kterým je zvíře exponováno, a měl by gravimetricky odpovídat celému suspendovanému aerosolu, i když značná část aerosolu není respirabilní. Analýza velikosti částic by měla být prováděna během vývoje generujícího systému tak často, aby se zajistila stabilita aerosolu; během expozice pak tak často, aby bylo možno posoudit stabilitu distribuce částic, kterým jsou zvířata exponována.

1.6.7 Délka studie

Zkouška karcinogenity zahrnuje větší část normální doby života pokusného zvířete. Zkouška by měla být ukončena po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana; u některých kmenů zvířat s delší dobou života a/nebo s nízkým spontánním výskytem tumorů by však měla být ukončena po 24 měsících (u myši a křečka) a po 30 měsících (u potkana). Ukončení takové prodloužené studie je také přijatelné, pokud počet přežívajících zvířat ve skupině s nejnižší dávkou nebo v kontrolní skupině klesne na 25 %. Při ukončení zkoušky, ve které je zřetelný rozdíl v reakci u různých pohlaví, se každé pohlaví posuzuje zvlášť. Pokud předčasně uhynie ze zjevných toxických příčin jen skupina s vysokou dávkou, nemusí to nutně vést k ukončení celé zkoušky za předpokladu, že toxické projevy nečiní problémy u ostatních skupin. Negativní výsledek zkoušky lze uznat, pokud nejsou ztráty zvířat v důsledku autolýzy, kanibalismu nebo laboratorně-technických chyb v žádné skupině větší než 10 % a přežití ve všech skupinách neklesne pod 50 % po 18 měsících u myši a křečka a po 24 měsících u potkana.

Satelitní skupiny 20 exponovaných zvířat každého pohlaví a příslušných 10 kontrolních zvířat každého pohlaví použitých pro testování chronické toxicity by měly v experimentu setrvat alespoň 12 měsíců. U těchto zvířat by měla být plánována pitva za účelem zjištění, zda se u nich nezávisle na procesu stárnutí vyvinuly patologické projevy.

▼B1.6.8 *Postup*1.6.8.1 *Pozorování*

Denní pozorování v kleci zahrnuje změny kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, změny funkce autonomní a centrální nervové soustavy, somatomotorické aktivity a chování.

U zvířat exponované satelitní skupiny (nebo skupin) se provádí v přiměřených intervalech klinické vyšetření.

Je třeba zajistit pravidelnou kontrolu zvířat, aby pokud možno nedocházelo ke ztrátám zvířat např. v důsledku kanibalismu, autolýzy tkání nebo chybného zařazení. Zvířata nalezená v agonii se vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Zaznamenávají se klinické příznaky, včetně neurologických a očních změn u všech zvířat, a dále případy uhynutí. Zvláštní pozornost se věnuje vývoji tumorů: doba objevení, lokalizace, rozměry, vzhled a progresse každého viditelného nebo hmatatelného tumoru se zaznamenává.

Měření spotřeby potravy (a vody, je-li zkoušená látka podávána v pitné vodě) se provádí týdně během prvních 13 týdnů studie a poté přibližně ve tříměsíčních intervalech, pokud zdravotní stav nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadují jinou četnost měření.

Tělesná hmotnost se zaznamenává individuálně u všech zvířat jednou týdně během prvních 13 týdnů období zkoušky a alespoň jednou za čtyři týdny po tomto období.

1.6.8.2 *Klinická vyšetření**Hematologie*

Hematologická vyšetření (např. obsah hemoglobinu, hematokrit, celkový počet erythrocytů, celkový počet bílých krvinek, krevních destiček nebo jiné ukazatele srážlivosti) se provádějí po třech měsících, šesti měsících a poté přibližně v šestiměsíčních intervalech a po ukončení na vzorcích krve shromážděných od 10 potkanů z každého pohlaví z každé skupiny. Vzorky se ve všech intervalech odeberou pokud možno od stejných potkanů.

Pokud pozorování zvířat v klecích svědčí o zhoršeném zdravotním stavu zvířat během studie, provede se vyšetření diferenciálního obrazu bílých krvinek postižených zvířat. Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje ve vzorcích od zvířat ve skupině s nejvyšší dávkou a u kontrolních skupin. Diferenciální obraz bílých krvinek se vyšetřuje u skupiny (skupin) s nejbližší nižší dávkou pouze tehdy, jsou-li mezi skupinou s nejvyšší dávkou a kontrolními skupinami významné odchylky nebo pokud to indikují patologické nálezy.

▼ B**A n a l ý z a m o č í**

Pro analýzu moči se shromažďují vzorky od 10 potkanů každého pohlaví ze všech skupin, pokud možno od stejných zvířat a ve stejných intervalech jako hematologická vyšetření. Následující stanovení se provádějí buď na vzorcích jednotlivých zvířat, nebo na směsném vzorku pro pohlaví/skupinu hlodavců:

- vzhled moči: objem a hustota u jednotlivých zvířat,
- bílkoviny, glukosa, ketolátky, okultní krvácení (semikvantitativně),
- mikroskopické vyšetření sedimentu (semikvantitativně).

B i o c h e m i c k é v y š e t ř e n í

V přibližně šestiměsíčních intervalech a po ukončení studie se odeberou krevní vzorky pro biochemická měření od všech nehlodavců a od 10 potkanů obojího pohlaví z každé skupiny, pokud možno od těchž potkanů v každém intervalu. Kromě toho se před zkouškou odebere vzorek od nehlodavců. Z těchto vzorků se připraví plasma a provedou se následující zkoušky:

- celková koncentrace bílkovin,
- koncentrace albuminu,
- testy na funkci jater (např. aktivita základních fosfatasy, aktivita glutamát-pyruvát-transaminasy ⁽¹⁾ a aktivita glutamát-oxalacetát-transaminasy ⁽²⁾, gama-glutamyltranspeptidasy, ornitindekarboxylasy,
- metabolismus glycidů, např. glukosa v krvi na lačno,
- testy na funkci ledvin, např. dusík močovinový v krvi.

P i t v a

U všech zvířat, včetně těch, která uhynula během zkoušky nebo byla utracena v agonii, se provede kompletní pitva. Před utracením se odeberou vzorky krve všech zvířat pro diferenciální obraz bílých krvinek. Všechny viditelné tumory nebo léze, které by mohly být tumory, se uchovávají. Měl by být proveden pokus porovnat anatomicopatologické změny s mikroskopickými nálezy.

Všechny orgány a tkáně se uchovávají pro histopatologické vyšetření. To se obvykle týká následujících orgánů a tkání: mozek ⁽³⁾ (medulla/pons, kůra mozku a mozečku); podvěsek mozkový, štítná žláza (včetně příštítných tělísek), thymus, plíce (včetně průdušnice), srdce, aorta, slinné žlázy, játra ⁽³⁾, slezina, ledviny ⁽³⁾, nadledviny ⁽³⁾, jícen, žaludek, dvanácterník, jejunum, ileum, caecum, tračník, konečník, močový měchýř, lymfatické uzliny, slinivka, gonády ⁽³⁾, přídatné pohlavní orgány; samičí mléčné žlázy, kůže, svalovina, periferní nerv, mícha (krční, hrudní a bederní), sternum s kostní dřeví a stehenní kost (včetně kloubů) a oči.

⁽¹⁾ Nyné známá jako aspartátaminotransferasa

⁽²⁾ Nyní známá jako alaninaminotransferasa.

⁽³⁾ Tyto orgány odebrané 10 hlodavcům každého pohlaví se zváží.

▼ B

Optimálním způsobem konzervace plic a močového měchýře je jejich naplnění fixativem; naplnění plic v inhalačních studiích má zásadní význam pro odpovídající histopatologické vyšetření. Ve speciálních studiích, jako jsou inhalační studie, se studuje celý respirační trakt včetně nosu, hltanu a hrtanu.

Byla-li provedena jiná klinická vyšetření, měly by být informace získané z těchto procedur k dispozici před mikroskopickým vyšetřením, protože mohou být patologovi významným vodítkem.

Histopatologická vyšetření

V části studie pro zkoušení chronické toxicity:

Provede se podrobné vyšetření všech uchovaných orgánů všech zvířat satelitní skupiny s vysokou dávkou a satelitní kontrolní skupiny. Pokud jsou v satelitní skupině exponované nejvyšší dávce nalezeny patologické změny způsobené látkou, vyšetří se histologicky cílové orgány všech ostatních zvířat z ostatních exponovaných satelitních skupin i ze všech exponovaných skupin části studie věnované karcinogenitě při jejím ukončení.

V části studie pro zkoušení karcinogenity:

- a) úplně histopatologické vyšetření orgánů a tkání se provede u všech zvířat, která uhynula nebo byla utracena během studie, u všech zvířat skupiny, které byla podána nejvyšší dávka, a u zvířat kontrolní skupiny;
- b) všechny tumory viditelné okem a léze, které by mohly být tumory, se mikroskopicky vyšetří u všech skupin ve všech orgánech;
- c) je-li významný rozdíl ve výskytu neoplastických lézí mezi skupinou s vysokou dávkou a kontrolní skupinou, provede se histopatologické vyšetření v daném orgánu či tkáni i v dalších skupinách;
- d) je-li přežití ve skupině s vysokou dávkou podstatně nižší než u kontrolní skupiny, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší nižší dávkou;
- e) jsou-li ve skupině s vysokou dávkou důkazy o vyvolání toxických nebo jiných účinků, které by mohly ovlivnit neoplastickou odpověď, provede se kompletní vyšetření skupiny s nejbližší nižší dávkou.

2. ÚDAJE

Údaje se shromažďují do tabulky, přičemž se u každé experimentální skupiny uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících tumory nebo toxické účinky zjištěné během zkoušky, doba jejich zjištění a počet zvířat s tumory zjištěnými po utracení. Výsledky se vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli uznávaná statistická metoda.

▼B3. **ZPRÁVY**3.1 **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

— živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,

— zkušební podmínky:

3.1.1 Popis expozičního zařízení:

Včetně konstrukce, typu, rozměrů, zdroje vzduchu, systému přípravy částic a aerosolů, klimatizačního systému, popis čištění odpadního vzduchu a způsobu umístění zvířat ve zkušební komoře, pokud je použita. Popíší se zařízení pro měření teploty, vlhkosti vzduchu, popřípadě stálosti koncentrací nebo distribuce velikostí částic aerosolu.

3.1.2 Údaje o expozici:

zpracují se do tabulky s uvedením středních hodnot a charakteristik variability (např. směrodatné odchylky); měly by zahrnovat tyto informace:

- a) průtok vzduchu inhalačním zařízením;
 - b) teplota a vlhkost vzduchu;
 - c) nominální koncentrace (celkové množství zkoušené látky přiváděné do inhalačního zařízení, dělené objemem vzduchu);
 - d) povaha vehikula, pokud bylo použito;
 - e) skutečná koncentrace v dýchací zóně;
 - f) medián velikosti částic (podle možnosti);
- úroveň dávek (včetně vehikula, je-li užito) a koncentrace,
- výskyt tumorů podle pohlaví, dávky a typu tumoru,
- doba uhynutí během experimentu, případně údaj o přežití zvířat do konce sledování, včetně satelitních skupin,
- výskyt toxických účinků podle pohlaví a dávky,
- popis toxických nebo jiných účinků,
- doba, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
- oftalmologické nálezy,
- údaje o spotřebě potravy a o tělesné hmotnosti,
- provedená hematologická vyšetření a jejich výsledky,
- provedená biochemická vyšetření a jejich výsledky (včetně výsledků všech analýz moči),

▼B

- pitevni nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické zpracování výsledků a popis použitých metod,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. **LITERATURA**

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.34 JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává několika skupinám samic a samců v odstupňovaných dávkách. Samcům se podává zkoušená látka v době růstu a v průběhu alespoň jednoho úplného spermatogenního cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby byl zachycen jakýkoli nepříznivý účinek zkoušené látky na spermatogenezi.

Samicím rodičovské generace (P) se podává látka po dobu alespoň dvou estrálních cyklů, aby byl zachycen jakýkoli nepříznivý účinek zkoušené látky na strus. Zvířata jsou poté připuštěna. V době připuštění se zkušební látka podává zvířatům obou pohlaví, v době březosti a laktace pouze samicím. Pro inhalační aplikaci je třeba metodu modifikovat.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1 Příprava**

Před zkouškou se provede náhodný výběr zdravých mladých dospělých zvířat, která se přiřadí do experimentálních a kontrolních skupin. Nejméně pět dní před zkouškou jsou zvířata chována v podmínkách chovu a kmení, v jakých budou během experimentu. Doporučuje se podávat zkoušenou látku v potravě nebo v pitné vodě. Jiné způsoby podání jsou také přijatelné. Všem zvířatům se zkoušená látka podává po celou dobu zkoušky stejnou metodou. Používá-li se pro usnadnění aplikace vehikulum nebo jiná přísada, musí být o nich známo, že nemají toxické účinky.

▼B

Látka se podává sedm dní v týdnu.

1.6.2 Pokusná zvířata

Výběr druhu

Upřednostňovanými druhy jsou potkan nebo myš. Používají se zdravá zvířata, dosud nepoužitá pro jiné experimenty. Používaný kmen by neměl mít nízkou plodnost. Pokusná zvířata musí být plně charakterizována co do druhu, kmene, pohlaví, hmotnosti a/nebo věku.

Plodnost musí být ověřena vhodným způsobem u obou pohlaví. Zvířata v experimentální i kontrolní skupině musí být odstavena před zahájením aplikace.

Počet a pohlaví

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu.

Cílem je získat dostatečný počet březích samic a dostatečné potomstvo, a tím zajistit spolehlivé hodnocení vlivu látky na plodnost, průběh březosti a mateřské chování v generaci P a laktaci, růst a vývoj potomstva generace F₁ od početí do odstavení.

1.6.3 Zkušební podmínky

Vodu a potravu dostávají zvířata *ad libitum*. Před vrhem se březí samice přemístí do oddělených vrhnic nebo mateřských klecí a je jim poskytnut materiál pro vytvoření hnízda.

1.6.3.1 Úroveň dávek

Použijí se alespoň tři exponované skupiny a jedna kontrolní. Používá-li se pro usnadnění aplikace zkoušené látky vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu. Snižuje-li zkoušená látka příjem a využití potravy, může být nezbytně použít párově krmnou kontrolní skupinu. Pokud to dovozlují fyzikálně-chemické vlastnosti nebo biologické účinky zkoušené látky, má nejvyšší dávka v ideálním případě vyvolávat toxicitu, avšak nikoli úhynutí v rodičovské populaci zvířat (P). Střední dávka (dávky) by měla vyvolávat minimální toxické účinky, které by mohly být připisovány zkoušené látce, a nejnižší dávka by neměla vyvolávat žádné pozorovatelné nepříznivé účinky ani u rodičů ani u potomstva. Při podání sondou nebo v kapslích se dávka stanoví individuálně na základě hmotnosti zvířete a každý týden se přizpůsobuje podle změny hmotnosti. U březích samic mohou být dávky popřípadě určeny na základě tělesné hmotnosti v 0. nebo 6. dni březosti.

1.6.3.2 Limitní zkouška

Pokud látka o nízké toxicitě neposkytne při úrovni dávky 1 000 mg/kg žádné důkazy o vlivu na reprodukční schopnost, není zkoušení při dalších úrovních dávky potřebné. Pokud předběžná studie prokáže, že vysoká dávka vyvolávající u matek jasné příznaky toxicity nemá nepříznivé účinky na plodnost, není zkoušení při dalších úrovních dávky potřebné.

▼B1.6.3.3 *Provedení zkoušky***Plán pokusu**

Denní podávání samcům rodičovské generace (P) se zahájí ve věku pěti až devíti týdnů po nejméně pětidenní aklimatizaci po odstavení. U potkana se v podávání pokračuje po 10 týdnů do období připouštění (u myši osm týdnů). Samci se buď utratí a vyšetří na konci období připouštění, nebo se pokračuje v podávání a samci mohou být použiti pro produkci druhého vrhu a utratí se a vyšetří ještě před koncem studie. U samic rodičovské generace (P) se podávání zahájí po nejméně pětidenní aklimatizaci a pokračuje se v něm alespoň do doby dvou týdnů před obdobím připouštění. V denním podávání se poté pokračuje po celé tři týdny období připouštění, v době březosti a poté až do odstavení generace F₁. Může být nezbytné změnit plán dávkování podle dostupných znalostí o vlastnostech zkoušené látky, např. o indukci metabolismu a/nebo bioakumulaci.

Postup při připouštění

Ve studiích toxicity pro reprodukci je možné použít párování 1:1 (jeden samec a jedna samice) nebo 1:2 (jeden samec a dvě samice).

V případě párování 1:1 se samice ponechá s tímž samcem do zabřeznutí nebo po dobu tří týdnů. Každé ráno se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Dnem 0 březosti je den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie.

Páry, u kterých nedojde k oplodnění, se vyšetří s cílem zjistit důvod neplodnosti.

Tento postup může zahrnovat umožnění další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností, mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů nebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

Velikost vrhů

Zvířatům exponovaným ve studii fertility se ponechá možnost vrhit normálně a pečovat o své potomstvo do okamžiku odstavení bez standardizace velikosti vrhů.

Při standardizaci vrhů se doporučuje následující postup. Mezi 1. a 4. dnem po vrhu se velikost všech vrhů upraví vyřazením nadbytečných jedinců tak, aby bylo pokud možno dosaženo počtu 4 samců a 4 samic na vrh.

Pokud počet mladých samců nebo samic neumožňuje ponechat čtyři z každého pohlaví, je možné se tomu částečně přizpůsobit (např. ponechat pět samců a tři samice). Vrhů s méně než osmi potomky nelze standardizovat.

▼B

1.6.4 Pozorování

Po dobu zkoušky se každé zvíře pozoruje alespoň jednou denně. Zaznamenávají se významné změny chování, příznaky ztíženého nebo prodlouženého vrhu a všechny příznaky toxicity, včetně mortality. Před obdobím připouštění i během něho se denně měří příjem potravy. Po vrhu a v průběhu laktace se měří příjem potravy (a vody, pokud se látka podává v pitné vodě) ve stejný den, kdy se váží potomstvo. Samci a samice rodičovské generace (P) se váží první den podávání a poté týdně. Všechna pozorování se zaznamenávají individuálně pro každé dospělé zvíře.

Doba gestace se počítá ode dne 0 březosti. Každý vrh se co nejdříve po vrhu vyšetří a stanoví se počty a pohlaví mláďat, počet mrtvých a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií.

Mrtvá mláďata a mláďata utracená ve 4. dnu se uchovají pro vyšetření na možné defekty. Živá mláďata se spočítají a celé vrhy se zváží ráno po vrhu, ve 4. a 7. dnu a poté každý týden do ukončení studie, kdy se zvířata zváží jednotlivě.

Zaznamenávají se všechny pozorované abnormality v chování a fyzickém stavu matek nebo potomstva.

1.6.5 *Patologie*1.6.5.1 *Pitva*

Po utracení nebo úmrtí během studie se všechna zvířata generace P makroskopicky vyšetří na strukturální abnormality anebo patologické změny, přičemž se zvláštní pozornost věnuje orgánům reprodukčního systému. Uhynulá mláďata nebo mláďata v agónii se vyšetří na defekty.

1.6.5.2 *Histopatologická vyšetření*

Vaječníky, děloha, děložní hrdlo, vagina, varlata, epididymis, semenné vajíčky, prostata, koagulační žláza, hypofýsa a cílový orgán (cílové orgány) všech zvířat generace P se uchovají pro mikroskopické vyšetření. V případě, že tyto orgány dosud nebyly vyšetřeny v jiných studiích s více dávkami, provede se podle možnosti mikroskopické vyšetření u všech zvířat ze skupiny s nejvyšší dávkou a u kontrolní skupiny a dále u zvířat, která uhynula v průběhu studie.

Orgány, které u těchto skupin zvířat vykazovaly abnormality, se vyšetří i u zvířat generace P ostatních dávkových skupin. V těchto případech se mikroskopicky vyšetří všechny tkáně vykazující makroskopické změny. Jak již bylo doporučeno v oddíle o připouštění, mohou být reprodukční orgány zvířat podezřelých z neplodnosti podrobeny mikroskopické analýze.

▼ B**2. ÚDAJE**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se u každé experimentální skupiny uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet plodných samic, počet březích samic, typ změn a procento zvířat vykazujících jednotlivé typy změn.

Podle možnosti se numerické výsledky vyhodnotí vhodnou statistickou metodou. Může být použita jakákoli všeobecně uznávaná statistická metoda.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto informace:

- druh/kmen použitých zvířat,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a dávky, včetně ukazatelů plodnosti, gestace a životaschopnosti,
- doba uhynutí během studie, nebo zda zvířata přežila do plánovaného utracení nebo do konce studie,
- tabulka s údaji o hmotnosti každého vrhu, průměrné hmotnosti mláďat a individuální hmotnosti potomků při ukončení studie,
- toxické a další účinky pro reprodukci, potomstvo a postnatální růst,
- den, kdy byly pozorovány jednotlivé abnormální příznaky, a jejich další vývoj,
- údaje o tělesné hmotnosti zvířat generace P,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- statistické vyhodnocení výsledků, kde je to možné,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.35 DVOUGENERAČNÍ STUDIE REPRODUKČNÍ TOXICITY****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 416 (2001).

1.1 ÚVOD

Tato metoda zkoušení dvougenerační reprodukce je určena k získání všeobecných informací týkajících se účinků zkoušené látky na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy, včetně funkcí pohlavních žláz, estrálního cyklu, způsobu chování při páření, plazení, gestaci, vrhu, laktaci, odstavení, růstu a vývoje potomstva. Studie může rovněž poskytnout informace o účinku zkoušené látky na neonatální nemocnost a úmrtnost a předběžně informace o prenatalní a postnatalní vývojové toxicitě a může sloužit jako návod pro další zkoušky. Mimo zkoumání růstu a vývoje generace F₁ je tato zkušební metoda určena rovněž k hodnocení integrity a výkonnosti samčí a samičí rozmnožovací soustavy a rovněž růstu a vývoje generace F₂. S cílem získat další informace o vývojové toxicitě a funkčních poruchách lze do tohoto protokolu začlenit další prvky studie, přičemž jako vhodné se jeví metody vývojové toxicity a/nebo vývojové neurotoxicity, anebo lze tyto konečné výsledky zkoumat v samostatných studiích pomocí vhodných metod zkoušení.

1.2 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává v odstupňovaných dávkách několika skupinám samců a samic. Samcům z generace P se látka podává během růstu a během minimálně jednoho dokončeného spermatogenetického cyklu (přibližně 56 dnů u myši a 70 dnů u potkana), aby bylo možné zachytit jakékoliv nepříznivé účinky na spermatogenezi. Účinky na spermie se stanoví pomocí parametrů pro spermie (např. morfologie a motilita spermií), z pitvy tkání a podrobné histopatologie. Jsou-li k dispozici informace o spermatogenezi z předešlých dostatečně dlouhých studií opakovaného dávkování, např. 90denní studie, není do hodnocení nutné zahrnovat samce z generace P. Tyto vzorky nebo digitální záznamy o spermích z generace P je však vhodné uchovat pro možnost pozdějšího vyhodnocení. Samicím z generace P se látka podá během růstu a během několika dokončených estrálních cyklů, aby bylo možné odhalit jakékoliv nepříznivé účinky zkoušené látky na normální průběh estrálního cyklu. Zkoušená látka se podává rodičovské (P) generaci zvířat během jejich páření, následně březosti a až do doby odstavení jejich potomstva F₁. Po odstavení se u generace F₁ v podávání látky pokračuje během růstu až do dospělosti, v průběhu páření a produkce generace F₂ a až do doby, kdy dojde k odstavení generace F₂.

U všech zvířat se provádějí klinická sledování a patologická vyšetření příznaků toxicity, a to se zvláštním důrazem na její vliv na integritu a výkonnost samčí a samičí rozmnožovací soustavy a na růst a vývoj jejich potomstva.

▼ B

1.3 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.3.1 Výběr živočišných druhů

Nejvhodnějším druhem pro testování je potkan. Použití jiných druhů je třeba zdůvodnit a provést odpovídající úpravy. Není vhodné používat kmeny s nižší plodností nebo s typicky vysokým výskytem vývojových vad. Na začátku studie by měly být u používaných zvířat jen minimální odchylky hmotnosti, které by neměly překročit 20 % průměrné hmotnosti u každého pohlaví.

1.3.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (± 3 °C). Relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Výběr stravy může být ovlivněn nutností zajistit vhodnou přísadu zkoušené látky, je-li látka podávána tímto způsobem.

Zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je umístit v klecích v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví. Páření by mělo probíhat v klecích, které jsou k tomuto účelu vhodné. Po páření je třeba umístit oplodněné samice individuálně do klecí určených k vrhu nebo chovu mláďat. Oplodněné potkany lze rovněž chovat v malých skupinách a oddělit jeden až dva dny před vrhem. Když se blíží doba vrhu, je nutné oplodněným zvířatům poskytnout odpovídající a přesně stanovený materiál pro tvorbu hnízda.

1.3.3 Příprava zvířat

Použijí se zdravá zvířata, která se alespoň 5 dnů aklimatizovala na laboratorní podmínky a která nebyla podrobena předcházejícím zkušebním postupům. Pokusná zvířata by měla být charakterizována podle druhu, kmenu, původu, pohlaví, hmotnosti a/nebo stáří. K dispozici by měly být veškeré informace o sourozeneckých vztazích, aby se nepářili sourozenci. Zvířata se náhodným výběrem rozdělí do kontrolních a experimentálních skupin (doporučuje se rozdělení podle tělesné hmotnosti). Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Každému zvířeti se přiřadí vlastní identifikační číslo. U generace P se tato čísla přiřadí před zahájením podávání dávek. U generace F₁ je nutné přidělit tato čísla po odstavení zvířat vybraných k páření. U všech vybraných zvířat generace F₁ se vedou záznamy označující původ vrhu. Kromě toho se doporučuje individuální identifikace mláďat co nejdříve po narození, kdy se provádí individuální vážení mláďat nebo jakékoliv funkční zkoušky.

Na začátku podávání dávek musí být rodičovská (P) generace zvířat stará přibližně 5 až 9 týdnů. Je-li to možné, měla by mít zvířata ze všech zkušebních skupin stejnou hmotnost a věk.

▼B

1.4 POSTUP

1.4.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Každá experimentální i kontrolní skupina by měla obsahovat dostatečný počet zvířat, aby bylo možné získat minimálně 20 březích samic s přibližně stejným termínem vrhu. To pravděpodobně nebude možné u látek, které vyvolávají nežádoucí účinky spojené s aplikací (např. sterilitu, nadměrnou toxicitu při vysoké dávce). Cílem je získat dostatečný počet březích samic, a tím zajistit smysluplné hodnocení potenciálu dané látky na plodnost, březost, chování samice a kojených mláďat, růst a vývoje potomstva generace F_1 od doby početí až do doby dospělosti a vývoj jejich potomstva (F_2) až do odstavení. Nepodaří-li se však dosáhnout požadovaného počtu březích zvířat (tj. 20), nemusí to nutně znamenat znehodnocení studie, a proto by hodnocení mělo vždy probíhat individuálně případ od případu.

1.4.2 **Příprava dávek**

Není-li jiný vhodnější způsob aplikace (např. kožní nebo inhalační), doporučuje se orální podávání zkoušené látky (ve stravě, pitné vodě nebo pomocí žaludeční sondy).

Zkoušená látka se v případě potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážit použití vodného roztoku/suspenze, poté použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku jiného vehikula. U jiného typu vehikula, než je voda, je třeba znát jeho toxické charakteristiky. Stanoví se stálost zkoušené látky v daném vehikulu.

1.4.3 **Dávkování**

Použijí se alespoň tři úrovně dávek a souběžná kontrola. Není-li dávka limitována fyzikálně-chemickou podstatou nebo biologickými účinky zkoušené látky, zvolí se nejvyšší úroveň dávky tak, aby vyvolala toxicitu, ale nezpůsobila úhyn nebo značné utrpení. V případě neočekávané úmrtnosti jsou obvykle ještě přijatelné studie s úmrtností rodičovských (P) zvířat nižší než přibližně 10 %. Ve snaze prokázat jakoukoli reakci související s dávkováním a s hodnotou dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL) se zvolí sestupná posloupnost úrovní dávek. Pro nastavení sestupných úrovní dávek jsou obvykle optimální intervaly lišící se faktorem 2 až 4 a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). U studií stravy by dávky neměly být více než trojnásobné. Při výběru úrovně dávek je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující údaje o toxicitě, a to zvláště v případě výsledků studií po opakované dávce. Rovněž je třeba vzít v úvahu jakékoliv existující informace o metabolismu a kinetice zkoušené sloučeniny nebo příbuzných látek. Tyto informace navíc napomohou rovněž při prokazování přiměřenosti dávkovacího režimu.

▼B

Kontrolní skupina je neexponovaná skupina nebo kontrolní skupina s vehikulem, pokud se vehikulum pro aplikaci zkoušené látky používá. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Používá-li se vehikulum, podá se kontrolní skupině v nejvyšším používaném objemu. Podává-li se zkoušená látka ve stravě a způsobuje-li snížený příjem nebo využití potravy, pak je třeba zvážit nutnost použití párově krmené kontrolní skupiny. Jinak lze místo souběžné párově krmené kontrolní skupiny použít údaje získané z kontrolovaných studií určených k hodnocení účinků snížené spotřeby potravy na reprodukční parametry.

Pozornost je třeba věnovat následujícím typickým znakům vehikula a jiných přísad: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus, a/nebo retenci zkoušené látky, dále vlivu na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou změnit její toxické vlastnosti, a vlivu na spotřebu potravy, vody nebo nutriční stav zvířat.

1.4.4 Limitní zkouška

Pokud orální studie s jednou úrovní dávky v množství alespoň 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti a den a/nebo rovnocenné procento látky v potravě nebo pitné vodě při aplikaci dávky v potravě nebo pitné vodě pomocí postupů předepsaných pro tuto studii nevyvolá žádnou zjiřitelnou toxicitu ani u rodičovských zvířat, ani u jejich potomstva a pokud se neočekává ani toxicita na základě existujících údajů o strukturně/metabolicky příbuzných sloučeninách, pak není nutné uvažovat o kompletní studii využívající několika úrovní dávek. Limitní zkouška se použije, pokud expozice u člověka nevyžaduje použití vyšší úroveň orální dávky. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky.

1.4.5 Aplikace dávek

Zkoušená látka se podává zvířatům 7 dnů v týdnu. Upřednostňuje se orální způsob podávání (ve stravě, pitné vodě nebo žaludeční sondou). Pokud se používá jiný způsob podávání, je třeba podat zdůvodnění a provést odpovídající modifikace. Všem zvířatům by měla být látka během odpovídajícího experimentálního období podávána stejným způsobem. Je-li látka podávána žaludeční sondou, podává se hadičkou určenou k výplachu žaludku. Množství jednorázově podávané tekutiny by nemělo překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti (u kukuřičného oleje maximum představuje dávka 0,4 ml/100 g tělesné hmotnosti), výjimkou jsou vodní roztoky, kde lze použít 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. S výjimkou dráždivých nebo žíravých látek, které ve vyšších koncentracích obvykle odhalí další zhoršení účinků, se proměnlivost množství zkoušené látky sníží nastavením takové koncentrace, která zajistí konstantní množství na všech úrovních dávek. Ve studiích zaměřených na podávání látky žaludeční sondou budou mláďata dostávat zkoušenou látku obvykle nepřímo prostřednictvím mléka, dokud nezačne přímé dávkování po jejich odstavení. Ve studiích zaměřených na podávání látky ve stravě nebo pitné vodě budou mláďata navíc dostávat zkoušenou látku přímo, jakmile začnou během posledního týdne laktčního období sama žrát.

▼ B

U látky podávané ve stravě nebo pitné vodě je velmi důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky nebránilo vyváženosti běžné stravy nebo vody. Je-li zkoušená látka podávána ve stravě, je třeba používat buď konstantní koncentrace (ppm) ve stravě, nebo konstantní úroveň dávky ve vztahu k tělesné hmotnosti zvířete. Použití jiného způsobu je třeba zdůvodnit. Látka podávaná žaludeční sondou se podává každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně se přizpůsobí tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Při přizpůsobování dávky podle hmotnosti u podávání látky sondou je třeba vzít v úvahu informace týkající se placentární distribuce.

1.4.6 Plán zkoušky

S každodenním podáváním zkoušené látky se u rodičovské generace (P) samců a samic zahájí od 5. do 9. týdne věku. Denní podávání látky u samců a samic generace F₁ je třeba zahájit po jejich odstavení; stále je třeba mít na paměti, že v případě, kdy se zkoušená látka podává prostřednictvím stravy nebo pitné vody, může docházet k přímé expozici mláďat F₁ zkoušené látce již během laktačního období. U obou pohlaví (P i F¹) by se mělo s podáváním látky pokračovat alespoň 10 týdnů před obdobím páření. S dávkováním se u obou pohlaví pokračuje i během dvoutýdenního období páření. Nejsou-li samci již potřební k hodnocení reprodukčních účinků, měli by být humánním způsobem utraceni a vyšetřeni. U rodičovské generace (P) samic dávkování pokračuje i během březosti a až do odstavení potomstva generace F₁. Pozornost je třeba věnovat modifikacím dávkovacího programu na základě dostupných informací o zkoušené látce, včetně existujících údajů o toxicitě, indukci metabolismu nebo bioakumulaci. Obvykle by dávka pro jednotlivá zvířata měla vycházet z aktuálně zjištěné tělesné hmotnosti. Velkou pozornost je však třeba věnovat úpravě dávek během posledního trimestru březosti.

Podávání látky samcům a samicím generací P a F₁ pokračuje až do doby jejich utracení. Všichni dospělí samci a samice generace P a F₁ se humánním způsobem utratí, pokud již nejsou potřební k hodnocení reprodukčních účinků. Potomstvo generace F₁, které není vybráno k páření, a celé potomstvo generace F₂ se po odstavení humánním způsobem utratí.

1.4.7 Páření**1.4.7.1 Připouštění rodičovské generace (P)**

U každého páření se samice umístí s jedním samcem se stejnou úrovní dávek (páření 1:1), dokud nedojde ke spáření, nebo po dobu alespoň 2 týdnů. Každý den se samice vyšetří na přítomnost spermatu nebo vaginální zátky. Nultým dnem březosti je den, kdy je pozorována vaginální zátka a/nebo spermie. V případě, že je páření neúspěšné, se zváží spáření se samci s osvědčenou plodností ze stejné skupiny. Spářené páry se v záznamech jasně označí. Je třeba se vyvarovat páření sourozenců.

▼ B1.4.7.2 *Páření generace F₁*

U páření zvířat generace F₁ se za účelem produkce generace F₂ po odstavení vybere z každého vrhu alespoň jeden samec a samice pro spáření s jinými zvířaty ze stejné dávkové skupiny, ale z odlišného vrhu. Výběr zvířat z každého vrhu se provede náhodně, pokud nejsou mezi zvířaty z daného vrhu pozorovány žádné výrazné odlišnosti v tělesné hmotnosti nebo vzhledu. V případě zjištěných odlišností se z každého vrhu vyberou nejkvalitnější jedinci. Z hlediska pragmatického by bylo nejlepší tento výběr provádět na základě tělesné hmotnosti, vhodnějším se však může jevit výběr na základě vzhledu. Potomstvo generace F₁ by se nemělo pářit před dosažením plné pohlavní zralosti.

Páry bez potomstva je třeba vyšetřit za účelem zjištění skutečné příčiny neplodnosti. Tento postup může zahrnovat umožnění další příležitosti k oplodnění se zvířetem s osvědčenou plodností, mikroskopické vyšetření reprodukčních orgánů anebo vyšetření estrálního cyklu a spermatogeneze.

1.4.7.3 *Druhé páření*

V určitých případech, např. u odchylek velikosti vrhu spojených s aplikací nebo při zjištění nejednoznačného účinku po prvním páření, se doporučuje opětovně připuštění dospělých zvířat z generace P a F₁ za účelem produkce druhého vrhu. Rovněž se doporučuje znovu připustit samice nebo samce, u kterých nedošlo k produkci mláďat s osvědčeným zvířaty. Pokud je u jakékoli generace nezbytná produkce druhého vrhu, zvířata budou opakovaně připuštěna přibližně jeden týden po odstavení posledního vrhu.

1.4.7.4 *Velikost vrhu*

Zvířatům se ponechá možnost normálně vrhnout a pečovat o svoje potomstvo až do jeho odstavení. Standardizace velikosti vrhů je dobrovolná. Pokud se standardizace provádí, je nutné používanou metodu detailně popsat.

1.5 **POZOROVÁNÍ**1.5.1 **Klinická pozorování**

Všeobecné klinické pozorování se provádí denně a v případě podávání látky žaludeční sondou časový rozvrh zohlední očekávané doby nejvyšších účinků po podání látky. Zaznamenají se významné změny chování, známky ztíženého nebo prodlužovaného vrhu a všechny příznaky toxicity. Alespoň jednou týdně se u každého zvířete provede další podrobnější vyšetření, nejlépe v době vážení zvířete. Dvakrát denně, během víkendu případně jednou denně, se provádí pozorování nemocnosti a úmrtnosti všech zvířat.

▼ B**1.5.2 Tělesná hmotnost a spotřeba potravy/vody u rodičovských zvířat**

Rodičovská zvířata (generace P a F₁) se zváží v první den podávání látky a poté alespoň jednou týdně. Samice rodičovské generace (P a F₁) se zváží 0., 7., 14. a 20. nebo 21. den gestace, během stejných dnů v průběhu laktace, při vážení vrhů a poté v den utracení zvířat. Tato pozorování se zaznamenají individuálně u každého dospělého zvířete. V období před pářením a během gestačního období se spotřeba potravy měří minimálně každý týden. Pokud se látka podává ve vodě, měří se spotřeba vody alespoň jednou týdně.

1.5.3 Estrální cyklus

Před pářením a popřípadě i během páření se u samic generace P a F₁ hodnotí délka a normálnost estrálního cyklu pomocí vaginálních stěrů, dokud se nezíská důkaz o zabřeznutí. Při získávání vaginálních/cervikálních buněk je třeba neporušit sliznice a následně také nevyvolat stav falešné březosti (1).

1.5.4 Parametry spermatu

U všech samců generace P a F₁ se po utracení zaznamená hmotnost varlat a nadvarlat a jeden z každého orgánu se ponechá pro histopatologické vyšetření (viz body 1.5.7, 1.5.8.1). Zbylá varlata a nadvarlata z podskupiny alespoň deseti samců z každé generace P a F₁ se použijí pro výpočet homogenizačně odolných spermatid a kaudálních epididymálních rezerv spermií. Od stejné podskupiny samců se shromáždí spermie z kaudálních částí nadvarlat nebo spermie z chámovodů za účelem vyhodnocení jejich motility a morfologie. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací látky anebo jsou z jiných studií k dispozici důkazy o možném účinku na spermatogenezi, provede se hodnocení spermatu u všech samců z každé skupiny podle dávky; jinak se výpočet omezí pouze na samce z kontrolní skupiny a ze skupiny generace P a F₁ s vysokou dávkou.

Vypočítá se celkový počet homogenizačně odolných testikulárních spermatid a spermií z kaudální části nadvarlat (2, 3). Kaudální rezervy spermií lze odvodit z koncentrace a objemu spermií v suspenzi používané k doplnění kvalitativních hodnocení a počtu spermií získaných pomocí následného rozřezání a/nebo homogenizování zbylé kaudální tkáně. Pokud nejsou zhotoveny digitální záznamy nebo videozáznamy anebo nejsou-li vzorky zmrazeny a analýza provedena později, je nutné výpočet u vybrané podskupiny samců ze všech dávkových skupin provést okamžitě po utracení zvířat. v těchto případech se nejprve provádí analýza u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. vliv na počet, motilitu nebo morfologii spermií), není nutné provádět analýzu u ostatních dávkových skupin. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

▼ B

Motilita epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodu) se vyhodnotí nebo zaznamená na video okamžitě po utracení. V takovém případě je nutné vyhodnotit rovněž skupiny s nižší úrovní dávek. Spermie se odeberou tak, aby došlo k minimálnímu poškození, a pomocí vhodných metod se zředí pro analýzu motility (4). Procento progresivně pohyblivých spermií se stanoví subjektivně, nebo objektivně. Pokud se provádí počítačová analýza pohyblivosti (5, 6, 7, 8, 9, 10), spočívá odvození progresivní motility v mezích uživatelsky nastavených hodnotách průměrné rychlosti dráhy a přímosti nebo lineárního koeficientu. Pokud se pořídí videozáznam vzorků (11) anebo jsou zobrazení během pitvy zaznamenána jiným způsobem, stačí provést následnou analýzu pouze u kontrolní skupiny a u skupiny s vysokou dávkou u samců z generací P a F₁, pokud nedojde ke zjištění účinků spojených s aplikací. Pokud nejsou k dispozici žádné digitální záznamy ani videozáznam, analyzují se pitvy všech vzorky od všech experimentálních skupin.

Provede se morfologické hodnocení vzorků epididymálních spermií (nebo spermií z chámovodů). Spermie (minimálně 200 na vzorek) se vyšetří jako stabilní, mokré preparáty (12) a klasifikují se jako normální nebo abnormální. Příklady morfologických odchylek spermií by měly zahrnovat syntézu, izolované a zdeformované hlavičky a/nebo ocásky. Hodnocení se provádí u vybraných podskupin samců ze všech skupin podle úrovní dávek bezprostředně po utracení zvířat, nebo později na základě digitálních záznamů nebo videozáznamů. Jsou-li stěry zakonzervované, lze je rovněž vyhodnotit později. V takovém případě se analyzuje nejprve kontrolní skupina a skupiny s vysokou dávkou. Pokud se nezjistí žádné účinky spojené s aplikací (např. účinek na morfologii spermií), není nutné analyzovat ostatní dávkové skupiny. Pokud se zjistí účinky spojené s aplikací u skupiny s vysokou dávkou, je nutné zhodnotit i skupiny s nižšími dávkami.

Pokud již byly kterékoliv výše zmíněné parametry spermií zkoumány v rámci nejméně 90 dnů trvající studie systémové toxicity, není nutné je v rámci dvougenerační studie opakovat. Doporučuje se však veškeré vzorky nebo digitální záznamy spermií z generace P uchovat pro pozdější hodnocení.

1.5.5 **Potomstvo**

Vrhy se vyšetří co nejdříve po vrhu (v nultý den laktace), aby bylo možné stanovit počet a pohlaví mláďat, počet mrtvých a živě narozených mláďat a přítomnost nápadných anomálií. Mláďata, která byla nalezena mrtvá v den 0, se vyšetří na možné defekty a příčinu smrti (nejsou-li rozložena) a posléze se uchovají. Živá mláďata se spočítají, každé se ihned po narození zváží (v nultý den laktace) nebo během 1. dne a poté v pravidelných intervalech, např. v 4., 7., 14., a 21. den laktace. Zaznamenají se fyzické nebo behaviorální abnormality zjištěné u samic nebo jejich potomstva.

▼B

Fyzický vývoj u potomstva se zaznamenává hlavně podle přírůstku tělesné hmotnosti. Další fyzické parametry (např. otevření uší a očí, prořezávání zubů, růst srsti) mohou poskytnout doplňkové informace, ale u těchto údajů se dává přednost hodnocení v kontextu údajů o pohlavní zralosti (např. stáří a tělesná hmotnost při vaginálním otevření nebo odpojení předkožky) (13). Doporučuje se provést funkční vyšetření (např. pohybová aktivita, smyslové funkce, reflexní ontogeneze) potomstva generace F_1 před a/nebo po odstavení, a to zvláště vyšetření týkající se pohlavní zralosti, nejsou-li taková vyšetření součástí samostatných studií. U odstavených potomků generace F_1 vybraných k připuštění je třeba stanovit stáří, ve kterém došlo k vaginálnímu otevření a odloučení předkožky. U mláďat generace F_2 je třeba změřit anogenitální vzdálenost během postnatálního dne 0, je-li vyvolána změnami v poměru pohlaví u generace F_1 nebo načasováním pohlavní zralosti.

Funkční sledování lze vynechat u skupin, které jinak vykazují jasné známky nepříznivých účinků (např. významné snížení přírůstku hmotnosti atd.). Pokud se provádí funkční vyšetření, nemělo by se provádět u mláďat vybraných k páření.

1.5.6 Celková pitva

Po utracení nebo uhynutí během studie se všechna zvířata rodičovské generace (P a F_1), všechna mláďata se zevními odchylkami nebo klinickými známkami a rovněž jedno náhodně vybrané mládě z každého pohlaví a vrhu z obou generací F_1 a F_2 makroskopicky vyšetří na jakékoliv strukturální abnormality anebo patologické změny. Speciální pozornost je třeba věnovat orgánům rozmnožovací soustavy. U mláďat, která jsou humánním způsobem utracena ve stavu agónie, a u mrtvých mláďat, která nejsou rozložena, se provede vyšetření za účelem zjištění možných defektů a/nebo příčiny uhynutí. Mláďata se uchovají.

Děloha všech samic prvorodiček se vyšetří na přítomnost a počet zachycených vajíček v děloze způsobem, který nebude mít vliv na histopatologické hodnocení.

1.5.7 Hmotnost orgánů

V okamžiku utracení se u všech rodičovských zvířat generace P a F_1 stanoví tělesná hmotnost a hmotnost těchto orgánů (párové orgány je třeba vážit jednotlivě):

- děloha, vaječníky,
- varlata, nadvarlata (celkem a kaudální),
- prostata,
- semenné vajíčky s koagulačními žlázami a jejich tekutinami a s prostatou (jako jedna jednotka),
- mozek, játra, ledviny, slezina, hypofýza, štítná žláza a nadledvinky a známé cílové orgány.

U mláďat generace F_1 a F_2 vybraných k pitvě se stanoví tělesná hmotnost v okamžiku utracení. U jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu (viz odstavec 1.5.6) se zváží tyto orgány: mozek, slezina a brzlík.

▼ B

Je-li to proveditelné, zhodnotí se výsledky celkové pitvy a hmotnosti orgánů v souvislost s výsledky zjištěnými v jiných studiích opakovaného dávkování.

1.5.8 **Histopatologie**

1.5.8.1 *Rodičovská zvířata*

Pro histopatologické vyšetření se připraví a ve vhodném prostředí uchovají tyto orgány a tkáně rodičovských zvířat, nebo jejich reprezentativní vzorky:

- vagina, děloha s děložním hrdlem a vaječníky (uložené ve vhodném konzervačním prostředku),
- jedno varle (uložené v Bouinově roztoku nebo jiném srovnatelném prostředku), jedno nadvarle, semenné vajíčky, prostata a koagulační žláza,
- již dříve určený cílový orgán nebo orgány od všech zvířat generace P a F₁ vybraných k páření.

U všech zvířat generace P a F₁ ze skupiny s vysokou dávkou a z kontrolní skupiny vybraných k páření se provede kompletní histopatologické vyšetření všech výše vyjmenovaných uchovaných orgánů a tkání. Vyšetření vaječnicků u zvířat generace P není povinné. Provede se rovněž vyšetření orgánů vykazujících změny spojené s aplikací látky u zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, které mohou napomoci stanovit dávku NOAEL. Histopatologické vyšetření se navíc provede u reprodukčních orgánů zvířat ze skupiny s nízkou a střední dávkou, u kterých je podezření na sníženou plodnost, např. u těch, u kterých nedošlo k páření, zabřeznutí, zplodnění nebo k vrhu zdravého potomstva nebo u kterých byl ovlivněn estrální cyklus nebo počet, motilita nebo morfologie spermií. Vyšetří se všechny makroskopické léze, jako např. atrofie nebo tumory.

Za účelem zjištění účinků spojených s aplikací, jako jsou např. nevyvinuté spermatidy, chybějící vrstva nebo typ zárodečných buněk, mnohoaderné obří buňky nebo rozrušení spermatických buněk v dutině, se provede podrobné histopatologické vyšetření varlat (např. pomocí Bouinova roztoku, zalití do parafínu a příčných řezů o tloušťce 4–5 μm) (14). Vyšetření intaktního nadvarlete by mělo zahrnovat vyšetření hlavy, těla a kaudální části, čehož lze dosáhnout vyhodnocením podélného řezu. U nadvarlete se vyšetří leukocytová infiltrace, změna v prevalenci typů buněk, aberantní typy buněk a fagocytóza spermií. k vyšetření samčí rozmnožovací soustavy lze použít PAS a hematoxylin.

Postlaktanční vaječník by měl obsahovat původní a rostoucí folikuly a rovněž zvětšená žlutá tělíska z období laktace. Histopatologické vyšetření by mělo odhalit kvalitativní snížení celkového počtu původních folikulů. U samic generace F₁ se provede kvantitativní vyhodnocení původních folikulů. K vyhodnocení použitého postupu je nutné mít statisticky odpovídající počet zvířat, výběr řezů vaječnicků a velikost vzorků řezů. S cílem umožnit srovnání vaječnicků u testované a kontrolní skupiny by mělo vyšetření zahrnovat výpočet počtu původních folikulů, které lze zkombinovat s malými rostoucími folikuly (15, 16, 17, 18, 19).

▼ B1.5.8.2 *Odstavená mláďata*

Pro histopatologické vyšetření se ve vhodném prostředí připraví a uchová makroskopicky abnormální tkáň a cílové orgány od všech mláďat se zevními odchylkami nebo klinickými příznaky a rovněž od jednoho náhodně vybraného mláděte z každého pohlaví a vrhu z obou generací F₁ a F₂, které nebyly vybrány k páření. Kompletní histopatologická charakterizace uchovaných tkání se provede se speciálním důrazem na orgány rozmnožovací soustavy.

2. **ÚDAJE**

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky se zaznamenávají individuálně a shrnou se do tabulek tak, aby byl u každé experimentální skupiny a každé generace uveden počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých během zkoušky nebo utracených z humanitních důvodů, doba úhynu nebo humanitního utracení, počet plodných samic, počet březích samic, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis pozorovaných příznaků toxicity včetně doby nástupu, trvání a závažnosti veškerých toxických účinků, typy pozorování rodičovských zvířat a jejich potomstva a všechny významné údaje o vrhu.

Numerické výsledky se vyhodnotí pomocí vhodné, všeobecně uznávané statistické metody; metody se zvolí v rámci návrhu studie a je třeba je zdůvodnit. Pro analýzu dat je vhodné použít statistické modely dávka-odezva. Protokol by měl obsahovat dostatečné informace o použité metodě analýzy a počítačovém programu, aby mohl tuto analýzu znovu vyhodnotit a rekonstruovat nezávislý statistik.

2.2 HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky této dvougenerační studie reprodukční toxicity se vyhodnotí ve vztahu k pozorovaným účinkům včetně pitvy a mikroskopických nálezů. V hodnocení musí být uvedeno, zda existuje nebo neexistuje souvislost mezi dávkou zkoušené látky a přítomností nebo nepřítomností, výskytem a závažností abnormalit včetně makroskopických lézí stanovených cílových orgánů, vlivu na plodnost, klinických abnormalit, vlivu na reprodukční výkonnost a schopnost vrhu, změny tělesné hmotnosti, vlivu na úmrtnost a další toxické účinky. Při hodnocení výsledků zkoušky se přihlédne k fyzikálně-chemickým vlastnostem zkoušené látky a toxikokinetickým údajům, jsou-li k dispozici.

Správně provedená zkouška reprodukční toxicity by měla zajistit dostačující odhad úrovně dávky bez účinku a vysvětlení nepříznivých účinků na reprodukci, vrh, laktaci, postnatální vývoj včetně růstu a pohlavního vývoje.

▼ B

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Dvougenerační studie reprodukční toxicity poskytne informace o účinku opakované expozice látky během všech fází reprodukčního cyklu. Studie zejména poskytne informace o reprodukčních parametrech a o vývoji, růstu, dozrávání a přežívání potomstva. Výsledky studie se interpretují v souvislosti s výsledky ze subchronických, reprodukčních, toxikokinetických a dalších studií. Výsledky této studie lze použít k posouzení potřeby dalšího zkoušení chemické látky. Extrapolace výsledků této studie na člověka platí pouze v omezené míře. Největší význam těchto výsledků spočívá v tom, že poskytují informace o úrovni dávky bez účinků a o přípustné expozici člověka (20, 21, 22, 23).

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální vlastnosti, a je-li to podstatné, též fyzikálně-chemické vlastnosti,
- identifikační údaje,
- čistota.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění výběru vehikula, pokud není použita voda.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, strava, materiál na výrobu hnízda atd.,
- individuální hmotnosti zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- zdůvodnění výběru úrovně dávky,
- podrobné údaje o složení zkoušené látky/krmiva, o dosažené koncentraci,
- stabilita a homogenita přípravku,
- podrobné údaje o podávání zkoušené látky,
- v případě potřeby přepočtení koncentrace zkoušené látky (ppm) ve stravě/pitné vodě na skutečnou dávku (mg na kg tělesné hmotnosti na den), je-li to možné,
- podrobné údaje o kvalitě stravy a vody.

▼ B

Výsledky:

- spotřeba stravy a vody, jsou-li k dispozici, využití stravy (přírůstek tělesné hmotnosti na gram spotřebované potravy) a spotřeba zkoušené látky u zvířat generace P a F₁ s výjimkou období kohabitace a minimálně poslední třetiny laktace,
- údaje o absorpci (jsou-li k dispozici),
- údaje o tělesné hmotnosti zvířat z generace P a F₁ vybraných k páření,
- údaje o hmotnosti vrhu a mláďat,
- tělesná hmotnost při utracení a údaje o absolutní a relativní hmotnosti orgánů u rodičovských zvířat,
- povaha, závažnost a trvání klinických pozorování (vratných i nevratných),
- den úhynu během studie nebo údaj, že zvířata přežila až do dne utracení,
- údaje o toxické reakci podle pohlaví a dávky, včetně koeficientů páření, plodnosti, gestace, porodnosti, životaschopnosti a laktace; zpráva by měla uvádět údaje využitě při výpočtu těchto koeficientů,
- toxické nebo jiné účinky na reprodukci, potomstvo, postnatální růst atd.;
- pitevni nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- počet samic s normálním cyklem z generace P a F₁ a délka cyklu,
- celkový počet kaudálních epididymálních spermií, procento progresivně pohyblivých spermií, procento morfologicky normálních spermií a procento spermií se všemi identifikovanými abnormalitami,
- doba do páření včetně počtu dnů před pářením,
- délka gestace,
- počet implantátů, žlutých tělísek, velikost vrhu,
- počet živě narozených mláďat a postimplantačních ztrát,
- počet mláďat s makroskopicky viditelnými abnormalitami a počet zakrslých mláďat, pokud byl zjišťován,
- údaje o fyzických vývojových znacích u mláďat a další údaje o postnatálním vývoji; hodnocené fyzické vývojové znaky je nutno zdůvodnit,
- případně údaje o funkčním pozorování mláďat a dospělých zvířat,
- statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

▼B

Rozbor výsledků.

Závěry včetně hodnot NOAEL pro účinky na samice a potomstvo.

4. LITERATURA

- 1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- 2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12; 92–108.
- 3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54; 103–107.
- 4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5; 39–44
- 5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3); 237–244.
- 6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6; 267–273
- 7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulfonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13; 409–421.
- 8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5; 449–458.
- 9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida; s. 319–333.
- 10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10; 401–415.
- 11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8; 330–337.
- 12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6; 491–505.
- 13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17; 298–303.
- 14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- 15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- 16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, s. 421–426.
- 17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

- 18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5; 379–383.
- 19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- 20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- 21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- 22) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- 23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼ B**B.36 STUDIE TOXIKOKINETIKY****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Viz obecný úvod, část B.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává vhodným způsobem. V závislosti na účelu studie je možné látku podávat v jednorázové dávce nebo v opakovaných dávkách po stanovenou dobu jedné nebo několika skupinám pokusných zvířat. Látka a/nebo její metabolity se poté podle typu studie stanoví v tělních tekutinách, tkáních a/nebo v exkretech.

Studie mohou být prováděny s „neznačenou“ nebo „značenou“ formou zkoušené látky. Jestliže se použije značená látka, musí být značena tak, aby se získalo co nejvíce informací o osudu sloučeniny v organismu.

1.5 KRITÉRIA JAKOSTI

Nejsou stanovena.

1.6 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**Příprava**

Zdravá mladá dospělá zvířata se nejméně pět dnů před zkouškou aklimatizují na laboratorní podmínky. Před zkouškou se provede náhodný výběr zvířat, která se přiřadí do experimentálních skupin. Pro řešení speciálních otázek mohou být použita velmi mladá, březí nebo premedikovaná zvířata.

Zkušební podmínky*Pokusná zvířata*

Toxikokinetické studie mohou být prováděny na jednom nebo více vhodných živočišných druzích; měly by být prováděny na druzích používaných nebo určených pro užití v jiných toxikologických studiích s toutéž zkoušenou látkou. Použijí-li se ve zkoušce hlodavci, neměly by odchylky hmotnosti překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti.

Počet a pohlaví

Pro studium absorpce a vylučování se zpočátku pro každou úroveň dávky použije skupina čtyř zvířat. Výběr podle pohlaví se nepožaduje, za určitých podmínek však může být potřeba studovat obě pohlaví. Existuje-li mezi pohlavími rozdíl v odezvě, použijí se čtyři zvířata každého pohlaví. V případě studií na nehlodavcích může být použito méně zvířat. Při studiu distribuce v tkáni se při určení počáteční velikosti skupiny zohlední počet zvířat, která budou utracena v jednotlivých časových bodech, a počet zkoumaných časových bodů.

▼ B

Při studiu metabolismu se velikost skupiny upraví podle potřeb studie. U studií s více dávkami a u studií s více časovými body se při určení velikosti skupiny zohlední počet časových bodů a plánovaných utracení; skupina však nesmí být menší než dvě zvířata. Velikost skupiny zvířat by měla být dostatečná k tomu, aby poskytla charakteristiky fáze retence, rovnovážného stavu a deplece (podle potřeby) u zkoušené látky a/nebo metabolitů.

Úrovně dávek

V případě jednorázového podání se použijí nejméně 2 různé úrovně dávek zkoušené látky. Použije se nízká dávka látky, po které nejsou pozorovány žádné toxické účinky, a vysoká dávka, po které by mohly být nalezeny změny v toxikokinetických parametrech nebo která vyvolává toxické účinky.

V případě opakovaného podání dávky většinou stačí nízká dávka; za určitých podmínek však může být nezbytné také podání vysoké dávky.

Způsob podávání

U toxikokinetické studie se použije stejný způsob podávání, a je-li to vhodné, také stejné vehikulum, jaké se používají v jiných toxikologických studiích. Zkoušená látka se obvykle podává orálně sondou nebo v potravě, aplikuje se na kůži nebo se podává inhalačně po stanovenou dobu skupině pokusných zvířat. Intravenózní podání zkoušené látky může být užitečné pro stanovení relativní rychlosti vstřebávání při jiném způsobu aplikace. Kromě toho mohou být krátce po intravenózní aplikaci získány důležité informace o distribuci látky v organismu.

Je třeba zvážit možnou interferenci vehikula a zkoušené látky. Je třeba také věnovat pozornost rozdílům ve vstřebávání, podává-li se zkoušená látka sondou nebo v potravě, a potřebě přesného stanovení dávky, zejména při podávání zkoušené látky v potravě.

Doba pozorování

Všechna zvířata se pozorují denně a příznaky toxicity i další relevantní klinická pozorování se zaznamenávají spolu s údaji o jejich nástupu, závažnosti a trvání.

Postup

Po zvážení pokusných zvířat se vhodným způsobem podá zkoušená látka. Podle potřeby lze zvířata před podáním zkoušené látky nechat vyhladovět.

▼ B*Absorpce*

Rychlost a rozsah absorpce podávané látky lze stanovit různými metodami, a to s referenční skupinou nebo bez ní ⁽¹⁾, například:

- stanovením množství zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v exkretech, např. v moči, žluči, stolici, vydechovaném vzduchu, a také jejich zbytků v karkasu,
- porovnáním biologické odezvy (např. studií akutní toxicity) exponované a kontrolní a/nebo referenční skupiny,
- porovnáním množství látky a/nebo jejích metabolitů vylučovaných ledvinami u exponované a/nebo referenční skupiny,
- stanovením plochy pod křivkou závislosti koncentrací zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v plazmě na čase a porovnáním s údaji získanými u referenční skupiny.

Distribuce

V současné době jsou pro analýzu distribučního schématu k dispozici dva přístupy, které mohou být použity jednotlivě nebo společně:

- užitečné kvalitativní informace lze získat při použití celotělové autoradiografie,
- kvantitativní informace poskytuje stanovení koncentrací a množství zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v tkáních a orgánech získaných utracením zvířat v různých časových intervalech po zahájení expozice.

Vylučování

Při studiu vylučování se sbírá moč, stolice, vydechovaný vzduch, v určitých případech žluč. Množství zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů se v těchto exkretech stanovuje několikrát po podání látky, a to buď až do vyloučení 95 % podané dávky, nebo do uplynutí 7 dnů od počátku vylučování, podle toho, k čemu dojde dříve.

Ve speciálních případech může být také nezbytné sledovat vylučování zkoušené látky v mléce v době laktace zkušebních zvířat.

Metabolismus

Za účelem stanovení rozsahu a schématu metabolismu se biologické vzorky analyzují vhodnými technikami. Měla by být objasněna struktura metabolitů a mělo by být navrženo odpovídající schéma metabolismu, je-li třeba odpovědět na otázky z předcházejících toxikologických studií. Pro získání informací o metabolismu může být užitečné provedení studií *in vitro*.

Další informace o vztahu mezi metabolismem a toxicitou lze získat z biochemických studií, např. ze studia účinků látky na enzymy metabolického systému, ze sledování poklesu endogenních neproteinových sloučenin obsahujících SH skupiny a z vazby látky na makromolekuly.

⁽¹⁾ V této metodě je referenční skupinou skupina, které je zkoušená látka podávána jiným způsobem, který zajišťuje úplnou biologickou dostupnost dávky.

▼ B**2. ÚDAJE**

V závislosti na typu prováděné studie se údaje shrnou do tabulky a podle potřeby doplní grafickou prezentací. Pro každou experimentální skupinu se uvedou závislosti průměrů a statistických odchylek naměřených hodnot na čase, dávce, tkáních a orgánech (pokud je to relevantní). Stupeň vstřebání a množství a rychlost vylučování se stanoví vhodnými metodami. Jsou-li prováděny studie metabolismu, uvede se struktura identifikovaných metabolitů a možné schéma metabolismu.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Podle typu prováděné studie musí protokol o zkoušce obsahovat pokud možno tyto informace:

- živočišný druh, kmen, původ, podmínky chovu, strava,
- charakteristika značené látky, je-li použita,
- úrovně dávek a intervaly podávání,
- způsob (způsoby) podávání a všechna použitá vehikula,
- pozorované toxické a jiné účinky,
- metody stanovení zkoušené látky a/nebo jejích metabolitů v biologickém materiálu včetně
- vydechovaného vzduchu,
- tabulky výsledků rozdělených podle pohlaví, dávky, stravy, času, tkání a orgánů,
- údaje o rozsahu vstřebávání a vylučování v závislosti na čase,
- metody použité pro popis a identifikaci metabolitů v biologickém materiálu,
- metody použité pro biochemická stanovení týkající se metabolismu,
- navrhované schéma metabolismu,
- diskuse o výsledcích,
- interpretace výsledků.

3.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE

Viz obecný úvod, část B.

4. LITERATURA

Viz obecný úvod, část B.

▼B**B.37 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU PO AKUTNÍ EXPOZICI****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Při posouzení a hodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určitých skupin látek vyvolat specifické typy neurotoxicity, které nemohou být zjištěny jinými studii toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byla pozorována pozdní neurotoxicita; tyto látky mají být podrobeny zkoumání touto metodou.

Screeningové zkoušky *in vitro* lze použít pro vyhledání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii; negativní nález ze zkoušek *in vitro* však neposkytuje důkaz, že látka nemá schopnost vyvolat pozdní neurotoxicitu.

Viz obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Mezi „organické sloučeniny fosforu“ patří neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se pozdním počátkem ataxie, distální axonopatií v míše a periferním nervu a dále inhibicí a stárnutím specifické esterasy (NTE – neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látka může být zkoušena v pozitivní kontrolní skupině s cílem prokázat, že se v laboratorních podmínkách reakce pokusných druhů podstatně nezměnila.

Příkladem široce používané látky s pozdním toxickým účinkem je tri-*o*-tolyl-fosfát (CAS 78308, EINECS 2011035, název podle CAS: tris(2methylfenyl)fosfát), známá také pod názvem triokresylfosfát (TOCP).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se podává orálně v jediné dávce slepicím domácím, chráněným před možnými akutními cholinergními účinky. Zvířata se pozorují po dobu 21 dnů, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a peréza. Biochemická vyšetření, zejména inhibice NTE (neuropathy target esterase), se provádějí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny, obvykle 24 a 48 hodin po podání látky. Dvacet jedna dnů po podání látky se zbývající slepice usmrtí a provede se histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

▼ B

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 **Příprava**

Provede se náhodný výběr mladých zdravých dospělých slepic, které nejsou ovlivněny virovými onemocněními a farmakologickou léčbou a mají normální chuži, přiřadí se do experimentální a kontrolní skupiny a nejméně 5 dnů před zahájením studie se aklimatizují na laboratorní podmínky.

Používají se dostatečně velké klece nebo ohrady umožňující volný pohyb slepic a snadné pozorování chůze.

Zkoušená látka se obvykle podává orálně sondou, želatinovými tobolkami nebo srovnatelnou metodou. Kapaliny se podávají neředěné nebo rozpuštěné ve vhodném vehikulu, jako je např. kukuřičný olej, pevné látky by se měly nechat rozpustit, protože velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. Toxické vlastnosti nevodných vehikul by měly být známy před zkouškou, a pokud nejsou známy, měly by být předem určeny.

1.5.2 **Zkušební podmínky**1.5.2.1 *Pokusná zvířata*

Doporučuje se mladá nosnice kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), stará 8–12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a slepice by měly být chovány za podmínek umožňujících volný pohyb.

1.5.2.2 *Počet a pohlaví*

Kromě experimentální skupiny by měla být použita kontrolní skupina s vehikulem a pozitivní kontrolní skupina. S výjimkou podání zkoušené látky se s kontrolní skupinou zachází stejně jako s experimentální skupinou.

V každé skupině by měl být použit dostatečný počet slepic, aby aspoň šest slepic mohlo být usmrceno pro biochemické vyšetření (tři v první a tři v druhý den po podání) a šest přežilo 21denní pozorování patologických příznaků.

Pozitivní kontrolní skupina může být zkoušena souběžně nebo mohou být použity údaje z nedávno použité kontrolní skupiny. Měla by zahrnovat nejméně šest slepic, kterým se podá látka, o níž je známo, že vyvolává pozdní neurotoxicitu, tři slepice pro biochemické vyšetření a tři slepice pro histopatologické vyšetření. Doporučuje se periodicky doplňovat historické údaje. Nové pozitivní kontrolní údaje by měly být doplněny, pokud provádějící laboratoř v průběhu testu změní některý základní prvek zkoušky (např. plemeno, stravu, podmínky chovu).

▼ B1.5.2.3 *Úrovně dávek*

Měla by se provést předběžná studie za použití vhodného počtu slepic a skupin s různými úrovněmi dávek, aby bylo možné stanovit úroveň, která má být použita v hlavní studii. Pro stanovení přiměřené dávky v hlavní studii je v této předběžné studii nezbytná určitá letalita. Aby se však zabránilo úhynu vlivem akutních cholinergních účinků, lze použít atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že nemá vliv na pozdní neurotoxické reakce. Pro odhad nejvyšší neletální dávky zkoušených látek lze použít řadu metod (viz metoda B.1a). Při výběru dávky mohou být užitečné také dosa-
vadní údaje o slepicích nebo jiné toxikologické informace.

Úroveň dávky zkoušené látky v hlavní studii by měla být co nejvyšší, přičemž se berou v úvahu výsledky předběžné studie výběru dávky a horní limit dávky 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti. Případný úhyn by neměl narušit dostatečný počet zvířat pro biochemická vyšetření (šest) a pro histologická vyšetření (šest) po 21 dnech. Aby se zabránilo úmrtí vlivem akutních cholinergních účinků, použije se atropin nebo jiný ochranný přípravek, o kterém je známo, že nemá vliv na pozdní neurotoxické účinky.

1.5.2.4 *Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsanych v této studii při jedné dávce nejméně 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití vyšší dávky nezbytná. Limitní zkouška se použije s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

1.5.3 **Doba pozorování**

Doba pozorování by měla být 21 dnů.

1.5.4 **Postup**

Po podání přípravku chránícího před uhynutím na následky akutního cholinergního účinku se podá zkoušená látka v jedné dávce.

Obecná pozorování

Pozorování by měla začít okamžitě po podání. Všechny slepice se pečlivě několikrát denně pozorují v průběhu prvních dvou dnů a poté nejméně jednou denně po dobu 21 dnů nebo do plánovaného usmrcení. Veškeré příznaky toxicity by měly být zaznamenány, včetně doby nástupu, typu, závažnosti a trvání abnormálního chování. Ataxie by měla být hodnocena podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice a zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice určené s patologickými příznaky vyjmou z klecí a podrobí zkoušce nucené motorické aktivity, jako např. stoupání po žebříku, aby se usnadnilo posouzení sebemenších toxických účinků. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

▼B

Tělesná hmotnost

Všechny slepice se zváží těsně před podáním zkoušené látky a poté nejméně jednou týdně.

Biochemická vyšetření

Šest slepic náhodně vybraných z každé experimentální skupiny a kontrolní skupiny s vehikulem a tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny (pokud se zkouška souběžně provádí s touto skupinou) se usmrtí v prvních dnech po podání látky, mozek a lumbální mícha se vypreparují a vyšetří se na inhibici NTE. Dále může být rovněž vhodné vypreparovat *n. ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici aktivity NTE. Zpravidla se usmrtí tři slepice z kontrolní skupiny a z každé experimentální skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách, zatímco tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny se usmrtí po 24 hodinách. Pokud pozorování klinických příznaků toxicity naznačuje, že se toxická látka v organismu vstřebává velmi pomalu (to lze často posoudit pozorováním doby nástupu cholinergních příznaků), může být vhodnější odebrat vzorek tkáně dvakrát ze tří zvířat mezi 24 až 72 hodinami po podání látky.

Na těchto vzorcích tkáně mohou být provedeny také analýza acetylcholinesterasy (AChE), je-li to považováno za vhodné. *In vivo* však může nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

Pitva

Pitva všech zvířat (usmrcených podle plánu a utracených v agónii) by měla zahrnovat posouzení stavu mozku a míchy.

Histopatologická vyšetření

Nervová tkáň zvířat, která přežila dobu pozorování a nebyla použita pro biochemické studie, by měla být mikroskopicky vyšetřena. Tkáně by měly být fixovány *in situ*, za použití perfúzních technik. Odebírá se mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha a periferní nervy. Řezy míchy by měly být odebrány z horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální oblasti. Měly by být odebrány řezy distální části *n. tibialis* a jeho větví k *m. gastrocnemius* a z *n. ischiadicus*. Řezy se barví vhodnými barvivy na myelin a axony.

2. ÚDAJE

Negativní výsledky získané pro výsledné účinky zvolené v této metodě (biochemická a histopatologická vyšetření a vyšetření změn chování) nevyžadují zpravidla další zkoušení pozdní neurotoxicity. Při dvojnárodných nebo neprůkazných výsledcích těchto vyšetření může být nezbytné další sledování.

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, účinky na chování nebo biochemické účinky, typ a závažnost těchto lézí nebo účinků a procento zvířat vykazující každý typ a závažnost léze nebo účinku.

▼B

Údaje z této studie by měly být vyhodnoceny z hlediska výskytu, závažnosti a korelace účinků na chování a biochemických a histopatologických nálezů a dále jakýchkoli dalších pozorovaných účinků na experimentální a kontrolní skupiny.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

3. ZPRÁVY**PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

3.1 Pokusná zvířata:

- použité plemeno,
- počet a stáří zvířat,
- původ, podmínky chovu atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

3.2 Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, popřípadě o její stálosti a homogenitě,
- zdůvodnění volby vehikula,
- podrobné údaje o podání zkoušené látky,
- podrobné údaje o stravě a o kvalitě vody,
- zdůvodnění výběru úrovně dávek,
- specifikace podávaných dávek, včetně podrobných informací o vehikulu, objemu a fyzikální formě podané látky,
- identifikace jakéhokoli ochranného přípravku a podrobné informace o jeho podání.

3.3 Výsledky:

- údaje o tělesné hmotnosti,
- údaje o toxických reakcích podle skupin, včetně mortality,
- charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),
- podrobný popis biochemických vyšetření a nálezů,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- popřípadě statistické vyhodnocení výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

Metoda je analogická metodě OECD TG 418.

▼B**B.38 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU – 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Při posouzení a hodnocení toxických účinků látek je důležité vzít v úvahu schopnost určitých skupin látek vyvolat specifické typy neurotoxicity, které nemohou být zjištěny jinými studii toxicity. U určitých organických sloučenin fosforu byla pozorována pozdní neurotoxicita; tyto látky mají být podrobeny zkoumání touto metodou.

Screeningové zkoušky *in vitro* lze použít pro vyhledání látek, které mohou vyvolat pozdní polyneuropatii; negativní nález ze zkoušek *in vitro* však neposkytuje důkaz, že látka nemá schopnost vyvolat pozdní neurotoxicitu.

28denní zkouška pozdní neurotoxicity poskytuje informace o možném nebezpečí pro zdraví, které by se mohlo projevit z opakovaných expozic během omezeného časového období. Poskytne informace o reakci na dávku a může poskytnout odhad úrovně bez pozorovatelných nepříznivých účinků, což může být užitečné při stanovení kritérií pro bezpečnou expozici člověka.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Mezi „organické sloučeniny fosforu“ patří neutrální organické estery, thioestery nebo anhydridy kyseliny fosforečné, fosfonové nebo amidofosforečné nebo příslušných kyselin thiofosforečných, thiofosfonových nebo amidothiofosforečných, nebo jiné látky, které mohou způsobit pozdní neurotoxicitu pozorovanou u některých látek této skupiny.

Pozdní neurotoxicita je syndrom projevující se pozdním počátkem ataxie, distální axonopatií v míše a periferním nervu a dále inhibicí a stárnutím specifické esterasy (NTE – neuropathy target esterase) v nervové tkáni.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušené látky se podávají denně orálně slepicím domácím po dobu 28 dnů. Zvířata se pozorují nejméně jednou denně, zaznamenává se abnormální chování, ataxie a paréza ještě 14 dnů po poslední dávce. Biochemická vyšetření, zejména inhibice NTE (neropathy target esterase), se provádějí u slepic náhodně vybraných z každé skupiny, obvykle 24 a 48 hodin po podání látky. Dva týdny po poslední dávce se zbývající slepice usmrtí a provede se histopatologické vyšetření vybraných nervových tkání.

▼ B

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava

Provede se náhodný výběr mladých zdravých dospělých slepic, které nejsou ovlivněny virovými onemocněními a farmakologickou léčbou a mají normální chůzi, přiřadí se do experimentální a kontrolních skupin a nejméně 5 dnů před zahájením studie se aklimatizují na laboratorní podmínky.

Používají se dostatečně velké klece nebo ohrady umožňující volný pohyb slepic a snadné pozorování chůze.

Zkoušená látka se podává každý den, 7 dnů v týdnu, nejlépe orálně sondou nebo želatinovými tobolkami. Kapaliny se podávají neředěné nebo rozpuštěné ve vhodném vehikulu, např. kukuřičný olej, pevné látky by se měly nechat rozpustit, protože velké dávky pevných látek v želatinových tobolkách by se nemusely dostatečně vstřebat. Toxické vlastnosti nevodných vehikul by měly být známy před zkouškou, a pokud nejsou známy, měly by být předem určeny.

1.4.2 Zkušební podmínky

Pokusná zvířata

Doporučuje se mladá nosnice kura domácího (*Gallus gallus domesticus*), stará 8–12 měsíců. Používají se plemena o standardní velikosti a slepice by měly být chovány za podmínek umožňujících volný pohyb.

Počet a pohlaví

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální skupiny a kontrolní skupina s vehikulem. S výjimkou podání zkoušené látky se s kontrolní skupinou s vehikulem zachází stejně jako s experimentální skupinou.

V každé skupině by měl být použit dostatečný počet slepic, aby aspoň šest slepic mohlo být usmrceno pro biochemické vyšetření (tři v první a tři v druhý den po podání) a šest přežilo 14denní pozorování patologických příznaků.

Úrovně dávek

Při výběru úrovně dávek by měly být vzaty v úvahu tři výsledky akutní zkoušky pozdní neurotoxicity a jakékoli další dostupné údaje o toxicitě a kinetice zkoušené sloučeniny. Nejvyšší úroveň dávky by měla být vybrána s cílem vyvolat toxické účinky, nejlépe pozdní neurotoxicitu, ne však uhynutí nebo zjevné utrpení. Dále by měla být zvolena sestupná řada dávek s cílem prokázat, že existuje závislost účinku na dávce a že nejnižší dávka nevyvolává žádné projevy toxicity.

▼ B*Limitní zkouška*

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné toxické účinky a pokud se na základě údajů o látkách s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není úplná studie za použití vyšší dávky nezbytná. Limitní zkouška se provádí s výjimkou případu, kdy údaje o expozici člověka naznačují, že je nezbytné použití vyšší úrovně dávek.

Doba pozorování

Všechna zvířata by měla být pozorována nejméně jednou denně po dobu expozice a 14 dnů po ní až do provedení pitvy podle plánu.

1.4.3 **Postup**

Zvířatům se podává zkoušená látka sedm dnů v týdnu po dobu 28 dnů.

Obecná pozorování

Pozorování by měla začít okamžitě po podání. Všechny slepice se pečlivě pozorují jednou denně každý den z 28 dnů expozice a 14 dnů po expozici nebo do plánovaného usmrcení. Veškeré příznaky toxicity by měly být zaznamenány, včetně doby nástupu, typu, závažnosti a trvání. Pozorování má zahrnovat abnormality chování, ale nemá se na ně omezovat. Ataxie by měla být hodnocena podle nejméně čtyřstupňové pořadové stupnice a zaznamenává se paréza. Nejméně dvakrát týdně se slepice s patologickými příznaky vyjmou z klecí a podrobí zkoušce nucené motorické aktivity, jako např. stoupaní po žebříku, aby se usnadnilo posouzení sebemenších toxických účinků. Zvířata v agónii a zvířata, která se trápí nebo trpí bolestí, se ihned vyřadí, humánně utratí a pitvají.

Tělesná hmotnost

Všechny slepice se zváží těsně před podáním zkoušené látky a poté nejméně jednou týdně.

Biochemická vyšetření

Šest slepic náhodně vybraných z každé experimentální skupiny a kontrolní skupiny s vehikulem a tři slepice z pozitivní kontrolní skupiny se usmrtí v prvních dnech po podání poslední dávky, mozek a lumbální mícha se vypreparují a vyšetří se na inhibici NTE. Dále může být vhodné vypreparovat *n. ischiadicus* a analyzovat jeho tkáň na inhibici aktivity NTE. Zpravidla se usmrtí tři slepice z kontrolní skupiny a z každé experimentální skupiny po 24 hodinách a další tři po 48 hodinách od poslední dávky. Pokud údaje z akutní studie nebo z jiných studií (např. toxikokinetických) naznačují, že jsou vhodné jiné doby usmrcení po poslední dávce než tyto doby, měly by být použity a zdůvodnění by mělo být uvedeno v dokumentaci.

Na těchto vzorcích tkáně mohou být provedeny také analýza acetylcholinesterasy (AChE), je-li to považováno za vhodné. In vivo však může nastat spontánní reaktivace AChE, což může vést k podcenění látky jako inhibitoru AChE.

▼ B*Pitva*

Pitva všech zvířat (usmrčených podle plánu a utracených v agónii) by měla zahrnovat posouzení stavu mozku a míchy.

Histopatologická vyšetření

Nervová tkáň zvířat, která přežila dobu pozorování a nebyla použita pro biochemické studie, by měla být mikroskopicky vyšetřena. Tkáně by měly být fixovány *in situ*, za použití perfúzních technik. Odebírá se mozeček (střední podélný řez), prodloužená mícha, mícha a periferní nervy. Řez míchy by měl být proveden z horní krční části, střední hrudní a lumbosakrální oblasti. Měly by být odebrány řezy distální části *n. tibialis* a jeho větví k *m. gastrocnemius* a z *n. ischiadicus*. Řezy se barví vhodnými barvivy na myelin a axony. Nejprve by mělo být provedeno mikroskopické vyšetření fixované tkáně všech zvířat kontrolní skupiny a skupiny s vysokou dávkou. Pokud se u skupiny s vysokou dávkou projeví účinky, mělo by být mikroskopické vyšetření provedeno také na slepicích ze skupiny se střední a nízkou dávkou.

2. ÚDAJE

Negativní výsledky získané pro výsledné účinky zvolené v této metodě (biochemická a histopatologická vyšetření a vyšetření změn chování) nevyžadují zpravidla další zkoušení pozdní neurotoxicity. Při dvojnásobných nebo neprůkazných výsledcích těchto vyšetření může být nezbytné další sledování.

Měly by být uvedeny údaje pro každé jednotlivé zvíře. Navíc by měly být všechny údaje shrnuty do tabulky, přičemž se uvede u každé experimentální skupiny počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat vykazujících léze, účinky na chování nebo biochemické účinky, typ a závažnost těchto lézí nebo účinků a procento zvířat vykazující každý typ a závažnost léze nebo účinku.

Údaje z této studie by měly být vyhodnoceny z hlediska výskytu, závažnosti a korelace účinků na chování a biochemických a histopatologických nálezů a dále jakýchkoli dalších pozorovaných účinků na experimentální a kontrolní skupiny.

Číselné výsledky by měly být pokud možno vyhodnoceny vhodnou a obecně uznávanou statistickou metodou. Statistická metoda by měla být zvolena již při plánování studie.

3. ZPRÁVY**PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce obsahuje pokud možno tyto informace:

3.1 Pokusná zvířata:

- použité plemeno,
- počet a stáří zvířat,
- původ, podmínky chovu atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

▼B

3.2 Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o přípravě zkoušené látky, popřípadě o její stálosti a homogenitě,
- zdůvodnění volby vehikula,
- podrobné údaje o způsobu podání zkoušené látky,
- podrobné údaje o stravě a o kvalitě vody,
- zdůvodnění výběru úrovní dávek,
- specifikace podávaných dávek, včetně podrobných informací o vehikulu, objemu a fyzikální formě podané látky,
- zdůvodnění jiných časů odběru pro biochemické vyšetření, není-li použito 24 a 48 hodin.

3.3 Výsledky:

- údaje o tělesné hmotnosti,
- údaje o toxických reakcích podle skupin, včetně mortality,
- úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků,
- charakter, závažnost a trvání klinických projevů (zda byly vratné nebo nevratné),
- podrobný popis biochemických vyšetření a nálezů,
- pitevnické nálezy,
- podrobný popis všech histopatologických nálezů,
- popřípadě statistické zpracování výsledků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

Metoda je analogická metodě OECD TG 419.

▼B**B.39 ZKOUŠKA NA NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA (UDS) V JATERNÍCH BUŇKÁCH SAVCŮ *IN VIVO*****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 486. Zkouška na neplánovanou syntézu DNA (UDS) v jaterních buňkách savců *in vivo* (1997).

1.1 ÚVOD

Účelem zkoušky na neplánovanou syntézu DNA (UDS) v jaterních buňkách savců *in vivo* je identifikovat zkoušené látky, které indukují reparace DNA v jaterních buňkách exponovaných zvířat (1, 2, 3, 4).

Tato zkouška *in vivo* poskytuje metodu vyšetření genotoxických účinků chemických látek v játrech. Stanovovaný jev je ukazatelem poškození DNA a následné reparace v jaterních buňkách. Játra jsou obvykle hlavním místem, kde jsou absorbované sloučeniny metabolizovány. Jsou tedy vhodným místem pro hodnocení míry poškození DNA *in vivo*.

Jestliže existuje důkaz o tom, že se zkoušená látka nedostane do cílové tkáně, není vhodné tuto zkoušku použít.

Rozsah neplánované syntézy DNA (UDS) se zhodnotí stanovením inkorporace značených nukleosidů do buněk, které neprošly plánovanou syntézou DNA (S-fází). Nejrozšířenější technikou je autoradiografické stanovení inkorporace thymidinu značeného tritiem (³H-TdR). Pro zkoušky na UDS *in vivo* se přednostně používají játra potkana. Jiné tkáně než játra mohou být rovněž použity, nejsou však předmětem této metody.

Detekce odpovědi UDS závisí na počtu bází DNA vyštěpených a nahrazených v místě poškození. Zkouška na UDS je tedy vhodná zvláště pro detekci dlouhých reparací („long-patch repair“) (20 až 30 bází) indukovaných látkou. Krátké opravy („short-patch repair“) (jedna až tři báze) jsou naproti tomu detekovány s daleko menší citlivostí. Navíc může důsledkem neuskutečněné reparace, chybné reparace nebo chybné replikace lézí DNA dojít k mutagenním událostem. Rozsah odpovědi UDS neposkytuje žádnou informaci o věrnosti reparačních procesů. Navíc je možné, že mutagen reaguje s DNA, ale poškození DNA není opraveno vyštěpovací reparací. Nedostatek specifických informací, které tato zkouška poskytuje o mutagenní aktivitě, je vyvážen potenciální citlivostí tohoto jevu, neboť je vyšetřován v celém genomu.

Viz také obecný úvod, část B.

1.2 DEFINICE

Opravované buňky: čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG) vyšší než předvolená hodnota stanovená laboratoří provádějící zkoušku.

Čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG): kvantitativní míra UDS aktivity buněk v autoradiografické zkoušce na UDS, vypočtená odečtením průměrného počtu zrn v cytoplasmatických oblastech (CG) odpovídajících jádrům od počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům (NG): $NNG = NG - CG$. Hodnota NNG se vypočte pro jednotlivé buňky, poté společně pro buňky v kultuře, v paralelních kulturách atd.

▼ B

Neplánovaná syntéza DNA (UDS): syntéza reparací DNA po vyštěpení a odstranění úseku DNA obsahujícího region s poškozením indukovaným chemickými látkami nebo fyzikálními činiteli.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška na UDS v jaterních buňkách savců *in vivo* indikuje syntézu reparací DNA po vyštěpení a odstranění úseku DNA obsahujícího region s poškozením indukovaným chemickými látkami nebo fyzikálními činiteli. Zkouška je obvykle založena na inkorporaci ³H-TdR do DNA jaterních buněk, kde je malá četnost buněk v S-fázi buněčného cyklu. Inkorporace ³H-TdR je obvykle stanoveno autoradiografií, jelikož tato technika není tak citlivá na vliv S-fáze buněk jako např. kapalná scintilační spektrometrie.

1.4 POPIS METODY**1.4.1 Přípravky****1.4.1.1 Výběr druhu zvířete**

Běžně je používán potkan, ačkoli lze použít jakýkoli vhodný druh savce. Měly by být použity běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých pohlavně dospělých zvířat. V okamžiku zahájení studie by měla být odchylka v hmotnosti zvířat minimální a neměla by překročit ± 20 % střední hodnoty hmotnosti pro obě pohlaví.

1.4.1.2 Podmínky chovu a strava

Platí obecné podmínky podle obecného úvodu k části B, přičemž by mělo být dosaženo vlhkosti vzduchu 50–60 %.

1.4.1.3 Příprava zvířat

Zdravá mladá dospělá zvířata se náhodným výběrem rozdělí na kontrolní skupinu a skupinu, která se exponuje. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv jejich polohy minimalizován. Zvířata se jednoznačně identifikují a před započítáním studie se nechají v laboratorních podmínkách alespoň pět dní aklimatizovat.

1.4.1.4 Příprava zkoušené látky

Pevné zkoušené látky by měly být před aplikací zvířatům rozpuštěny nebo suspendovány ve vhodných rozpouštědlech nebo vehikulech a popřípadě zředěny. Kapalně zkoušené látky mohou být podávány přímo nebo mohou být před podáním zředěny. Měly by být použity čerstvě připravené zkoušené látky, pokud údaje o stálosti neprokazují možnost skladování.

1.4.2 Zkušební podmínky**1.4.2.1 Rozpouštědlo/vehikulum**

Rozpouštědlo/vehikulum by nemělo mít při použitých úrovních dávek toxické účinky a mělo by být vyloučeno podezření, že reaguje se zkoušenou látkou. Jsou-li použita jiná než známá rozpouštědla/vehikula, mělo by být jejich zařazení podloženo údaji o jejich kompatibilitě. Doporučuje se pokud možno nejdříve zvážit použití vodných rozpouštědel/vehikul.

▼ B1.4.2.2 *Kontroly*

Součástí každé nezávisle prováděné části experimentu by měly být souběžné pozitivní a negativní (rozpuštědlo/vehikulum) kontroly. s výjimkou aplikace zkoušené látky by měla zvířata kontrolní skupiny podstoupit stejný proces jako zvířata ve skupinách, v nichž dojde k expozici.

Pozitivními kontrolami by měly být látky, o nichž je známo, že jejich podávání v očekávaných expozičních koncentracích vede k nárůstu UDS detekovatelnému nad pozadím. Pozitivní kontroly vyžadující metabolickou aktivaci by měly být použity v dávkách vyvolávající mírnou odpověď (4). Dávky mohou být zvoleny tak, aby byl účinek zřetelný, ale aby při odečtu nevyšla ihned najevo

kódovaná identifikace preparátu. Příklady látek pro pozitivní kontrolu:

Doby odběru	Látka	Číslo CAS	Číslo podle EINECS
Časné doby odběru (2 až 4 hodiny)	N-nitrosodimethylamin	62-75-9	200-249-8
Pozdní doby odběru (12 až 16 hodin)	N-(fluoren-2-yl)acetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Mohou být použity také jiné látky pro pozitivní kontrolu. Je přípustné, aby byla pozitivní kontrolní látka podávána jiným způsobem, než zkoušená látka.

1.5 **POSTUP**1.5.1 **Počet a pohlaví zvířat**

Měl by být použit dostatečný počet zvířat, aby bylo zohledněno přirozené biologické kolísání odpovědi na zkoušku. Každá skupina by se měla skládat alespoň ze tří analyzovatelných zvířat. Jestliže jsou shromážděny dostatečné dosavadní údaje, je pro negativní a pozitivní kontrolní skupiny nezbytné pouze jedno až dvě zvířata.

Jestliže jsou v době studie k dispozici údaje ze studií se stejným druhem a za použití stejného způsobu expozice, jež prokazují, že neexistuje mezi pohlavími rozdíl v toxicitě, bude postačující zkoušení jednoho pohlaví, nejlépe samců. Je-li expozice člověka specifická pro určité pohlaví, jako je tomu například u některých farmaceutických látek, měla by být zkouška provedena se zvířaty odpovídajícího pohlaví.

1.5.2 **Plán expozice**

Zkoušené látky jsou zpravidla podávány jednorázově.

1.5.3 **Dávkování**

Za normálních podmínek se používají alespoň dvě úrovně dávek. Nejvyšší dávka je definována jako dávka vyvolávající takové známky toxicity, že vyšší dávky by vedly podle očekávání při stejném režimu dávkování k letalitě. Nižší dávka by měla být zpravidla 50 % až 25 % vyšší dávky.

▼ B

Látky se specifickou biologickou aktivitou při nízkých netoxických dávkách (např. hormony a mitogeny) nemusí kritériím stanovení dávky vyhovovat a měly by být hodnoceny případ od případu. Provádí-li se kvůli neexistenci vhodných dostupných údajů studie pro zjištění rozsahu, měla by být provedena ve stejné laboratoři, se stejným druhem, kmenem, pohlavím a za stejného režimu expozice, jež se použijí v hlavní studii.

Nejvyšší dávka může být definována také jako dávka vyvolávající známky toxicity v játrech (např. pyknotická jádra).

1.5.4 Limitní zkouška

Jestliže zkouška s jednou dávkou o alespoň 2 000 mg/kg tělesné hmotnosti podanou jednorázově nebo ve dvou dávkách v jednom dni nevykazuje žádné pozorovatelné toxické účinky a není-li na základě údajů o látkách, které mají podobnou strukturu, očekávána genotoxicita, nemusí být úplná studie nezbytná. Očekávaná expozice člověka může znamenat potřebu použít v limitní zkoušce vyšší úroveň dávky.

1.5.5 Podávání dávek

Zkoušená látka se obvykle podává nitrožaludečně, žaludeční sondou nebo vhodnou intubační kanylou. Jiné způsoby podávání jsou možné, lze-li je zdůvodnit. Podávání intraperitoneálně se však nedoporučuje, neboť by játra mohla být exponována zkoušené látce přímo a nikoli prostřednictvím oběhového systému. Maximální objem kapaliny, který může být najednou podán žaludeční sondou nebo injekčně, závisí na velikosti testovacího zvířete. Objem by neměl překročit 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Použití vyšších objemů, než je uvedený objem, musí být zdůvodněno. Až na dráždivé a žíravé látky, které obvykle při vyšších koncentracích vykazují zesílené účinky, by měla být variabilita zkušební objemu minimalizována nastavením koncentrace zajišťující konstantní objem při všech úrovních dávky.

1.5.6 Příprava jaterních buněk

Jaterní buňky se připravují z exponovaných zvířat zpravidla 12 až 16 hodin po podání dávky. Doplňující dřívější odebrání vzorků (obecně dvě až čtyři hodiny po expozici) je nezbytné, není-li po 12 až 16 hodinách jasná pozitivní odpověď. Mohou však být použity jiné doby odběru, jsou-li zdůvodněny na základě toxikokinetických údajů.

Krátkodobé kultury jaterních buněk savců se zpravidla zakládají perfuzí jater kolagenasou *in situ* a umožní se, aby se čerstvě disociované jaterní buňky zachytily na vhodném povrchu. Jaterní buňky z negativní kontroly by měly vykazovat životaschopnost (5) alespoň 50 %.

1.5.7 Stanovení UDS

Čerstvě izolované jaterní buňky savců se obvykle vhodnou dobu, např. tři až osm hodin, inkubují s médiem obsahujícím ³H-TdR. Na konci inkubační doby by mělo být médium z buněk odstraněno a buňky poté mohou být inkubovány s médiem obsahujícím přebytek neznačeného thymidinu, aby byla snížena neinkorporovaná radioaktivita („cold chase“). Buňky se poté promyjí, fixují a vysuší. Při delší inkubační době nemusí být snížení radioaktivity nezbytné. Preparáty se ponoří do autoradiografické emulze, exponují se v temnu (např. v chladu 7 až 14 dnů), vyvolají se, obarví a spočítají se exponovaná zna stříbra. Z každého zvířete se připraví dva až tři preparáty.

▼ B**1.5.8 Analýza**

Preparáty by měly obsahovat dostatečný počet morfologicky normálních buněk, aby mělo hodnocení UDS výpovědní hodnotu. Preparáty se pod mikroskopem prohlédnou na známky zjevné cytotoxicity (např. na pyknosu, sníženou úroveň značení radioaktivním izotopem).

Před počítáním zrn by měly být preparáty kódovány. Zpravidla se vyšetřuje 100 buněk na každé zvíře alespoň ze dvou preparátů; vyšetření méně než 100 buněk/zvíře by mělo být zdůvodněno. Při počítání zrn se jádra v S-fázi nevyšetřují, ale podíl buněk v S-fázi může být zaznamenán.

Množství ^3H -TdR inkorporovaného do jader a cytoplasmy morfologicky normálních buněk doložené navrstvením zrn stříbra by mělo být stanoveno vhodnou metodou.

Počet buněk se stanoví z počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům (NG) a z průměrného počtu zrn v cytoplasmatických oblastech (CG) odpovídajících jádrům. Jako hodnota CG se použije buď počet buněk pro nejsilněji označenou oblast cytoplasmy, nebo průměrná hodnota dvou až tří náhodně vybraných oblastí v blízkosti dotýčných buněčných jader. Po odpovídajícím zdůvodnění mohou být použity i jiné postupy stanovení počtu buněk (např. počítání celých buněk) (6).

2. ÚDAJE**2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Měly by být uvedeny údaje pro jednotlivé preparáty a zvířata. Údaje by měly být dále shrnuty ve formě tabulky. Odečtením hodnoty CG od hodnoty NG by měl být vypočten pro každou buňku, pro každé zvíře a pro každou dávku a čas čistý počet zrn odpovídajících buněčným jádrům (NNG). Jestliže jsou počítány „opravované“ buňky, měla by být kritéria pro definování „opravovaných“ buněk odůvodněna a založena na dosavadních nebo souběžných údajích o negativních kontrolách. Numerické výsledky mohou být zhodnoceny statistickými metodami. Mají-li být použity, měly by být statistické testy vybrány a odůvodněny před provedením studie.

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Mezi příklady kritérií pro pozitivní nebo negativní odpověď patří:

- | | |
|-----------|---|
| pozitivní | <ul style="list-style-type: none"> i) hodnota NNG leží nad prahovou úrovní, která je zdůvodněna na základě dosavadních údajů laboratoře; nebo ii) hodnota NNG je významně vyšší než hodnota pro souběžnou kontrolu; |
| negativní | <ul style="list-style-type: none"> i) hodnota NNG leží na dosavadní prahové hodnotě nebo pod ní; nebo ii) hodnota NNG není významně vyšší než hodnota pro souběžnou kontrolu. |

▼B

Měla by být uvažována biologická relevance údajů, tj. měly by být vzaty v úvahu parametry, jako jsou variabilita zvířat, vztah dávky a odpovědi a cytotoxicita. Při hodnocení výsledků zkoušky mohou být použity jako pomocný prostředek statistické metody. Statistická významnost by neměla být jediným určujícím faktorem pro pozitivní odpověď.

Ačkoli většina experimentů poskytne jasně pozitivní nebo negativní výsledky, v ojedinělých případech neumožní soubor údajů vyslovit konečný výrok o aktivitě zkoušené látky. Výsledky mohou zůstat dvojznačné nebo sporné bez ohledu na to, kolikrát je experiment opakován.

Pozitivní výsledky zkoušky na UDS v jaterních buňkách savců *in vivo* znamenají, že zkoušená látka indukuje v jaterních buňkách savců *in vivo* poškození DNA, které lze opravit neplánovanou syntézou DNA *in vitro*. Negativní výsledky znamenají, že zkoušená látka za podmínek zkoušky neindukuje poškození DNA, které lze detekovat touto zkouškou.

Měla by být diskutována pravděpodobnost, s jakou se zkoušená látka dostane do krevního oběhu popř. do cílové tkáně (např. systémová toxicita).

3. **ZPRÁVY****PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Rozpouštědlo/vehikulum:

- zdůvodnění volby vehikula,
- rozpustnost a stálost zkoušené látky v rozpouštědle/vehikulu, je-li známa.

Testovací zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- zdroj, podmínky chovu, strava atd.,
- individuální hmotnost zvířat na počátku zkoušky, včetně rozpětí tělesné hmotnosti, střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou skupinu.

Zkušební podmínky:

- pozitivní a negativní (vehikulum/rozpouštědlo) kontroly,
- údaje ze studie pro zjištění rozsahu, pokud byla provedena,
- zdůvodnění zvolených úrovní dávek,
- údaje o přípravě zkoušené látky,
- údaje o podávání zkoušené látky,
- zdůvodnění způsobu podávání,
- popřípadě metody ověření, zda se zkoušená látka dostala do krevního oběhu nebo do cílové tkáně,

▼B

- případně přepočítání mezi koncentrací zkoušené látky v krmivu nebo vodě (ppm) na odpovídající dávku (mg/kg tělesné hmotnosti/den),
- podrobné údaje o kvalitě krmiva a vody,
- podrobný popis rozvrhu expozice a odběru,
- metody stanovení toxicity,
- metody přípravy a kultivace jaterních buněk,
- použitá autoradiografická technika,
- počet preparátů a počet vyšetřených buněk,
- kritéria hodnocení,
- kritéria klasifikace studie na pozitivní, negativní nebo dvojnásobnou.

Výsledky:

- střední hodnoty počtu zrn odpovídajících buněčným jádrům a počtu zrn odpovídajících cytoplasmě a čistý počet zrn, jednotlivě pro preparáty, zvířata a skupiny,
- podle možnosti závislost odpovědi na dávce,
- případné statistické hodnocení,
- známky toxicity,
- údaje o souběžné negativní (rozpuštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole,
- dosavadní údaje o negativní (rozpuštědlo/vehikulum) a pozitivní kontrole s rozmezími, středními hodnotami a směrodatnými odchylkami,
- počet buněk „opravovaných“ buněk, je-li stanoven,
- počet buněk v S-fázi, je-li stanoven,
- životaschopnost buněk.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. **LITERATURA**

- 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, 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, 123–133.
- 3) Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). *In Vivo* Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures*. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 52–77.

▼B

- 4) Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo*. *Mutation Res.*, 312, 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, 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, 553–562.

▼B**B.40 LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA
TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)****1. METODA**

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 430 (2004).

1.1 ÚVOD

Poleptáním kůže se rozumí nevratné poškození tkáně kůže po aplikaci zkoušeného materiálu (definované globálně harmonizovaným systémem klasifikace a označování látek a přípravků (GHS)) (1). Tato metoda uvádí postup posouzení leptavých účinků – žíravosti, který není prováděn na živých zvířatech.

Posuzování leptavých účinků na kůži bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (2). Snaha o omezení bolesti a utrpení pokusných zvířat vedla k takové revizi zkušební metody B.4, která umožňuje stanovit leptavé účinky na kůži alternativními metodami *in vitro*, vylučujícími bolest a utrpení zvířat.

Prvním krokem k definování alternativních zkoušek, které by umožňovaly zkoušet leptavé účinky na kůži pro účely regulace, bylo provedení předvalidačních studií (3). Poté byla provedena řádná validační studie metod *in vitro* (6, 7, 8) pro posuzování leptavých účinků na kůži (4, 5). Závěr z těchto studií a z dalších publikací vedl k doporučení, že pro posouzení leptavých účinků na kůži *in vivo* by mohly být použity tyto zkoušky (9, 10, 11): zkouška pomocí modelu lidské kůže (viz zkušební metodu B.40a) a zkouška transkutánního elektrického odporu (tato metoda).

Validační studie a další publikované studie uvádějí, že stanovení transkutánního elektrického odporu (TER) kůže potkana (12, 13) již umožňuje spolehlivě rozlišovat mezi známými látkami kůži leptajícími (žíravými) a neleptajícími (nežíravými) (5, 9).

Zkouška popsána v této metodě umožňuje identifikovat leptavé (žíravé) chemické látky a směsi. Dále umožňuje identifikaci neleptavých (nežíravých) látek a směsí, pokud je doložena důkazními stanoveními založenými na dalších dostupných údajích (např. pH, vztahy mezi strukturou a aktivitou, údaje o vlivu na lidi nebo na zvířata) (1, 2, 11, 14). Zkouška neskýtá údaje o dráždivých účincích na kůži ani neumožňuje rozčleňovat žíravé látky na podskupiny, jak to umožňuje globálně harmonizovaný systém klasifikace (GHS) (1).

Úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích se doporučuje provádět strategií postupného zkoušení, jak je uvedeno ve zkušební metodě B.4 (2) a jak je stanoveno globálně harmonizovaným systémem (1). Tato strategie zkoušení zahrnuje provádění zkoušek leptavých účinků na kůži *in vitro* (jak je uvedeno v této metodě) a dráždivých účinků na kůži před uvážením zkoušek na živých zvířatech.

▼ B

1.2 DEFINICE

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Transkutánní elektrický odpor (TER): je mírou elektrické impedance kůže, vyjádřenou hodnotou elektrického odporu v kiloohmech. Jednoduchá a robustní metoda posouzení bariérové funkce, která spočívá ve sledování průchodu iontů kůží užitím Wheatstoneova můstku.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Tabulka 1

Referenční chemické látky

Název	Č. EINECS	Č. CAS	
propan-1,2-diamin	201-155-9	78-90-0	silně žíravý
kyselina akrylová (kyselina prop-2-enová)	201-177-9	79-10-7	silně žíravá
2-terc -butylfenol	201-807-2	88-18-6	žíravý
hydroxid draselný (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žíravý
kyselina sírová (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žíravá
kyselina oktanová (kyselina kaprylová)	204-677-5	124-07-02	žíravý
4-amino-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	nežíravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežíravý
fenethylbromid	203-130-8	103-63-9	nežíravý
tetrachlorethen	204-825-9	27-18-4	nežíravý
kyselina isostearová	250-178-0	30399-84-9	nežíravá
4-(methylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežíravý

Většina z uvedených látek je převzata ze seznamu látek vybraných pro mezinárodní validační studii ECVAM (4). Jejich výběr je založen na těchto kritériích:

- i) stejný počet leptavých (žíravých) a neleptavých (nežíravých) látek,

▼ B

- ii) komerčně dostupné látky pokrývající většinu relevantních tříd chemických látek,

- iii) zahrnutí silně leptavých (žíravých) látek i méně leptavých (žíravých) látek s cílem umožnit rozlišování založené na schopnosti leptat,

- iv) volba chemických látek, s nimiž lze manipulovat v laboratoři bez jiných vážných nebezpečí, než je žíravost.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušený materiál je aplikován až 24 hodin na epidermální stranu terčíků kůže ve dvoukomorovém zkušebním systému, ve kterém terčíky kůže oddělují obě komory. Terčíky kůže jsou odebrány z humánně usmrcených potkanů starých 28–30 dní. Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit ztrátu normální integrity a bariérové funkce rohovité vrstvy (*stratum corneum*), která je měřena jako snížení vlastního TER pod určitou prahovou úroveň (12). Pro potkany byla vybrána jako hraniční hodnota TER 5 k Ω a to na základě rozsáhlých údajů pro široké spektrum chemických látek, pro něž hodnota TER v převážné většině případů byla buď značně nad (často > 10 k Ω), nebo značně pod (často < 3 k Ω) touto hraniční hodnotou (12). Všeobecně platí, že materiály, které nejsou žíravé pro zvířata, ale jsou dráždivé nebo nedráždivé, nesnižují TER pod tuto hraniční hodnotu. Použití jiných kožních přípravků nebo jiného přístroje si může vynutit změnu volby hraniční hodnoty a její další validaci.

Do zkušebního postupu je pro potvrzující zkoušku pozitivních výsledků včetně hodnot TER okolo 5 k Ω zařazen stupeň pro stanovení vázání barviva. Tento stupeň pro stanovení vázání barviva určuje, zda zvýšení permeability iontů je důsledkem fyzikálního porušení rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Ukázalo se, že metoda TER s využitím kůže potkana umožňuje předvídat výsledky zjišťování leptavých účinků *in vivo* s králíky podle zkušební metody B.4 (2). Mělo by být uvedeno, že zkoušky *in vivo* na králících jsou vysoce konzervativní vzhledem k leptavým a dráždivým účinkům na kůži v porovnání se zkouškou na lidské kůži pomocí náplastí (15).

1.5 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1 Zvířata

Vybraným druhem zvířat jsou potkani, protože citlivost jejich kůže k chemickým látkám v této zkoušce již byla prokázána (10). Stáří (v době odběru kůže) a kmen potkanů je zvláště důležitý pro zajištění toho, aby folikuly chlupů byly v latentní fázi, před začátkem růstu zralé srsti.

▼B

Hřbetní a boční srst mladých, přibližně 22denních samců nebo samic potkanů (z kmene příbuzného Wistaru nebo srovnatelného kmene) se opatrně odstraní holicím strojkem. Zvířata se poté umyjí opatrným otíráním, přičemž se oholená oblast ponoří do roztoku antibiotik (obsahujícího např. streptomycin, penicilin, chloramfenikol a amfotericin o koncentracích zastavujících růst bakterií). Zvířata se třetí nebo čtvrtý den po prvním omytí znovu omyjí roztokem antibiotik a použijí se do 3 dnů po druhém omytí, kdy se jejich *stratum corneum* po odstranění srsti zregeneruje.

1.5.2 Příprava terčků kůže

Zvířata se humánně usmrtí ve stáří 28–30 dní; toto stáří je kritické. Z každého zvířete se poté odstraní hřbetní a boční kůže a nadbytečný tuk se z kůže opatrně seškrábne. Odeberou se terčiky kůže o průměru přibližně 20 mm. Kůže může být před použitím terčků uchovávána, je-li prokázáno, že pozitivní a negativní kontrolní údaje jsou ekvivalentní údajům získaným s kůží čerstvou.

Každý terčík kůže se přeloží přes jeden z konců teflonové (PTFE) trubičky tak, aby epidermis byla v kontaktu s trubičkou. Přes konec trubičky se těsně přetáhne pryžový O-kroužek, aby byla kůže upevněna, a přebytek tkáně se ořízne. Rozměry trubičky a O-kroužku jsou uvedeny na obrázku 2. Pryžový O-kroužek na teflonové trubičce se poté pečlivě utěsní ke konci teflonové trubičky vrstvou vazelíny. Trubička držaná pomocí pružinové svorky se umístí do receptorové komory obsahující roztok síranu hořečnatého (154 mM) (obrázek 1). Terčík kůže musí být úplně ponořen do roztoku $MgSO_4$. Z jedné kůže potkana může být získáno 10 až 15 terčků kůže.

Pro každou zvířecí kůži je před započítáním zkoušky změřen elektrický odpor dvou terčků kůže jako postup kontroly jakosti. Pro oba terčiky by měla být naměřena hodnota odporu větší než 10 k Ω , mají-li být pro tuto zkoušku použity ostatní terčiky. Pokud je hodnota odporu nižší než 10 k Ω , musí být ostatní terčiky z dotyčné kůže ze zkoušek vyřazeny.

1.5.3 Aplikace zkoušených a kontrolních látek

Pro každou studii by měly být provedeny souběžné pozitivní a negativní kontroly k zajištění dostatečné účinnosti daného experimentálního modelu. Měly by k tomu být použity terčiky kůže z téhož zvířete. Navrženými látkami pro pozitivní kontrolu je 10 M kyselina chlorovodíková a pro negativní kontrolu destilovaná voda.

Kapalná zkoušená látka (150 μ L) se aplikuje stejnoměrně na epidermis uvnitř trubičky. Při zkoušení pevných materiálů se použije dostatečné množství tak, aby byla rovnoměrně pokryta celá epidermis. Poté se na povrch pevné látky přidá deionizovaná voda (150 μ L) a trubička se lehce protřepe. K zajištění maximálního styku látky s kůží může být nutné zahřát pevnou látku až na 30 °C, aby se zkoušená látka roztavila či změkla, nebo ji rozemlít na zrnitý materiál či prášek.

▼ B

Pro každou zkoušenou a kontrolní látku se použijí tři terčíky kůže. Zkoušená látka se aplikuje po dobu 24 hodin při 20–23 °C. Zkoušená látka se zcela odstraní proudem tekoucí vody o teplotě nejvýše 30 °C.

1.5.4 Měření TER

Impedance kůže se měří jako TER. TER se měří nízkonapěťovým impedančním Wheatstoneovým můstkem pro střídavý proud (13). Všeobecné specifikace můstku: provozní napětí 1 až 3 V, sinusový nebo pravoúhlý tvar kmitů střídavého proudu frekvence 50–1 000 Hz a rozsah měření nejméně 0,1–30 k Ω . Můstek použitý ve validační studii měří indukanci, kapacitanci a odpor až do hodnot 2 000 H, 2 000 μ F, a 2 M Ω , při frekvencích 100 Hz nebo 1 kHz, za použití sériových nebo paralelních hodnot. Pro účely měření TER v rámci zkoušky leptavých účinků se zaznamenávají hodnoty odporu při frekvenci 100 Hz a za použití sériových hodnot. Před měřením elektrického odporu se povrchové napětí kůže sníží přidáním dostatečného objemu 70 % ethanolu tak, aby byla epidermis zakryta. Po několika sekundách se ethanol z trubice vylije a tkáň se zvlhčí přidáním 3 ml roztoku síranu hořečnatého (154 mM). Elektrody můstku se umístí na obě strany terčíku kůže za účelem odečtu odporu v k Ω /terčík kůže (obrázek 1). Rozměry elektrod a délky exponovaných částí elektrod pod krokosvorkou jsou uvedeny na obrázku 2. Svorka vnitřní elektrody je během měření odporu opřena o horní konec teflonové trubičky, aby bylo zajištěno, že se délka části elektrody ponořené v roztoku síranu hořečnatého nemění. Vnější elektroda je umístěna uvnitř receptorové komory tak, aby spočívala na dně komory. Vzdálenost mezi pružinovou svorkou a dnem teflonové trubičky se udržuje konstantní (obrázek 2), neboť tato vzdálenost má vliv na naměřené hodnoty odporu. Proto by vzdálenost mezi vnitřní elektrodou a terčíkem kůže měla být konstantní a minimální (1–2 mm).

Je-li naměřená hodnota vyšší než 20 k Ω , může to být způsobeno zbytky vrstvy zkoušené látky na epidermální straně terčíku kůže. O odstranění této vrstvy se lze pokusit např. tím, že se teflonová trubička zakryje palcem v rukavici a 10 sekund se protřepává. Roztok síranu hořečnatého se odstraní a měření se opakuje s čerstvým síranem hořečnatým.

Vlastnosti a rozměry zkušebního přístroje a použitý experimentální postup mohou ovlivnit naměřené hodnoty TER. Prahová hodnota 5 k Ω pro leptavé účinky byla odvozena na základě údajů zjištěných se specifickým přístrojem a postupem popsány v této metodě. Pokud se změní podmínky zkoušky nebo je použit jiný přístroj, mohou platit jiné prahové a kontrolní hodnoty. Proto je nutné kalibrovat metodu a prahové hodnoty odporu zkoušením řady referenčních standardních materiálů vybraných z chemických látek použitých ve validační studii (4, 5), nebo z tříd chemických látek podobných zkoušeným látkám. Soubor vhodných referenčních chemických látek je uveden v tabulce 1.

▼ B**1.5.5 Metody stanovení vázání barviva**

Expozice kůže některým nežiravým materiálům může snížit odpor pod hraniční hodnotu 5 k Ω , v důsledku čehož je umožněn průnik iontů přes *stratum corneum* a snižuje se elektrický odpor (5). Např. neutrální organické látky a povrchově aktivní chemické látky (včetně detergentů, emulgátorů a jiných povrchově aktivních látek) mohou vést k odstranění kožních lipidů, čímž se bariéra stane pro ionty průchodnější. Proto pokud jsou při absenci zjevného poškození hodnoty TER zkoušených látek okolo 5 k Ω nebo jsou nižší než 5 k Ω , mělo by být provedeno posouzení průniku barviva na kontrolních a upravených tkáních ke zjištění, zda jsou naměřené hodnoty TER výsledkem zvýšené permeability kůže, nebo poleptání kůže (3, 5). V případě poleptání kůže, kdy *stratum corneum* je porušeno, barvivo sulforhodamin B při aplikaci na kůži rychle proniká a zbarvuje podložní tkáň. Toto konkrétní barvivo je stabilní v prostředí širokého rozsahu chemických látek a nemá na něj vliv níže popsany extrakční postup.

1.5.5.1 Aplikace a odstranění barviva sulforhodaminu B

Po měření TER se roztok síranu hořečnatého vylije z trubičky a kůže se pečlivě přezkoumá, zda není zjevně poškozena. Pokud zjevné velké poškození není patrné, aplikuje se na epidermální stranu každého terčíku kůže po dobu 2 hodin 150 μ L 10 % roztoku (m/V) barviva sulforhodaminu B (Acid Red 52; C.I. 45100; č. EINECS 222-529-8; č. CAS 3520-42-1) v destilované vodě. Terčíky kůže se poté přibližně 10 sekund omývají tekoucí vodou o nejvýše pokojové teplotě, aby se odstranilo veškeré volné barvivo. Všechny terčíky kůže se opatrně sejmou z teflonové trubičky a umístí se do lahvičky (např. 20mililitrové skleněné lahvičky pro scintilační spektrometrii) obsahující deionizovanou vodu (8 ml). Lahvičky se lehce 5 minut protřepávají, aby se odstranilo další volné barvivo. Tato metoda oplachování se poté zopakuje a pak se terčíky kůže vyjmou a vloží do lahviček obsahujících 5 ml 30 % roztoku (m/V) natrium-dodecyl-sulfátu (SDS) v destilované vodě a inkubují se přes noc při 60 °C.

Po inkubaci se všechny terčíky kůže vyjmou a zlikvidují a zbylý roztok se odstředí 8 minut při 21 °C (při relativní odstředivé síle $\sim 175 \times g$). 1 ml vzorku supernatantu se poté zředí 4 ml 30 % (m/V) roztoku SDS v destilované vodě. Absorbance (A) roztoku se měří přibližně při 565 nm.

1.5.5.2 Výpočet obsahu barviva

Obsah barviva sulforhodaminu B na terčík kůže se vypočte z hodnot absorbance A (5) (molární absorpční koeficient sulforhodaminu B při 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekulová hmotnost = 580). Obsah barviva sulforhodaminu B se vypočte pro každý terčík kůže využitím vhodné kalibrační křivky a poté se vypočte jeho střední hodnota.

2. ÚDAJE

Hodnoty odporu (k Ω) a případně hodnoty středního obsahu barviva (μ g/terčík) pro zkoušený materiál a také pro pozitivní a negativní kontroly by měly být uvedeny ve formě tabulky (údaje z jednotlivých pokusů a jejich střední hodnoty spolu s jejich \pm směrodatnou odchylkou), včetně údajů o duplicitních nebo opakovaných experimentech, a jejich jednotlivé a střední hodnoty.

▼B

2.1 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Střední hodnoty výsledků TER jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní pozitivní a negativní kontroly spadají do přijatelného rozmezí dané metody v dotyčné zkušební laboratoři. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou přijatelné hodnoty rozmezí odporu uvedeny v následující tabulce:

Kontrola	Látka	Rozmezí odporu (k Ω)
pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	0,5–1,0
negativní	destilovaná voda	10–25

Střední hodnoty výsledků vázání barviva jsou přijatelné, pokud hodnoty pro paralelní kontroly spadají do přijatelného rozmezí metody. Pro popsanou metodiku a přístroje jsou pro uvedení

kontrolní látky doporučeny tyto přijatelné hodnoty rozmezí obsahu barviva:

Kontrola	Látka	Rozmezí obsahu barviva (μg /terčík kůže)
pozitivní	10M kyselina chlorovodíková	40–100
negativní	destilovaná voda	15–35

Zkoušená látka je pokládána za neleptající kůži (nežiravou):

- i) je-li střední hodnota TER změřená pro dotyčnou zkoušenou látku větší než 5 k Ω , nebo
- ii) je-li střední hodnota TER menší nebo rovna 5 k Ω a
 - terčík kůže nevykazuje žádné zjevné poškození a
 - střední obsah barviva v terčíku kůže je podstatně nižší než střední obsah barviva v terčíku kůže získaný souběžně při použití 10M HCl jako pozitivní kontroly.

Zkoušená látka je pokládána za leptající kůži (žiravou):

- i) je-li střední hodnota TER menší nebo rovna 5 k Ω a terčík kůže je zjevně poškozen, nebo
- ii) je-li střední hodnota TER menší nebo rovna 5 k Ω a
 - terčík kůže není zjevně poškozen, ale
 - střední obsah barviva v terčíku kůže je větší nebo roven střednímu obsahu barviva v terčíku kůže získanému souběžně při použití 10M HCl jakožto pozitivní kontroly.

▼ B**3. ZPRÁVY****3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušené a kontrolní látky:

- chemický název (názvy), např. název podle IUPAC nebo CAS a číslo CAS, je-li známo,
- čistota a složení látky nebo přípravku (v hmotnostních procentech) a fyzikální vlastnosti,
- fyzikálně-chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, pH, stabilita, rozpustnost ve vodě, které jsou relevantní pro provedení studie,
- případná úprava zkoušených/kontrolních látek před zkouškou (např. zahřátí, rozemletí),
- stabilita, je-li známa.

Pokusná zvířata:

- použitý kmen a pohlaví,
- stáří zvířat použitých jako dárcovská zvířata,
- zdroj, podmínky přechovávání, výživa atd.,
- podrobnosti přípravy kůže.

Zkušební podmínky:

- kalibrační křivky zkušebního přístroje,
- kalibrační křivky pro zkoušku účinnosti vázání barviva,
- podrobnosti zkušebního postupu pro měření TER,
- případně podrobnosti zkušebního postupu pro stanovení vázání barviva,
- popis případných modifikací zkušebních postupů,
- popis použitých kritérií vyhodnocení.

Výsledky:

- údaje změřených hodnot TER a případně obsahu vázaného barviva pro jednotlivá zvířata a jednotlivé vzorky kůže, zpracované ve formě tabulky,
- popis jakýchkoli pozorovaných účinků.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

- 1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).

▼ B

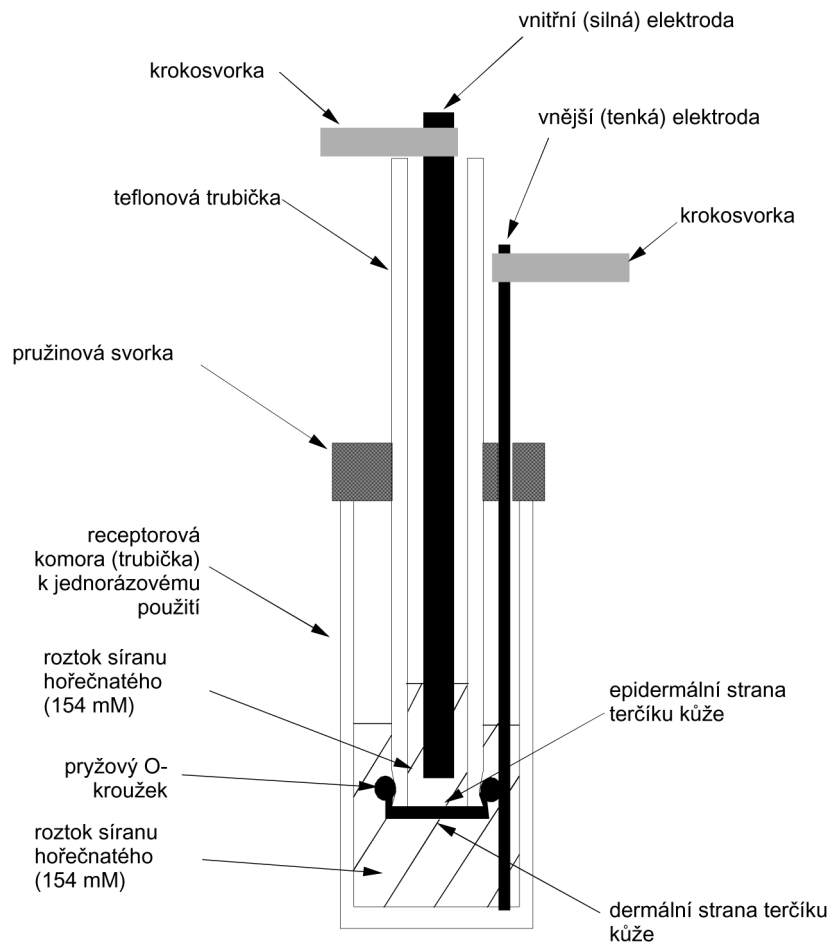
- 2) Zkušební metoda B.4 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na kůži.
- 3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219–255.
- 4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471–482.
- 5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483–524.
- 6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
- 7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129–147.
- 8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>.
- 9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275–280.
- 10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.
- 11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st -2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
- 12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507–512.

▼B

- 13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an inter-laboratory trial. *Toxic. in Vitro* 6, 191–194.
- 14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26: 709–720.
- 15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. *Fd. Chem. Toxicol.* 35, 845–852.
- 16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. *Toxic. in Vitro.* 2, 7–17.

▼ **B**

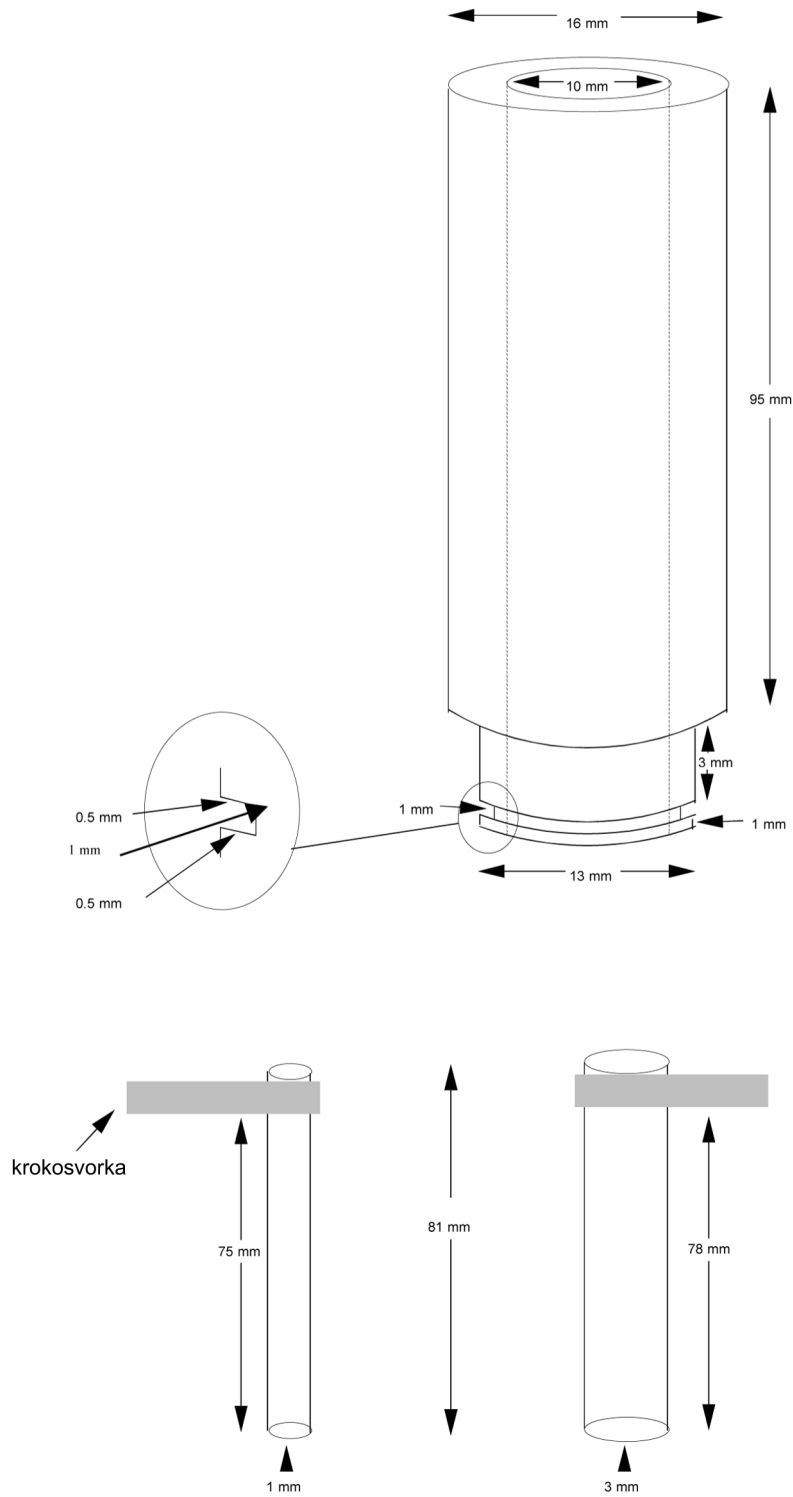
Obrázek 1

Přístroj pro zkoušku TER na kůži potkana

▼B

Obrázek 2

Rozměry teflonové a receptorové trubičky a použitých elektrod



▼B**Kritické faktory přístroje uvedeného výše:**

- vnitřní průměr teflonové trubičky,
- taková délka elektrod vzhledem k teflonové trubičce a receptorové trubičce, aby se elektrody nedotýkaly terčíku kůže a aby standardní délka elektrody byla ve styku s roztokem MgSO_4 ,
- objem roztoku MgSO_4 v receptorové trubičce musí vzhledem k hladině v teflonové trubičce dávat takovou výšku kapaliny, jak je znázorněno na obrázku 1,
- terčík kůže musí být k teflonové trubičce připevněn tak, aby elektrický odpor představoval skutečnou míru vlastností kůže.

▼ B**B.40a LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA POMOCÍ MODELU LIDSKÉ KŮŽE****1. METODA**

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 431 (2004).

1.1 ÚVOD

Poleptáním kůže se rozumí nevratné poškození tkáně kůže po aplikaci zkoušeného materiálu (definované globálně harmonizovaným systémem klasifikace a označování látek a přípravků (GHS)) (1). Tato zkušební metoda nevyžaduje použití živých zvířat ani zvířecí tkáně pro stanovení leptavých účinků na kůži.

Posuzování leptavých účinků na kůži bylo obvykle prováděno na pokusných zvířatech (2). Snaha o omezení bolesti a utrpení pokusných zvířat spojené s tímto postupem vedla k takové revizi zkušební metody B.4, která umožňuje stanovit poleptání kůže alternativními metodami *in vitro*, vylučujícími bolest a utrpení zvířat.

Prvním krokem k definování alternativních zkoušek, které by umožňovaly zkoušet leptavé účinky na kůži pro účely regulace, bylo provedení předvalidačních studií (3). Poté byla provedena řádná validační studie metod *in vitro* (6, 7, 8) pro posuzování leptavých účinků na kůži (4, 5). Závěr z těchto studií a z dalších publikací (9) vedl k doporučení, že pro posouzení leptavých účinků na kůži *in vivo* by mohly být použity tyto zkoušky (9, 10, 11, 12, 13): zkouška pomocí modelu lidské kůže (tato metoda) a zkouška transkutánního elektrického odporu (viz zkušební metoda B.40).

Validační studie uvádějí, že zkoušky s využitím modelů lidské kůže (3, 4, 5, 9) již umožňují spolehlivě rozlišovat mezi známými látkami kůži leptajícími (žiravými) a neleptajícími (nežiravými). Zkušební postup může rovněž umožnit rozlišení mezi látkami způsobujícími vážné a méně vážné poleptání kůže.

Zkouška popsaná v této metodě umožňuje identifikovat leptavé (žiravé) chemické látky a směsi. Dále umožňuje identifikaci neleptavých (nežiravých) látek a směsí, pokud je doložena důkazními stanověními založenými na dalších dostupných údajích (např. pH, vztahy mezi strukturou a aktivitou, údaje o vlivu na lidi nebo na zvířata) (1, 2, 13, 14). Zkouška obvykle neskýtá odpovídající údaje o dráždivých účincích na kůži ani neumožňuje rozčleňovat žiravé látky na podskupiny, jak to umožňuje globálně harmonizovaný systém klasifikace (GHS) (1).

Úplné vyhodnocení lokálních účinků na kůži po jednotlivých kožních expozicích se doporučuje provádět strategií postupného zkoušení, jak je uvedeno ve zkušební metodě B.4 (2) a jak je stanoveno globálně harmonizovaným systémem (GHS) (1). Tato strategie zkoušení zahrnuje provádění zkoušek leptavých účinků na kůži *in vitro* (jak je uvedeno v této metodě) a dráždivých účinků na kůži před uvážením zkoušek na živých zvířatech.

▼B

1.2 DEFINICE

Leptavé účinky na kůži *in vivo*: vyvolání nevratného poškození kůže, zejména viditelné, do koria zasahující nekrózy pokožky, do čtyř hodin po aplikaci zkoušené látky. Reakce po poleptání se projevují vředy, krvácením, krvavými strupy a v závěru čtrnáctidenního pozorování ztrátou barvy v důsledku vyblednutí kůže, úplnými ložisky alopecie a jizvami. K vyhodnocení sporných lézí by se měla uvážit histopatologie.

Životaschopnost buněk: parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace (např. schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenas redukovat vitální barvivo MMT) a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo životaschopností buněk.

1.3 REFERENČNÍ LÁTKY

Tabulka 1

Referenční chemické látky

Název	Č. EINECS	Č. CAS	
propan-1,2-diamin	201-155-9	78-90-0	silně žíravý
kyselina akrylová (kyselina prop-2-enová)	201-177-9	79-10-7	silně žíravá
2-terc-butylfenol	201-807-2	88-18-6	žíravý
hydroxid draselný (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žíravý
kyselina sírová (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žíravý
kyselina oktanová (kyselina kaprylová)	204-677-5	124-07-02	žíravá
4-amino-1H-1,2,4-triazol	209-533-5	584-13-4	nežíravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežíravý
fenethylbromid	203-130-8	103-63-9	nežíravý
tetrachlorethen	204-825-9	27-18-4	nežíravý
kyselina isostearová	250-178-0	30399-84-9	nežíravá
4-(methylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežíravý

Většina z uvedených látek je převzata ze seznamu látek vybraných pro mezinárodní validační studii ECVAM (4). Jejich výběr je založen na těchto kritériích:

- i) stejný počet leptavých (žíravých) a neleptavých (nežíravých) látek,
- ii) komerčně dostupné látky pokrývající většinu relevantních tříd chemických látek,
- iii) zahrnutí silně leptavých (žíravých) látek i méně leptavých (žíravých) látek s cílem umožnit rozlišování založené na schopnosti leptat,

▼ B

- iv) volba chemických látek, s nimiž lze manipulovat v laboratoři bez jiných vážných nebezpečí, než je žíravost.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušený materiál je aplikován na trojrozměrný model lidské kůže sestávající se přinejmenším z rekonstruované epidermis a funkční rohovité vrstvy (*stratum corneum*). Materiály s leptavými účinky jsou identifikovány schopností způsobit při specifikované expoziční době pokles životaschopnosti buněk (stanovený např. použitím zkoušky redukce MTT) pod definovanou prahovou úroveň. Podstata stanovení pomocí modelu lidské kůže je založena na hypotéze, že chemické látky s leptavými účinky jsou ty, jež jsou schopny proniknout rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) difúzí nebo erozí a jsou cytotoxické pro buňky v hlubších buněčných vrstvách.

1.4.1 Postup

1.4.1.1 Modely lidské kůže

Modely lidské kůže lze vyrobit nebo získat komerčně (např. modely EpiDerm™ a EPISKIN™) (16, 17, 18, 19) nebo je lze připravit či vyrobit ve zkušební laboratoři (20, 21). Uznává se, že využití lidské kůže podléhá vnitrostátním a mezinárodním etickým ohledům a podmínkám. Jakýkoli nový model by měl být validován (přinejmenším v rozsahu uvedeném v bodu 1.4.1.1.2). Modely lidské kůže použité pro tuto zkoušku musí splňovat následující podmínky:

1.4.1.1.1 Všeobecné podmínky modelu

K sestavení epitelu se musí použít lidské keratinocyty. Pod funkční rohovitou vrstvou (*stratum corneum*) musí být více vrstev životaschopných epitelových buněk. Model kůže může mít také jako složku stromální vrstvu. *Stratum corneum* musí být vícevrstvé s nezbytným profilem lipidů, umožňující funkci robustní překážky odolávající rychlému pronikání cytotoxických značkovacích látek. Izolační vlastnosti modelu musí předcházet pronikání materiálů okolo *stratum corneum* do životaschopných tkání. Proniknutí zkoušených chemických látek okolo *stratum corneum* by vedlo k chybnému modelování expozice kůže. Model kůže nesmí být kontaminován bakteriálně (mj. mykoplazmaty) ani houbami a plísněmi.

1.4.1.1.2 Podmínky funkčního modelu

Rozsah životaschopnosti je obvykle kvantifikován pomocí MTT nebo jiných metabolicky přeměněných vitálních barviv. V těchto případech by absorbance (A) extrahovaného (solubilizovaného) barviva negativní kontrolní tkáň měla být nejméně 20násobně vyšší než absorbance extrakčního rozpouštědla samotného (22). Negativní kontrolní tkáň musí být stabilní v kultuře (musí vést k podobným výsledkům měření životaschopnosti) po dobu trvání expoziční doby zkoušky. *Stratum corneum* musí být dostatečně odolné, aby odolalo rychlému proniknutí některých cytotoxických značkovacích chemických látek (např. 1 % Triton X-100). Tuto vlastnost lze odhadnout pomocí expoziční doby nutné ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET₅₀) (např. pro modely EpiDerm™ a EPISKIN™ je tato doba > 2 hodiny). Pro tkáň by měla být prokázána reprodukovatelnost v čase a přednostně i mezilaboratorně. Kromě toho musí umožnit predikci leptavých účinků referenčních chemických látek (viz tabulka 1), pokud je vybrána ve zvoleném zkušebním postupu.

▼B1.4.1.2 *Aplikace zkoušených a kontrolních látek*

Pro každý experiment (expoziční dobu), včetně kontrolních, se použijí dvě repliky tkáně. U kapalných materiálů musí být aplikováno dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokrylo povrch kůže: musí být použito nejméně 25 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$. U pevných materiálů musí být aplikováno dostatečné množství zkoušené látky, aby rovnoměrně pokrylo kůži, a zkoušená látka by měla být ovlhčena deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby byl zajištěn dobrý styk s kůží; pevné látky by měly být podle potřeby před aplikací rozemlety na prášek. Aplikační metoda musí být pro zkoušenou látku vhodná (5). Po uplynutí expoziční doby musí být zkoušený materiál z povrchu kůže pečlivě spláchnut vhodným pufrem, nebo 0,9 % roztokem NaCl.

Pro každou studii by měly být provedeny souběžné pozitivní a negativní kontroly k zajištění dostatečné účinnosti daného experimentálního modelu. Navrženými látkami pro pozitivní kontrolu jsou ledová kyselina octová nebo 8N KOH. Navrženými látkami pro negativní kontrolu jsou 0,9 % roztok NaCl nebo voda.

1.4.1.3 *Měření životaschopnosti buněk*

K měření životaschopnosti buněk lze používat pouze validované kvantitativní metody. Míra životaschopnosti musí být slučitelná s využíváním v třírozměrném modelu tkáně. Nespecifické vázání barviva nesmí rušit měření životaschopnosti. Proto nejsou vhodná barviva vážící proteiny a barviva nepodléhající metabolické konverzi (např. neutrální červeně). Nejčastěji se používá stanovení redukce MTT (2-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid, thiazolylová modř: č. EINECS 206-069-5, č. CAS 298-93-1), pro niž bylo prokázáno, že poskytuje správné a reprodukovatelné výsledky (5), ale lze používat i jiné. Vzorek kůže se umístí do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3 až 1,0 mg/ml) při vhodné inkubační teplotě na dobu 3 hodin. Vzniklá sraženina modrého formazanu se poté extrahuje rozpouštědlem (isopropylalkoholem) a koncentrace formazanu se stanoví měřením absorbance A při vlnové délce 545 až 595 nm.

Chemický účinek zkoušeného materiálu na vitální barvivo může imitovat účinek buněčného metabolismu, čímž může dojít k nesprávnému odhadu životaschopnosti. Bylo pozorováno, že k tomu dochází, nebyl-li zkoušený materiál z kůže úplně odstraněn oplachováním (9). Jestliže zkoušený materiál působí přímo na vitální barvivo, musí být dodatečně zkontrolováno, zda zkoušené látky neruší stanovení životaschopnosti, a případně výsledky korigovat (9, 23).

2. **ÚDAJE**

Hodnoty absorbance A pro každou tkáň a vypočtené hodnoty životaschopnosti buněk v procentech pro zkoušený materiál a pro pozitivní a negativní kontroly by měly být uvedeny ve formě tabulky, včetně údajů o duplicitních nebo opakovaných experimentech, středních a jednotlivých hodnot.

▼ B

2.1 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Hodnoty absorpance A dosažené pro každý zkoušený vzorek lze použít k výpočtu relativní životaschopnosti v procentech vzhledem k negativní kontrole, která je dohodou stanovena na úroveň 100 %. Hraniční procentuální podíl životaschopnosti buněk, kterým se rozlišují žravé zkoušené materiály od nežravých (nebo kterým se rozlišují různé třídy leptavých účinků), nebo statistické postupy použité k vyhodnocení výsledků a k identifikaci žravých materiálů musí být jasně definovány a zdokumentovány, a musí být prokázána jejich vhodnost. Obecně jsou tyto hraniční hodnoty stanoveny během optimalizace zkoušky, testovány během předvalidační fáze a potvrzeny validační studií. Predikce leptavých účinků (žravosti) je ve spojení s modelem EpiDermTM například dána takto (9):

Zkoušená látka je pokládána za leptající kůži (žravou):

- i) jestliže po 3 minutách expozice je životaschopnost nižší než 50 %, nebo
- ii) jestliže po 3 minutách expozice je životaschopnost vyšší nebo rovna 50 % a životaschopnost po 1 hodině expozice je nižší než 15 %.

Zkoušená látka je pokládána za neleptající kůži (nežravou):

- i) jestliže po 3 minutách expozice je životaschopnost vyšší nebo rovna 50 % a životaschopnost po 1 hodině expozice je vyšší nebo rovna 15 %.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace:

Zkoušené a kontrolní látky:

- chemický název (názvy), např. název podle IUPAC nebo CAS a číslo CAS, je-li známo,
- čistota a složení látky nebo přípravku (v hmotnostních procentech),
- fyzikálně-chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, pH, stabilita, rozpustnost ve vodě, které jsou relevantní pro provedení studie,
- případná úprava zkoušených/kontrolních látek před zkouškou (např. zahřátí, rozemletí),
- stabilita, je-li známa.

Zdůvodnění modelu kůže a použitého postupu.

Zkušební podmínky:

- použitý buněčný systém,
- kalibrační údaje pro měřicí zařízení použité pro měření životaschopnosti buněk (např. spektrofotometr),

▼ B

- úplné podkladové údaje pro konkrétní použitý model kůže včetně jeho validity,
- podrobnosti použitého zkušební postupu,
- použité zkušební dávky,
- popis případných modifikací zkušební postupu,
- odkazy na minulé údaje o použitém modelu,
- popis použitých kritérií pro vyhodnocení.

Výsledky:

- údaje z jednotlivých zkoušených vzorků, zpracované ve formě tabulky,
- popis dalších pozorovaných účinků.

Rozbor výsledků.

Závěr.

4. LITERATURA

- 1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. [http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6).
- 2) Zkušební metoda B.4 Akutní toxicita: dráždivé a leptavé účinky na kůži.
- 3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponc, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219–255.
- 4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471–482.
- 5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 12, 483–524.
- 6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62pp.
- 7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129–147.
- 8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. <http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf>.

▼ B

- 9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. *ATLA* 28, s. 371–401.
- 10) ECVAM (1998). *ECVAM News & Views*. *ATLA* 26, 275–280.
- 11) ECVAM (2000). *ECVAM News & Views*. *ATLA* 28, 365–67.
- 12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf.
- 13) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st-2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
- 14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26; 709–720.
- 15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Meth.* 65, 55–63.
- 16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxic. In Vitro* 8, 889–891.
- 17) Ponc, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International Journal of Pharmaceutics*. 203, 211–225.
- 18) Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In *In vitro Skin Toxicology*. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach; 133–140.
- 19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post – transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. *Experimental Cell Research* 193; 310-319.
- 20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. *Cyotechnology* 9, 163–171.
- 21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. *Biotechnology and Bioengineering* 43/8, 747–756.

▼B

- 22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation* 5, 69–84.
- 23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C., Elliot, G.R., Harbell, J. W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J. J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. *Toxic. InVltro* 15, 57–93.

▼B**B.41 ZKOUŠKA FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*****1. METODA**

Tato zkušební metoda je rovnocenná metodě OECD TG 432 (2004).

1.1 ÚVOD

Fototoxicita je definována jako toxická odezva na látku aplikovanou na tělo, která je vyvolána nebo zvýšena (a je zjevná při nižších úrovních dávek) po následné expozici světlu nebo která je vyvolána ozářením kůže po systémovém podání látky.

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* slouží k identifikaci fototoxického potenciálu zkoušené látky, který je vyvolán chemickou látkou excitovanou po expozici světlem. Zkouška vyhodnocuje fotocytotoxicitu z relativního snížení životaschopnosti buněk exponovaných zkoušené chemické látky v přítomnosti světla versus při jeho absenci. Látky identifikované touto zkouškou jsou pravděpodobně fototoxické *in vivo* po systémovém podání a po nanesení na kůži, nebo po nanesení na pokožku.

Fototoxické účinky byly zaznamenány u mnoha typů chemických látek (1, 2, 3, 4). Jejich společným rysem je schopnost absorbovat světelnou energii v oblasti slunečního světla. Podle prvního zákona fotochemie (Grothaus-Draperův zákon) vyžaduje fotoreakce dostatečnou absorpci světelných kvant. Před zvážením biologického zkoušení musí být stanoveno UV/VIS absorpční spektrum zkoušené chemické látky podle Metodiky OECD TG 101. Vychází se z toho, že pokud je molární absorpční koeficient nižší než 10 l/mol/cm dotyčná chemická látka pravděpodobně není fotoreaktivní. Takové látky nemusí být zkouškou fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ani jinými biologickými zkouškami zkoušeny na nepříznivé fotochemické účinky (1, 5). Viz též přílohu 1.

V poslední době byla vyhodnocena spolehlivost a význam zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (6, 7, 8, 9). Bylo prokázáno, že zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* umožňuje předpovídat akutní fototoxické účinky u zvířat a u člověka *in vivo*. Zkouška není určena pro předpověď jiných nepříznivých účinků, které mohou plynout z kombinovaného působení chemické látky a světla, např. neumožňuje zkoumat fotogenotoxicitu, fotoalergii nebo fotokarcinogenitu ani neumožňuje posuzovat fototoxický potenciál. Tato zkouška dále není určena ke zkoumání nepřímých mechanismů fototoxicity ani účinků metabolitů zkoušené látky nebo účinků směsí.

Zatímco použití metabolizujícího systému je obecným požadavkem při všech zkouškách *in vitro* určených pro posouzení genotoxického a karcinogenního potenciálu, ve fototoxikologii je dosud známo pouze málo příkladů, kdy je metabolická transformace nutná pro působení chemické látky jako fototoxinu *in vivo* nebo *in vitro*. Nepovažuje se tedy ani za nezbytné ani za vědecky zdůvodněné, aby byla předložena zkouška provedena se systémem aktivace metabolismu.

▼ B

1.2 DEFINICE

Intenzita ozáření: intenzita ultrafialového (UV) nebo viditelného světla dopadajícího na povrch, měřená ve W/m^2 nebo mW/cm^2 .

Dávka světelného záření: množství (intenzita \times čas) ultrafialového (UV) nebo viditelného záření dopadajícího na povrch, vyjádřená v joulech ($W \times s$) na plochu povrchu, např. J/m^2 nebo J/cm^2 .

Vlnová pásma UV světla: označení doporučená komisí CIE (Mezinárodní komise pro osvětlení): UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) a UVC (100–280 nm). Používají se rovněž jiná označení; jako hranice mezi UVB a UVA je často používána hodnota 320 nm a pásmo UVA může být rozděleno na UV-A1 a UV-A2 s hranicí kolem 340 nm.

Životaschopnost buněk: parametr, kterým se měří celková aktivita buněčné populace (např. příjem vitálního barviva neutrální červeně do buněčných lysosomů) a který v závislosti na měřeném jevu a na použitém uspořádání zkoušky koreluje s celkovým počtem a/nebo životaschopností buněk.

Relativní životaschopnost buněk: životaschopnost v poměru ke kontrolám s rozpouštědlem (negativní kontroly), které prošly celým postupem zkoušky (s ozářením i bez něj), ale nebyly exponovány zkoušeným chemickým látkám.

PIF (Photo-Irritation-Factor – fotoiritační faktor): faktor získaný srovnáním dvou stejně účinných cytotoxických koncentrací (IC_{50}) zkoušené látky, a to při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem a bez ozáření.

IC_{50} : koncentrace zkoušené látky, při níž se životaschopnost buněk sníží o 50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect – střední světelný účinek): veličina odvozená z matematické analýzy průběhu křivek závislosti účinku na koncentraci získaných při necytotoxickém ozáření UVA/VIS světlem v přítomnosti ozáření a bez něho.

Fototoxicita: akutní toxická reakce vyvolaná po první expozici kůže určitým chemickým látkám a následné expozici světlu nebo podobně vyvolaná ozářením kůže po systémovém podání chemické látky.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je založena na srovnání cytotoxicity chemické látky při zkoušení s expozicí necytotoxické dávce simulovaného slunečního světla a bez této expozice. Cytotoxicita je v této zkoušce vyjádřena jako koncentračně závislé snížení příjmu vitálního barviva neutrální červeně (NR) 24 hodin po působení zkoušené chemické látky a ozáření (10). NR je slabé kationické barvivo, které nedífusně snadno proniká buněčnými membránami a akumuluje se mezibuněčně v lysosomech. Změny povrchu citlivých lysosomálních membrán způsobují ztrátu pevnosti lysosomů a další změny, které se postupně stávají nevratnými. Tyto změny vyvolané působením xenobiotik vedou ke snížení příjmu a vázání neutrální červeně. Je proto možné rozlišovat mezi životaschopnými, poškozenými nebo mrtvými buňkami, což je základem této zkoušky.

▼ B

Buňky Balb/c 3T3 se 24 hodin kultivují, aby vytvořily monovrstvu. Dvě 96jamkové destičky na jednu zkoušenou chemickou látku se poté 1 hodinu preinkubují osmi různými koncentracemi zkoušených chemických látek. Poté je jedna ze dvou destiček exponována nejvyšší necytotoxickou dávkou ozáření, zatímco druhá destička se udržuje v temnu. U obou destiček se poté expoziční médium nahradí kultivačním médiem a po dalších 24 hodinách inkubace je životaschopnost buněk stanovena pomocí příjmu neutrální červeně (NRU). Životaschopnost buněk je vyjádřena v procentech vzhledem k neexponované kontrole s rozpouštědlem a vypočte se pro každou zkušební koncentraci. Pro předpověď fototoxického potenciálu se porovnají koncentračně závislé odezvy získané při ozáření a bez ozáření, obvykle při hodnotě IC_{50} , tj. při koncentraci způsobující 50 % úbytek životaschopnosti buněk ve srovnání s neexponovanými kontrolami.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Příprava

1.4.1.1 *Buňky*

Při validační studii byla použita permanentní myší linie buněk fibroplastů – Balb/c 3T3, klon 31 – buď z banky ATCC (American Type Culture Collection) v Manassasu ve Virginii (USA) nebo z banky ECACC (European Collection of Cell Cultures) v Salisbury v hrabství Wiltshire (Spojené království), a je tudíž doporučeno získat buňky z dobře kvalifikovaných zdrojů buněk. Jiné buňky nebo buněčné linie mohou být při stejném zkušebním postupu použity za předpokladu, že jsou kultivační podmínky přizpůsobeny specifickým potřebám buněk, ale musí být prokázána jejich rovnocennost.

Buňky by měly být pravidelně kontrolovány, zda nejsou kontaminovány mykoplazmaty, a měly by být použity, pouze pokud kontaminovány nejsou (11).

Je důležité, aby byla citlivost buněk na UV pravidelně kontrolována postupem kontroly jakosti popsaným v této metodě. Vzhledem k tomu, že citlivost buněk na UVA může růst s počtem pasáží, měly by být použity buňky Balb/c 3T3 z pasáže s nejnižším dosažitelným počtem pasáží, nejlépe z nižší než sté pasáže (viz bod 1.4.2.2.2 a příloha 2).

1.4.1.2 *Média a kultivační podmínky*

Pro rutinní buněčné pasážování a během zkušebního postupu by měla být použita vhodná kultivační média a inkubační podmínky, např. u buněk Balb/c 3T3 se jedná o DMEM (Dulbeccoova modifikace Eagleova média) obohacenou 10 % novorozeneckým telecím sérem, 4mM glutaminem, penicilinem (100 IU) a streptomycinem (100 µg/ml) a o inkubaci ve vlhčené atmosféře při 37 °C, 5–7,5 % CO₂ v závislosti na použitém pufu (viz druhý odstavce bod 1.4.1.4). Zvlášť důležité je, aby kultivační podmínky zajistily, aby byl buněčný cyklus uvnitř dosavadního rozpětí pro použité buňky nebo buněčné linie.

1.4.1.3 *Příprava kultur*

Buňky ze zmrazených kmenových kultur se nasadí do kultivačního média ve vhodné hustotě a alespoň jednou se pasážují před použitím ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

▼ B

Při zkoušce fototoxicity se buňky nasazují do kultivačního média v takové hustotě, aby nedosáhly konfluence do konce zkoušky, tj. do okamžiku, kdy je po 48 hodin od nasazení stanovována životaschopnost. Pro buňky Balb/c 3T3 kultivované v 96jamkových destičkách je doporučeno inokulum 1×10^4 buněk na jamku.

Pro každou chemickou látku se buňky nasadí stejným způsobem do dvou oddělených 96jamkových destiček, které jsou poté souběžně podrobeny celému postupu zkoušky za stejných podmínek kromě doby, kdy je jedna z destiček ozářena (+ Irr) a druhá je udržována v temnu (– Irr).

1.4.1.4 *Příprava zkoušené látky*

Zkoušené látky musí být čerstvě připraveny vždy bezprostředně před použitím, pokud údaje neprokáží jejich stabilitu při skladování. Doporučuje se veškeré chemické kroky a počáteční úpravy buněk provádět při světelných podmínkách vylučujících fotoaktivaci nebo degradaci zkoušené látky před ozářením.

Zkoušené chemické látky se rozpustí ve fyziologickém roztoku, např. v Earlově fyziologickém roztoku (EBSS), nebo v jiných fyziologicky vyvážených pufrovaných roztocích, které nesmí obsahovat protei- nové složky a složky absorbující světlo (např. pH indikátory a vitaminy), aby nerušily při ozařování. Protože během ozařování jsou buňky drženy přibližně 50 minut mimo inkubátor s CO₂, je nutno dbát na vyloučení alkalizace. Je-li použit slabý pufr jako např. EBSS, lze toho dosáhnout inkubováním buněk v prostředí se 7,5 % CO₂. Jsou-li buňky inkubovány pouze při 5 % CO₂, je nutno použít silnější pufr.

Zkoušené chemické látky s omezenou rozpustností ve vodě by měly být rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle. Použije-li se rozpouštědlo, musí být přítomné v konstantní koncentraci ve všech kulturách, tj. v negativní (rozpuštědlové) kontrole i ve všech koncentracích zkoušené chemické látky, a nesmí být při této koncentraci cytotoxické. Koncentrace zkoušené chemické látky musí být voleny tak, aby bylo vyloučeno srážení nebo zakalení roztoku.

Doporučenými rozpouštědly jsou dimethylsulfoxid (DMSO) a ethanol (EtOH). Vhodná mohou být i jiná málo cytotoxická rozpouštědla. Před použitím by měly být pro všechna rozpouštědla posouzeny jejich specifické vlastnosti, např. reakce se zkoušenou chemickou látkou, potlačení fototoxických účinků, záchyt radikálů a/nebo chemická stabilita v rozpouštědle.

Rozpouštění může být usnadněno mícháním a/nebo ultrazvukem a/nebo zahřátím na vhodnou teplotu, pokud tím není dotčena stabilita zkoušené chemické látky.

▼B1.4.1.5 *Podmínky ozařování*

1.4.1.5.1 Zdroj světla

Volba vhodného zdroje světla a filtrů je kritickým faktorem zkoušení fototoxicity. Záření v pásmu UVA a ve viditelném pásmu je obvykle spojováno s fototoxickými reakcemi *in vivo* (3, 12), zatímco záření v pásmu UVB je méně relevantní a je vysoce cytotoxické; cytotoxicita vzrůstá mezi 313 nm a 280 nm tisíckrát (13). Kritéria pro volbu vhodného světelného zdroje musí zahrnovat požadavek, aby zdroj světla vyzářoval světlo o vlnových délkách, které zkoušená chemická látka absorbuje (absorpční spektrum), a aby dávka světelného záření (dosažitelná po přijatelnou dobu expozice) byla dostatečná pro detekci známých fotocytotoxických chemických látek. Použité vlnové délky a dávky by dále neměly nadměrně poškozovat zkušební systém, např. emisí tepla (infračervená oblast).

Simulace slunečního světla solárními simulátory se považuje za optimální zdroj umělého světla. Distribuce zářivého výkonu filtrovaného solárního simulátoru by měla být blízká dennímu venkovnímu světlu uvedenému v literatuře (14). V solárních simulátorech se používá jak xenonová výbojka, tak vysokotlaká rtuťová halogenová výbojka (15). Druhá z nich má tu výhodu, že emituje méně tepla a je levnější, avšak sluneční světlo napodobuje méně dokonale než výbojka xenonová. Poněvadž všechny solární simulátory vyzářují významné množství UVB záření, měly by být vhodně filtrovány, aby byly vysoce cytotoxické vlnové délky UVB zeslabeny. Protože plastové materiály pro buněčné kultury obsahují UV stabilizátory, spektrum by mělo být měřeno po průchodu stejným typem víčka 96jamkové destičky, jaké se použije v daném stanovení. Nehledě na opatření přijatá k potlačení částí spektra filtrováním nebo na nevyhnutelné filtrační vlivy zařízení, spektrum zaznamenané za těmito filtry by se nemělo lišit od normalizovaného denního světla ve vnějším prostředí (14). Příklad spektrální distribuce filtrovaného záření solárního simulátoru použitého ve validační studii zkoušky fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je uveden v literatuře (8, 16). Viz též dodatek 2 obrázek 1.

1.4.1.5.2 Dozimetrie

Intenzita světla (intenzita ozáření) se musí pravidelně před každou zkouškou fototoxicity kontrolovat za použití vhodného širokopásmového UV-metru. Intenzita by měla být měřena po průchodu stejným typem víčka 96jamkové destičky, jaké se použije v daném stanovení. UV-metr musí být pro daný zdroj kalibrován. Funkčnost UV-metru by měla být kontrolována a za tímto účelem se doporučuje použít druhý referenční UV-metr stejného typu, stejným způsobem kalibrováný. V ideálním případě by měl být v delších časových odstupech použit k měření spektrální intenzity záření filtrovaného zdroje světla a ke kontrole kalibrace širokopásmového UV-metru spektrometr.

Dávka 5 J/cm² (změřená v pásmu UVA) byla shledána jako necytotoxická pro buňky Balb/c 3T3 a dostatečně silná k excitaci chemických látek pro vyvolání fototoxických reakcí (6, 17), např. pro dosažení 5 J/cm² po dobu 50 minut byla intenzita ozáření nastavena na 1,7 mW/cm². Viz dodatek 2 obrázek 2. Jestliže je použita jiná buněčná linie nebo jiný světelný zdroj, musí být dávka ozáření případně kalibrována, aby mohl být režim dávkování volen tak, aby nepoškozoval buňky a byl dostatečný k excitaci standardních fototoxinů. Doba světelné expozice se vypočte tímto způsobem:

▼ B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dávka ozáření (J/cm}^2\text{)} \times 1\,000}{\text{intenzita ozáření (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Ws})$$

1.4.2 Zkušební podmínky**1.4.2.1 Koncentrace zkoušené látky**

Rozmezí koncentrací chemických látek zkoušených se světlem (+ Irr) a bez světla (– Irr) by měly být náležitě stanoveny v experimentech pro zjištění rozmezí. Může být užitečné zjistit rozpustnost na počátku a po 60 minutách (nebo po době odpovídající době expozice), neboť rozpustnost se může měnit s časem nebo v průběhu expozice. pH buněčných kultur s přídavkem zkoušených látek by měla být v rozmezí 6,5–7,8, aby byla vyloučena toxicita způsobená nevhodnými kultivačními podmínkami nebo vysoce kyselými či zásaditými chemickými látkami.

Nejvyšší koncentrace zkoušené chemické látky by se měla nacházet v mezích fyziologických zkušebních podmínek, např. by měl být vyloučen osmotický stres či stres z pH. V závislosti na zkoušené chemické látce může být nutné brát v úvahu další fyzikálně-chemické vlastnosti jako faktory omezující nejvyšší zkušební koncentraci. U relativně nerozpustných látek, které nejsou toxické až do koncentrace nasycení, by měla být testována nejvyšší dosažitelná koncentrace. Obecně by mělo být vyloučeno srážení zkoušené látky při jakýchkoli zkušebních koncentracích. Maximální koncentrace zkoušené látky by neměla překročit 1 000 µg/ml; osmolarita by neměla překročit 10 mM. Měla by být použita geometrická řada ředění 8 koncentrací zkoušené látky s konstantním faktorem ředění (viz druhý odstavce bodu 2.1).

Pokud existují údaje (z experimentů pro zjištění rozmezí koncentrací) o tom, že zkoušená chemická látka není cytotoxická až do mezní koncentrace určené pro experiment v temnu (– Irr), ale je vysoce cytotoxická po ozáření (+ Irr), rozmezí koncentrací, které má být zvoleno pro experimenty s ozářením (+ Irr), se může lišit od rozmezí zvoleného pro experimenty v temnu (– Irr), má-li být splněn požadavek uspokojivé kvality údajů.

1.4.2.2 Kontroly**1.4.2.2.1 Citlivost buněk na záření, zjištění dosavadních údajů:**

Citlivost buněk na zdroj světla by měla být pravidelně kontrolována (přibližně každá pátá pasáž) posouzením jejich životaschopnosti po expozici rostoucími dávkami ozáření. Při tomto posouzení by mělo být použito několik dávek ozáření, včetně úrovní podstatně vyšších, než jsou úrovně při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU. Tyto dávky se nejnázve kvantifikují měřením UV složek světelného zdroje. Buňky se nasadí při intenzitě použité ke zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* a příští den se ozáří. Životaschopnost buněk se poté stanoví o den později využitím příjmu neutrální červeně. Mělo by být prokázáno, že výsledná nejvyšší necytotoxická dávka (např. dávka ve validační studii 5 J/cm² (UVA)) byla dostatečná ke korektní klasifikaci referenčních chemických látek (tabulka 1).

▼ B

1.4.2.2.2 Citlivost na záření, kontrola současné zkoušky:

Zkouška splňuje kritéria jakosti, pokud ozářené negativní/rozpouštědlové kontroly vykazují životaschopnost více než 80 % v porovnání s neozářenými negativními/rozpouštědlovými kontrolami.

1.4.2.2.3 Životaschopnost rozpouštědlové kontroly

Absolutní absorbance ($A_{540 \text{ NRU}}$) neutrální červeně extrahované z rozpouštědlových kontrol naznačí, zda 1×10^4 buněk nasazených na jednu jamku zachovalo při růstu během dvou dnů zkoušky obvyklou dobu zdvojnásobení (doubling time). Zkouška splňuje kritérium přijatelnosti, jestliže střední hodnota $A_{540 \text{ NRU}}$ neexponovaných kontrol je $\geq 0,4$ (tj. přibližně dvacetinásobek absorbance rozpouštědlového pozadí).

1.4.2.2.4 Pozitivní kontrola

Při každé zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* musí být souběžně zkoušena známá fototoxická chemická látka. Doporučen je chlorpromazin (CPZ). Pro CPZ zkoušený podle standardního postupu při zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* byla definována tato kritéria přijatelnosti zkoušky: CPZ ozářený (+ Irr): $IC_{50} = 0,1$ až $2,0 \mu\text{g/ml}$, pro CPZ neozářený (– Irr): $IC_{50} = 7,0$ až $90,0 \mu\text{g/ml}$. Fotoiritační faktor (PIF) by měl být > 6 . Měla by být sledována předcházející funkčnost této pozitivní kontroly.

Namísto chlorpromazinu mohou být použity jako souběžné pozitivní kontroly jiné fototoxické chemické látky vhodné z hlediska typu nebo rozpustnosti hodnocené chemické látky.

1.4.3 Zkušební postup (6, 7, 8, 16, 17)

1.4.3.1 První den

Do obvodových jamek 96jamkové mikrotitrační destičky pro tkáňové kultury se odpipetuje po $100 \mu\text{l}$ kultivačního média (slepý pokus). Do zbývajících jamek se dává po $100 \mu\text{l}$ buněčné suspenze s 1×10^5 buněk/ml v kultivačním médiu ($= 1 \times 10^4$ buněk na jamku). Pro každou řadu koncentrací jednotlivých zkoušených chemických látek a pro rozpouštědlovou a pro pozitivní kontrolu se připraví dvě destičky.

Buňky se inkubují 24 hodin (viz bod 1.4.1.2), dokud nedosáhnou semikonfluentní monovrstvy. Tato inkubační doba umožní regeneraci buněk, jejich přichycení a exponenciální růst.

1.4.3.2 Druhý den

Po inkubaci se kultivační médium z buněk dekantuje a důkladně promyje $150 \mu\text{l}$ pufovaného roztoku použitého k inkubaci. Přidá se $100 \mu\text{l}$ pufru obsahujícího vhodnou koncentraci zkoušené chemické látky, nebo pouze rozpouštědlo (rozpouštědlová kontrola). Aplikuje se 8 různých koncentrací zkoušené chemické látky. Buňky se zkoušenou chemickou látkou se inkubují v temnu po dobu 60 minut (viz bod 1.4.1.2 a druhý odstavec bodu 1.4.1.4).

Jedna ze dvou destiček připravených pro každou z řady koncentrací zkoušené chemické látky a kontroly se zvolí, obvykle náhodně, pro stanovení cytotoxicity (– Irr) (tj. kontrolní destička) a jedna (tj. expoziční destička) pro stanovení fotocytotoxicity (+ Irr).

▼B

K provedení části zkoušky s ozáření (+ Irr) se buňky při pokojové teplotě po dobu 50 minut ozářují přes víčko 96jamkové destičky nejvyšší dávkou záření, která je necytotoxická (viz též dodatek 2). Neozářené destičky (– Irr) se ponechají 50 minut (= doba expozice světlem) v temnu při pokojové teplotě.

Zkušební roztok se odstraní a každá jamka se promyje dvakrát 150 µl pufovaného roztoku použitého k inkubaci, ale neobsahujícího zkoušený materiál. Pufovaný roztok se poté nahradí kultivačním médiem a inkubuje se (viz bod 1.4.1.2) přes noc (18–22 hodin).

1.4.3.3 *Třetí den*

1.4.3.3.1 Mikroskopické hodnocení

Buňky se prohlédnou pod mikroskopem s fázovým kontrastem vzhledem k jejich růstu, morfologii a neporušenosti monovrstvy. Zaznamenají se změny morfologie buněk a účinky na růst buněk.

1.4.3.3.2 Zkouška příjmu neutrální červeně

Buňky se promyjí 150 µl předehřátého roztoku pufru. Promývací roztok se opatrně odstraní poklepem. Přidá se 100 µl média bez séra (16) s koncentrací 50 µg/ml neutrální červeně (NR) (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin hydrochlorid; N⁸,N⁸,3-trimethylfenazin-2,8-diamin-hydrochlorid; č. EINECS 209-035-8; č. CAS 553-24-2; C.I. 50040) a inkubuje se 3 hodiny dle popisu v bod 1.4.1.2. Po inkubaci se médium NR odstraní a buňky se promyjí 150 µl pufru. Ten se dekantuje a zcela odstraní odsátím nebo odstředěním.

Přidá se přesně 150 µl čerstvě připraveného roztoku (49 dílů vody + 50 dílů ethanolu + 1 díl kyseliny octové) k odstranění NR.

Mikrotitrační destička se jemně 10 minut třepe na třepačce, dokud se NR z buněk nevyloží a nevytvoří homogenní roztok.

Spektrometrem se změří absorbance extraktu NR při 540 nm, přičemž se pro srovnání použije slepý pokus. Údaje se uloží ve vhodném formátu elektronického souboru pro následnou analýzu.

2. **ÚDAJE**

2.1 KVALITA A MNOŽSTVÍ ÚDAJŮ

Údaje ze zkoušky by měly umožnit smysluplnou analýzu závislosti odezvy na koncentraci získané při ozáření a bez něho, a je-li to možné, koncentraci zkoušené látky, při níž je životaschopnost buněk snížena na 50 % (IC₅₀). Je-li zjištěna cytotoxicita, měl by být rozsah koncentrací a interval mezi nimi nastaven tak, aby bylo možné proložit experimentálními údaji křivku.

Pro jasně pozitivní a jasně negativní výsledky (viz první odstavec bodu 2.3) může dostačovat primární experiment podpořený jedním nebo více předběžnými experimenty pro stanovení rozsahu dávek.

▼ B

Neprůkazné, hraniční nebo nejasné výsledky by měly být vyjasněny dalším zkoušením (viz též druhý odstavec bodu 2.4). V těchto případech by měla být uvážena změna experimentálních podmínek. Změněné experimentální podmínky se mohou týkat rozmezí koncentrací nebo rozestupů mezi jednotlivými koncentracemi, preinkubační doby a doby expozice ozářením. Kratší doba expozice může být vhodná u chemických látek nestálých ve vodě.

2.2 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

S cílem umožnit vyhodnocení údajů může být vypočten fotoiritační faktor (PIF) a střední světelný účinek (MPE).

Pro výpočet parametrů fotocytotoxicity (viz níže) musí být soubor diskrétních hodnot závislosti odezvy na koncentraci aproximován vhodnou spojitou křivkou závislosti odezvy na koncentraci (vhodným modelem). Prokládání dat křivkou je běžně prováděno metodou nelineární regrese (18). Pro posouzení vlivu variability údajů na proloženou křivku se doporučuje postup *bootstrap*.

Fotoiritační faktor (PIF) se vypočte ze vzorce:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

Pokud nelze vypočíst IC_{50} v přítomnosti a při absenci ozáření, nelze pro zkoušený materiál fotoiritační faktor PIF stanovit.

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Střední světelný účinek (MPE) je založen na srovnání úplné křivky závislosti odezvy na koncentraci (19). MPE je definován jako vážený průměr reprezentativního souboru hodnot světelného účinku:

Světelný účinek při koncentraci C (PE_C) je definován jako součin účinku odezvy RE_C a účinku dávky DE_C tj. $\text{PE}_C = \text{RE}_C \times \text{DE}_C$. Účinek odezvy RE_C je rozdíl mezi odezvou pozorovanou při absenci a v přítomnosti světla, tj. $\text{RE}_C = R_C(-\text{Irr}) - R_C(+\text{Irr})$. Účinek dávky je dán vzorcem:

$$\text{DE}_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

kde C^* představuje ekvivalentní koncentraci, tj. koncentraci, při které se odezva v přítomnosti světla $+\text{Irr}$ rovná odezvě při absenci světla $-\text{Irr}$ při koncentraci C . Pokud nelze ekvivalentní koncentraci C^* určit, protože hodnoty odezvy $R_C(+\text{Irr})$ křivky jsou soustavně vyšší nebo nižší než hodnoty $R_C(-\text{Irr})$, je účinek dávky stanoven na hodnotu 1. Váhové faktory w_i jsou dány nejvyšší hodnotou odezvy, tj. $w_i = \text{MAX} \{R_i(+\text{Irr}), R_i(-\text{Irr})\}$. Koncentrační síť C_i je volena tak, aby v každém koncentračním intervalu definovaném hodnotami koncentrací použitými v experimentu byl stejný počet bodů. Výpočet středního světelného účinku je omezen na nejvyšší hodnoty koncentrací, při nichž alespoň jedna z obou křivek stále ještě vykazuje odezvu nejméně 10 %. Pokud je tato maximální koncentrace vyšší než nejvyšší koncentrace použitá v $+\text{Irr}$ experimentu, je na zbývajících částech $+\text{Irr}$ křivky odezva kladena jako rovná nule (= 0). V závislosti na tom, zda je, či není hodnota MPE větší než vhodně zvolená hraniční hodnota ($\text{MPE}_C = 0,15$), zkoušená chemická látka je, či není klasifikována jako fototoxická.

▼B

Program pro výpočet parametrů PIF a MPE je dostupný v (20).

2.3 INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Na základě validační studie (8) lze předpovědět, že zkoušená látka s $PIF < 2$ či $MPE < 0,1$ „není fototoxická“. Hodnoty $PIF > 2$ a < 5 či $MPE > 0,1$ a $< 0,15$ předpovídají: „pravděpodobně fototoxická“; a $PIF > 5$ či $MPE > 0,15$ předpovídají: „fototoxická“.

V laboratoři zavádějící prvně toto stanovení by referenční materiály uvedené v tabulce 1 měly být odzkoušeny před zkoušením zkušebních látek ke stanovení fototoxicity. Naměřené hodnoty PIF a MPE by měly být blízké hodnotám uvedeným v tabulce 1.

Tabulka 1

Chemický název	č. EINECS	č. CAS	PIF	MPE	Absorpční pík	Rozpouštědlo ⁽¹⁾
amidaron-hydrochlorid	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (rameno)	ethanol
chlorpromazin-hydrochlorid	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	ethanol
norfloxacin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	acetonitril
anthracen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	acetonitril
protoporfyrin IX, disodná sůl	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	ethanol
L-histidin		[7006-35-1]	žádný PIF	0,05–0,10	211 nm	voda
2,2'-metylenbis(3,4,6-trichlorofenol); hexachlorofen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (rameno)	ethanol
natrium-dodecyl-sulfát	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	neabsorbuje	voda

⁽¹⁾ Rozpouštědlo použité pro měření absorpce.

2.4 INTERPRETACE ÚDAJŮ

Jsou-li fototoxické účinky pozorovány pouze při nejvyšších zkoušených koncentracích (zvláště v případě zkoušených chemických látek rozpustných ve vodě), mohou být pro posouzení nebezpečnosti nezbytné další úvahy. Ty se mohou týkat údajů o absorpci kůží a akumulaci chemické látky v kůži a/nebo údajů z jiných zkoušek, např. ze zkoušek dotyčné chemické látky *in vitro* za použití zvířecí nebo lidské kůže či jejich modelů.

▼B

Není-li toxicita prokázána (+ Irr a – Irr) a jsou-li koncentrace, které by mohly být zkoušeny, omezeny malou rozpustností, není patrně zkouška pro zkoušenou látku vhodná a mělo by být zvaženo potvrzující zkoušení za použití např. jiného modelu.

3. **ZPRÁVY**

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat přinejmenším tyto informace:

Zkoušená látka:

- identifikační údaje, obecné generické názvy a čísla podle IUPAC a CAS, jsou-li známa,
- fyzikální vlastnosti a čistota,
- fyzikálně-chemické vlastnosti důležité pro provedení studie,
- UV/VIS absorpční spektrum,
- stálost a fotostabilita, jsou-li známy.

Rozpouštědlo:

- zdůvodnění volby rozpouštědla,
- rozpustnost zkoušené chemické látky v rozpouštědle,
- procentuální koncentrace rozpouštědla v aplikačním médiu.

Buňky:

- typ a zdroj buněk,
- nepřítomnost mykoplasmat,
- číslo buněčné pasáže, je-li známo,
- citlivost buněk na záření stanovená ozařovacím zařízením použitým ve zkoušce fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

Zkušební podmínky (1); *inkubace před aplikací a po ní*:

- typ a složení kultivačního média,
- inkubační podmínky (koncentrace CO₂; teplota; vlhkost),
- délka inkubace (zpracování před inkubací a po ní).

Zkušební podmínky (2); *aplikace chemické látky*:

- zdůvodnění výběru koncentrací zkoušené chemické látky použitých jak při ozáření, tak bez něj,
- v případě, že zkoušená chemická látka vykazuje omezenou rozpustnost a není cytotoxická: zdůvodnění nejvyšší zkušební koncentrace,
- typ a složení aplikačního média (pufrovaný fyziologický roztok),
- délka aplikace chemické látky.

Zkušební podmínky (3); *ozáření*:

- zdůvodnění výběru použitého zdroje světla,

▼ B

- výrobce a typ zdroje světla a radiometru,
- spektrální charakteristiky ozáření ze zdroje světla,
- charakteristiky propustnosti a absorpce použitého filtru (použitých filtrů),
- charakteristiky radiometru a podrobnosti o jeho kalibraci,
- vzdálenost zdroje světla od zkoušeného systému,
- intenzita ozáření UVA v této vzdálenosti, vyjádřená v mW/cm^2 ,
- délka expozice UV/VIS světlu,
- dávka UVA záření (intenzita \times čas), vyjádřená v J/cm^2 ,
- teplota buněčných kultur během ozařování a teplota buněčných kultur souběžně udržovaných v temnu.

Zkušební podmínky (4); *zkouška životaschopnosti příjem neutrální červeně*:

- složení aplikačního média neutrální červeně,
- doba inkubace neutrální červeně,
- inkubační podmínky (koncentrace CO_2 ; teplota; vlhkost),
- podmínky extrakce neutrální červeně (extrakční činidlo; délka extrakce),
- vlnová délka použitá pro spektrofotometrický odečet absorpance neutrální červeně,
- druhá (referenční) vlnová délka, je-li použita,
- složení slepého roztoku pro spektrometrii, je-li použit.

Výsledky:

- životaschopnost buněk získaná při každé koncentraci zkoušené chemické látky vyjádřená v procentech střední životaschopnosti souběžných rozpouštědlových kontrol,
- křivky koncentrační závislosti odezvy (koncentrace zkoušené chemické látky versus relativní životaschopnost buněk) získané při souběžných experimentech + Irr a – Irr,
- analýza křivek koncentrační závislosti odezvy; je-li to možné, výpočet hodnot / IC_{50} (+ Irr) a IC_{50} (– Irr),
- srovnání obou křivek koncentrační závislosti odezvy získaných s ozářením a bez něho, a to buď výpočtem fotoiritačního faktoru (PIF), nebo výpočtem středního světelného účinku (MPE),
- kritéria přijatelnosti zkoušky; souběžná rozpouštědlová kontrola:
- absolutní životaschopnost (absorbance extraktu NR) ozářených a neozářených buněk,
- dosavadní údaje pro negativní a rozpouštědlovou kontrolu; střední hodnoty a směrodatné odchylky,
- kritéria přijatelnosti zkoušky; souběžná pozitivní kontrola:

▼B

— IC₅₀(+ Irr) a IC₅₀(- Irr) a PIF/MPE pozitivní kontrolní chemické látky,

— dosavadní údaje pozitivní kontrolní chemické látky: IC₅₀(+ Irr) a IC₅₀(- Irr) a PIF/MPE; střední hodnoty a směrodatné odchylky.

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

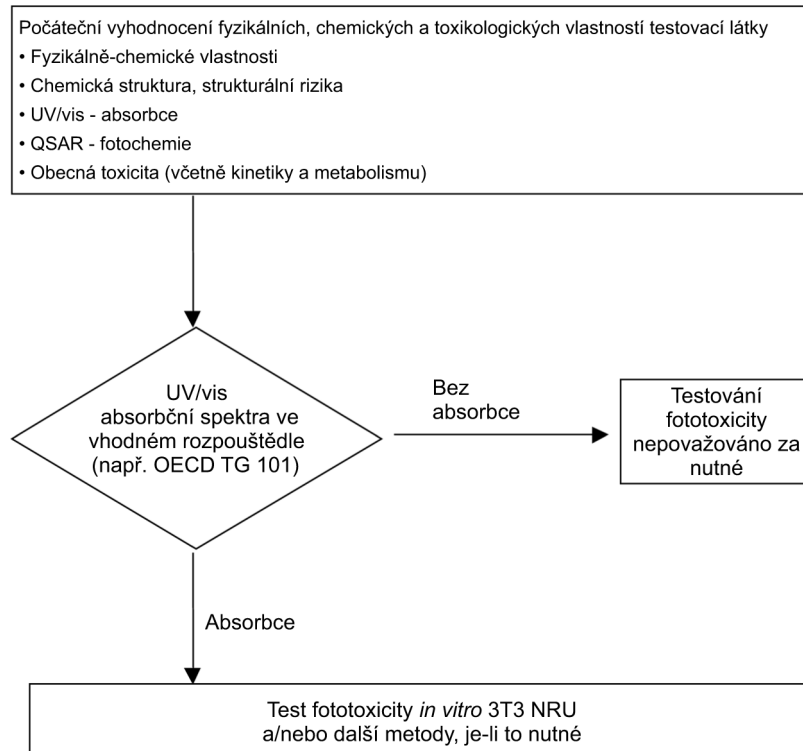
- 1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95–102.
- 2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI–XXXV.
- 3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314–348.
- 4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, s. 79–110.
- 5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.
- 6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793–796.
- 7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7–8.
- 8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305–327.
- 9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.
- 10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119–124.
- 11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225–237.

▼ B

- 12) Lambert L.A., Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, s. 515–530.
- 13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825–1829.
- 14) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.
- 15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275.
- 16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 stran.
- 17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679–708.
- 18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127–138.
- 19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445–462.
- 20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html.

▼ B

DODATEK 2

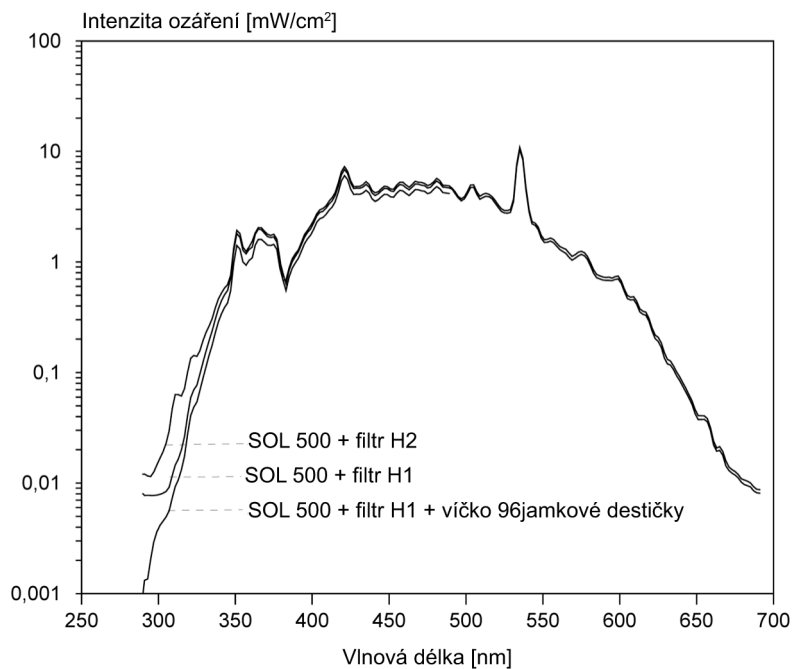
Role zkoušky fototoxicity 3T3 NRU v postupném zkoušení fototoxicity chemických látek

▼ B

DODATEK 2

Obrázek 1

Spektrální distribuce výkonu filtrovaného solárního simulátoru



(viz druhý odstavec bodu 1.4.1.5)

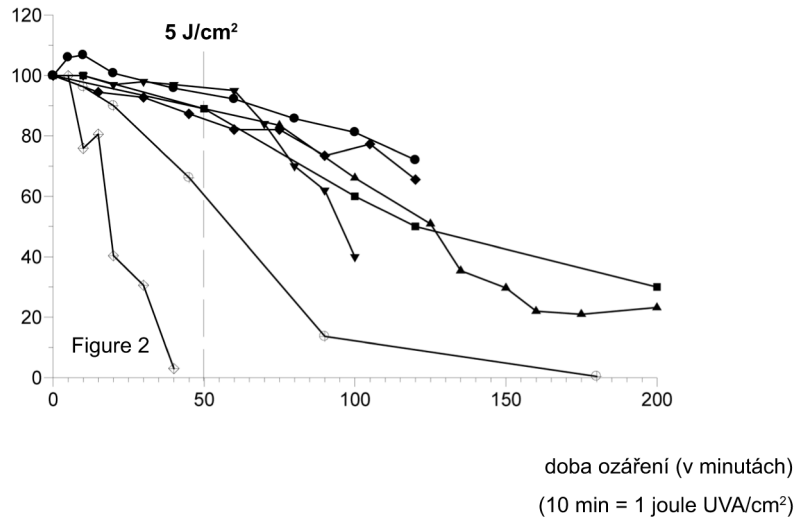
Obrázek 1 uvádí příklad přijatelné spektrální distribuce intenzity ozáření filtrovaného solárního simulátoru. Pochází ze zdroje dopovaného halidy kovů, použitého ve validačním experimentu zkoušky fototoxicity 3T3 NRU (6, 8, 17). Je ukázán účinek dvou různých filtrů a dodatečný filtrační účinek víčka 96jamkové destičky pro kultivaci buněk. Filtr H2 byl použit pouze ve zkušebních systémech tolerantních k vyšší dávce UVB (zkouška modelu kůže a fotohemolytická zkouška červených krvinek). Pro zkoušku fototoxicity 3T3 NRU byl použit filtr H1. Obrázek ukazuje, že dodatečný filtrační účinek víčka destičky je pozorován hlavně v oblasti UVB, přičemž víčkem proniká stále ještě dostatečné množství UVB ze spektra intenzity ozáření k excitování chemických látek obvykle absorbujících v UVB oblasti, jako amiodaron (viz tabulka 1).

▼ B

Obrázek 2

Citlivost buněk Balb/c 3T3 k ozáření (měřená v oblasti UVA)

Životaschopnost buněk (v % úrovně příjmu neutrální červeně v kontrole v temnu)



(viz bod 1.4.1.5.2 druhý odstavec; 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Citlivost buněk Balb/c 3T3 k ozáření solárním simulátorem použitým ve validačním experimentu zkoušky fototoxicity 3T3 NRU, naměřená v UVA oblasti. Obrázek znázorňuje výsledky změřené v sedmi různých laboratořích v předvalidační studii (1). Zatímco dvě křivky označené neplnými symboly byly získány se staršími buňkami (s vyšším počtem pasáží), které musely být nahrazeny novými buňkami, křivky s plnými symboly představují buňku s přijatelnou tolerancí k ozáření.

Z těchto údajů byla odvozena nejvyšší necytotoxická dávka ozáření 5 J/cm² (svislá čárkovaná čára). Vodorovná čárkovaná čára představuje navíc maximální přijatelný účinek ozáření uvedený v bodu 1.4.2.2.

▼B**B.42 SENZIBILIZACE KŮŽE: ZKOUŠKA S VYŠETŘENÍM
LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN****1. METODA**

Tato metoda rovnocenná metodě OECD TG 429 (2002).

1.1 ÚVOD

Zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin (LLNA) byla dostatečně validována a uznána, což opravňuje její přijetí jako nové metody (1, 2, 3). Jedná se o druhou metodu zaměřenou na hodnocení schopnosti chemických látek senzibilizovat kůži zvířat. První metoda (B.6) využívá zkoušek na morčatech, a to zvláště maximalizační zkoušku na morčatech a Bühlerův test (4).

LLNA představuje alternativní metodu pro identifikaci chemických látek způsobujících senzibilizaci kůže a pro potvrzení, že chemické látky nemají významný potenciál senzibilizovat kůži. To však neznamená, že by se metoda LLNA měla používat ve všech případech místo zkoušek na morčatech; znamená to spíše, že tato metoda má stejnou hodnotu a že ji lze použít jako alternativní metodu, jejíž pozitivní ani negativní výsledky již nevyžadují žádné další potvrzování.

LLNA poskytuje určité výhody, pokud jde o vědecký pokrok a dobré zacházení se zvířaty. Metoda zkoumá indukční fázi senzibilizace kůže a poskytuje kvantitativní údaje, které jsou vhodné pro hodnocení vztahu dávky a odezvy. Podrobné údaje o validaci metody LLNA a přehled prací spojených s touto metodou byly publikovány (5, 6, 7, 8). Kromě toho je třeba poznamenat, že mírně nebo středně silně senzibilizující látky, které se doporučují jako vhodné pozitivní kontrolní látky u zkoušek na morčatech, jsou vhodné také pro metodu LLNA (6, 8, 9).

LLNA je metodou *in vivo* a jako taková neeliminuje používání zvířat při hodnocení senzibilizující aktivity působící kontaktem. Tato metoda však umožňuje snížit počet zvířat, která jsou k tomuto účelu nezbytná. Kromě toho LLNA nabízí podstatné zlepšení zacházení se zvířaty, která jsou používána ke zkoušení kontaktní senzibilizace. Metoda LLNA je založená na posouzení imunologických jevů navozených chemickými látkami během indukční fáze senzibilizace. Na rozdíl od zkoušek na morčatech metoda LLNA nevyžaduje umělé vyvolání kožní přecitlivělosti. Kromě toho metoda LLNA nevyžaduje ani používání adjuvantu, jak je tomu v případě maximalizační zkoušky na morčatech. Díky tomu metoda LLNA snižuje utrpení zvířat. Ale i přes výhody, které má metoda LLNA ve srovnání s tradičními maximalizačními zkouškami na morčatech, je třeba si uvědomit, že zde existují určitá omezení, která si mohou vyžádat použití tradičních zkoušek na morčatech (např. falešně negativní výsledky při použití LLNA s určitými kovy, falešně pozitivní výsledky u určitých látek způsobujících podráždění kůže) (10).

Viz také obecný úvod, část B.

▼B

1.2 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Základní princip metody LLNA spočívá v tom, že senzibilizátory navozují primární proliferaci lymfocytů v lymfatických uzlinách drenujících místo aplikace chemické látky. Tato proliferace je úměrná aplikované dávce (a potenciálu alergenu) a poskytuje jednoduchý prostředek k získání objektivního kvantitativního měření senzibilizace. LLNA ji hodnotí jako vztah dávka odezva a za tímto účelem se porovnává proliferace ve zkušebních skupinách s proliferací u skupin, kterým se podává vehikulum. Poměr proliferace u exponovaných skupin a u skupin s vehikulem, nazvaný index stimulace, musí být alespoň 3, aby bylo možné zkoušenou látku dále hodnotit jako případný senzibilizátor kůže. Metody, které jsou zde popsány, jsou založené na využívání radioaktivního značení k měření buněčné proliferace. Hodnocení této proliferace je však možné opírat i o další závěrečná zjištění, a to za předpokladu, že jsou zdůvodněná a existují pro ně vhodné vědecké důkazy, včetně úplných citací a popisu metodiky.

1.3 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.3.1 Přípravy

1.3.1.1 *Podmínky chovu a krmení*

Zvířata by měla být chována samostatně. Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (\pm 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody.

1.3.1.2 *Příprava zvířat*

Zvířata se náhodně vyberou, pro usnadnění individuální identifikace se označí (v žádném případě formou značení uší) a chovají se v klecích minimálně 5 dnů před začátkem podávání látky, aby se mohla přizpůsobit laboratorním podmínkám. Před začátkem aplikace látky se všechna zvířata vyšetří, aby se ověřilo, že nemají žádné pozorovatelné kožní léze.

1.3.2 Zkušební podmínky

1.3.2.1 *Pokusná zvířata*

Vhodným druhem pro tuto zkoušku je myš. Používají se mladé dospělé samice myši z kmene CBA/Ca nebo CBA/J, které musí být nullipary a nesmějí být březí. Na začátku podávání dávek by zvířata měla být přibližně 8 až 12 týdnů stará a odchylky v hmotnosti zvířat by měly být pouze minimální a neměly by překročit 20 % průměrné hmotnosti. Ostatní kmeny a samci by se měli používat pouze tehdy, je-li k dispozici dostatek údajů, které by dokazovaly, že v rámci reakcí v metodě LLNA skutečně neexistují žádné specifické odlišnosti mezi kmeny a/nebo pohlavími.

▼ B1.3.2.2 *Kontrola spolehlivosti*

Pozitivní kontroly se používají k prokázání řádného provedení zkoušky a odborné způsobilosti laboratoře úspěšně provést zkoušky. Pozitivní kontrola by měla vyvolat pozitivní reakci na LLNA při úrovni expozice, u které se očekává zvýšení indexu stimulace (SI) > 3 ve srovnání s negativní kontrolní skupinou. Je třeba zvolit takovou pozitivní kontrolní dávku, aby reakce byla zřetelná, nikoliv však přehnaná. K preferovaným látkám patří 2-benzylidenoktanal (CAS 101-86-0, EINECS 202-983-3) a 2-sulfanylbenzothiazol (CAS 149-30-4, EINECS 205-736-8). Mohou existovat určité okolnosti, za nichž lze při řádném zdůvodnění použít jiné kontrolní látky, které splňují výše uvedená kritéria. I když se pro každou zkoušku obvykle vyžaduje pozitivní kontrolní skupina, mohou se rovněž vyskytnout situace, kdy mají zkušební laboratoře k dispozici předchozí údaje o pozitivní kontrole prokazující homogenitu dostatečné reakce během šesti měsíců nebo delšího časového období. V takovém případě může být vhodnější méně četné testování s pozitivními kontrolami v intervalech, které by neměly být delší než 6 měsíců. Ačkoliv by se pozitivní kontrolní látky měly testovat ve vehikulu, o kterém je známo, že vyvolává stále stejnou reakci (např. aceton, olivový olej), mohou nastat určité situace, kdy je z důvodů požadovaných v právních předpisech nezbytné provést zkoušku s použitím nestandardního vehikula (klinicky/chemicky relevantní receptura přípravku). V takovém případě je třeba testovat možnou interakci pozitivní kontroly s tímto nestandardním vehikulem.

1.3.2.3 *Počet zvířat, úroveň dávek a výběr vehikula*

Na každou dávkovou skupinu se použijí alespoň čtyři zvířata, přičemž se použijí minimálně tři koncentrace zkoušené látky, dále se použije negativní kontrolní skupina, které se podává pouze vehikulum zkoušené látky, a v případě potřeby pozitivní kontrola. Jestliže se shromažďují údaje o jednotlivých zvířatech, použije se na každou dávkovou skupinu minimálně pět zvířat. S výjimkou aplikace zkoušené látky se se zvířaty v kontrolní skupině zachází stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině.

Volba dávkování a vehikula by měla být založena na doporučeních uvedených v literatuře (1). Dávky se vybírají z řady koncentrací 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atd. Při výběru tří po sobě jdoucích koncentrací je třeba zvážit již existující údaje o akutní toxicitě a kožní dráždivosti, jsou-li k dispozici, aby nejvyšší koncentrace maximalizovala expozici, ale aby současně nevyvolala systémovou toxicitu a nadměrné podráždění kůže (2, 11).

Vehikulum by mělo být vybráno tak, aby se maximalizovaly zkušební koncentrace a rozpustnost k přípravě roztoku/suspenze vhodné pro aplikaci zkoušené látky. Upřednostňují se vehikula v následujícím pořadí: aceton/olivový olej (4:1 obj.), N, N-dimethylformamid, ethyl(methyl)keton, propan-1,2-diol a dimethylsulfoxid (2, 10), jsou-li předloženy dostatečné vědecké důvody, mohou být použita i jiná vehikula. V určitých případech může být nezbytné použít jako doplňující kontrolu klinicky relevantní rozpouštědlo nebo běžný přípravek, v němž je zkoušená látka uváděna na trh. Zvláštní pozornost je třeba věnovat zajištění toho, aby byly hydrofilní materiály zapracovány do takového vehikula, které zvlhčí kůži a nestechne ihned z pokožky. Z tohoto důvodu není vhodné používat zcela vodná vehikula.

▼ B1.3.3 **Zkušební postup**1.3.3.1 *Harmonogram zkoušky*

Harmonogram zkoušky je následující:

Den 1

Každé zvíře se zváží a zaznamená se jeho hmotnost. Provede se otevřená aplikace 25 μ l příslušného ředění zkoušené látky, samotného vehikula nebo případně pozitivní kontrolní látky na dorsální část obou uší.

Den 2 a 3

Zopakuje se postup aplikace provedený v den 1.

Den 4 a 5

Žádná aplikace.

Den 6

Zaznamená se hmotnost každého zvířete. Přes ocasní žílu se všem pokusným i kontrolním myším vpíchne 250 μ l fyziologického roztoku ve fosfátovém pufru (PBS), obsahujícího 20 μ Ci ($7,4 \cdot 10^5$ Bq) [3 H]thymidinu (tritiováném na metylu), nebo lze všem myším přes ocasní žílu vpíchnout 250 μ l PBS obsahujícího 2 μ Ci ($7,4e + 8 \cdot (10^4)$ Bq) [125 I]joddeoxyuridinu a 10^{-5} M fluordeoxyuridinu.

O pět hodin později se myši usmrtí. Drenující aurikulární lymfatické uzliny z obou uší se vyjmou a shromáždí se v PBS společně pro celou zkušební skupinu (metoda sdružení exponované skupiny), nebo se od každého zvířete vyjme pár lymfatických uzlin a tento pár se uloží do PBS (metoda individuálního přístupu ke zvířatům). Podrobnosti a grafické znázornění označení uzlin a jejich disekce lze nalézt v příloze I v literatuře (10).

1.3.3.2 *Příprava buněčné suspenze*

Jedna společná buněčná suspenze s buňkami lymfatických uzlin (LNC) buď od celé exponované skupiny, nebo jejich párů od jednotlivých zvířat se připraví pomocí jemné mechanické deagregace přes 200 μ m sítku z korozivzdorné oceli. Lymfatické buňky se dvakrát propláchnou v dostatečném množství PBS a nechají se vysrážet v roztoku s 5 % trichloroctovou kyselinou (TCA) při 4 $^{\circ}$ C po dobu 18 hodin (2). Sediment se buď resuspenduje v 1 ml TCA a přemístí do scintilačních kyvet obsahujících 10 ml kapalného scintilátoru pro měření aktivity 3 H, nebo se přenese přímo do zkumavek pro měření aktivity 125 I.

1.3.3.3 *Stanovení buněčné proliferace (inkorporované radioaktivity)*

Inkorporace [3 H]thymidinu se měří β -scintilační metodou a vyjádří se v rozpadech za minutu (dpm). Inkorporace [125 I]joddeoxyuridinu se měří prostřednictvím aktivity 125 I a rovněž se vyjádří v dpm. V závislosti na použitém přístupu se inkorporace vyjádří v dpm na zkušební skupinu (metoda sdružení) nebo v dpm na zvíře (individuální přístup).

1.3.3.4 *Pozorování*1.3.3.4.1 *Klinická pozorování*

Zvířata se jednou denně pečlivě vyšetří na jakékoli klinické příznaky, ať již ve formě lokálního podráždění v místě aplikace, nebo ve formě systémové toxicity. Všechna sledování se systematicky zaznamenávají, přičemž záznamy se vedou zvláště pro každé zvíře.

▼ B

1.3.3.4.2 Tělesná hmotnost

Jak je uvedeno v bodu 1.3.3.1, tělesnou hmotnost u jednotlivých zvířat je třeba zaznamenat na začátku zkoušky a v den plánovaného usmrcení zvířat.

1.3.4 Výpočet výsledků

Výsledky se vyjádří jako index stimulace (SI). Při metodě sdružení exponované skupiny se SI stanoví jako podíl sdružené inkorporované aktivity u jednotlivých experimentálních skupin a sdružené radioaktivity kontrolní skupiny s vehikulem; získá se tak průměrná hodnota SI. Při individuálním přístupu se SI stanoví jako podíl průměrné hodnoty dpm na zvíře jak u každé exponované skupiny, tak u pozitivní kontrolní skupiny, a průměrné hodnoty dpm na zvíře u kontrolní skupiny s rozpouštědlem/vehikulem. Průměrná hodnota SI pro kontrolní skupiny s vehikulem je proto 1.

Použití individuálního přístupu při výpočtu SI umožní provést statistickou analýzu dat. Při výběru vhodné metody pro statistickou analýzu si musí být experimentátor vědom možných nestejných odchylek a jiných souvisejících problémů, které si mohou vyžádat transformaci dat nebo neparametrickou statistickou analýzu. Správný přístup k analýze dat spočívá ve vyhodnocení všech jednotlivých dat exponovaných kontrol a kontrol s vehikulem a odvození nejvhodnější křivky závislosti odezvy na dávce, přičemž je třeba zohlednit intervaly spolehlivosti (8, 12, 13). V každém případě si však experimentátor musí uvědomovat možné „odlehle“ reakce u jednotlivých zvířat v rámci skupiny, které mohou vyžadovat použití jiného hodnocení odezvy (např. použití mediánu namísto průměru) nebo vyřazení těchto odlehlých hodnot.

Do rozhodování, zda jde o pozitivní odezvu, se zahrnuje index stimulace ≥ 3 a zohledňuje se závislost odezvy na dávce a popřípadě statistická významnost (3, 6, 8, 12, 14).

Je-li nezbytné objasnit získané výsledky, je třeba věnovat pozornost různým vlastnostem zkoušené látky, včetně toho, zda se její struktura podobá struktuře známých senzibilizátorů kůže, zda způsobuje nadměrné podráždění kůže a také povaze zjištěné závislosti odezvy na dávce. Těmito body a dalšími úvahami se podrobně zabývá literatura (7).

2. ÚDAJE

Data se shrnou do tabulky, přičemž pro každou dávkovou skupinu se uvedou průměrné a individuální hodnoty dpm a indexy stimulace (včetně kontrolní skupiny s vehikulem).

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, je-li k dispozici; zdroj; čistota; známé nečistoty; číslo šarže),
- skupenství a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. prchavost, stálost, rozpustnost),
- jedná-li se o směs, složení a poměrné procentuální zastoupení složek.

▼ B

Vehikulum:

- identifikační údaje (čistota; popřípadě koncentrace; použitý objem),
- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh myši,
- mikrobiologický stav zvířat, je-li znám,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ zvířat, podmínky chovu, strava atd.

Zkušební podmínky:

- podrobnosti o přípravě a aplikaci zkoušené látky,
- zdůvodnění výběru dávek, včetně výsledků z orientační studie, pokud byla provedena; použité koncentrace vehikula a zkoušené látky a celkové aplikované množství látky,
- podrobnosti o jakosti vody a potravy (včetně druhu/zdroje stravy, zdroje vody).

Kontrola spolehlivosti:

- souhrn výsledků z poslední kontroly spolehlivosti, včetně informací o použité látce, koncentraci a vehikulu,
- data ze souběžných a/nebo dřívějších pozitivních nebo negativních kontrolních skupin v dané laboratoři.

Výsledky:

- hmotnost jednotlivých zvířat na počátku aplikace a v době plánovaného usmrcení,
- tabulka průměrných (sdružená metoda) a individuálních (individuální přístup) hodnot dpm a rovněž rozpětí hodnot u obou přístupů a indexy stimulace pro jednotlivé dávkové skupiny (včetně kontrolní skupiny s vehikulem),
- případná statistická analýza,
- u každého zvířete časový průběh nástupu příznaků toxicity, včetně podráždění kůže v místě aplikace, pokud k němu dojde.

Diskuse o výsledcích:

- stručný komentář k výsledkům, k analýze závislosti odezvy na dávce a k případným statistickým analýzám a dále závěr, zda lze zkušební látku považovat za senzibilizátor kůže.

4. LITERATURA

- 1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165–169.
- 2) Kimber, I., Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, 93, 13–31.
- 3) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C. A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Lovelless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563–79.
- 4) Zkušební metoda B.6.

▼ B

- 5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 999–1002.
- 6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985–997.
- 7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*. 36, 327–33.
- 8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49–59.
- 9) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281–4.
- 10) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).
- 11) Zkušební metoda B.4.
- 12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63–67.
- 13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261–266.
- 14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344–48.

▼B**B.43 ZKOUŠKA NEUROTOXICITY NA HLODAVCÍCH****1. METODA**

Tato metoda je rovnocenná metodě OECD TG 424 (1997).

Tato zkušební metoda byla navržena za účelem získání informací, které jsou nezbytné ke schválení nebo k další charakterizaci potenciální neurotoxicity chemických látek u dospělých zvířat. Tuto metodu lze buď kombinovat s již existujícími zkušebními metodami pro studium toxicity po opakovaných dávkách, nebo ji lze provést jako samostatnou zkoušku. Pro usnadnění plánování studií založených na této zkušební metodě se doporučuje prostudovat Doporučení OECD o strategiích a metodách zkoušení neurotoxicity (Neurotoxicity Testing Strategies and Methods) (1). To je zvláště důležité tehdy, je-li třeba zvážit změnu sledování a zkušebních postupů, jak jsou doporučeny pro rutinní používání této metody. Doporučení byla připravena pro usnadnění výběru zkušebních postupů pro specifické podmínky použití.

Posouzení vývojové neurotoxicity není předmětem této metody.

1.1 ÚVOD

Při posuzování a vyhodnocování toxických vlastností chemických látek je velmi důležité zvážit potenciál neurotoxických účinků. Již metoda zkoušení systémové toxicity po opakovaných dávkách zahrnuje sledování, která mají odhalit potenciální neurotoxicitu. Tuto zkušební metodu lze používat při plánování studie za účelem získání dalších informací o neurotoxických účincích zjištěných při studii systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo pro jejich potvrzení. Z úvah o potenciální neurotoxicitě určitých druhů chemických látek však může vyplynout, že by mohly být vhodněji posouzeny pomocí této metody, pokud neexistují údaje o potenciální neurotoxicitě ze studií systémové toxicity po opakovaných dávkách. Tyto úvahy zahrnují například:

- pozorování neurologických příznaků nebo neuropatologických lézí v jiných studiích toxicity než studiích systémové toxicity po opakovaných dávkách, nebo
- strukturní podobnost nebo jiné informace, které posuzovanou látku spojují se známými neurotoxickými látkami.

Kromě toho mohou existovat i další případy, kdy je použití této metody vhodné; další podrobnosti jsou uvedeny v literatuře (1).

Tato metoda byla navržena tak, aby ji bylo možné přizpůsobit zvláštním potřebám při potvrzování specifické histopatologické a behaviorální neurotoxicity chemických látek a při charakterizaci a kvantifikaci neurotoxických účinků.

▼B

Dříve se za neurotoxicitu považovaly neuropatie zahrnující neuropatologické léze nebo neurologické dysfunkce, jako např. záchvaty, ochrnutí nebo třes. I když jsou neuropatie významným projevem neurotoxicity, dnes je již jasné, že existují mnohé další příznaky toxicity pro nervový systém (např. ztráta motorické koordinace, senzorické výpadky, poruchy učení a paměti), které se nemusí projevat ani neuropatií, ani v jiných typech zkoušek.

Tato metoda zkoušení neurotoxicity je navržena tak, aby odhalovala závažné neurobehaviorální a neuropatologické účinky na dospělé hlodavce. Zatímco behaviorální účinky i při nepřítomnosti morfolo-gických změn mohou odrážet nepříznivý vliv na organismus, znamená to, že všechny behaviorální změny jsou specifické pro nervový systém. Z tohoto důvodu by se měly jakékoliv zjištěné změny vyhodnotit v souvislosti s histopatologickými, hematologickými nebo biochemickými údaji, jakož i s údaji o ostatních typech systémové nervové toxicity. Zkoušení požadované v této metodě za účelem charakterizace a kvantifikace neurotoxických odpovědí zahrnuje specifické histopatologické a behaviorální postupy, které lze navíc podpořit elektrofyziologickým a/nebo biochemickým vyšetřením (1, 2, 3, 4).

Neurotoxické látky mohou působit na množství cílových struktur v rámci nervového systému a prostřednictvím různých mechanismů. Protože neexistuje jediná sada zkoušek pro posouzení neurotoxického potenciálu u všech látek, může být nezbytné využít dalších zkoušek *in vivo* nebo *in vitro*, které jsou specifické pro typ pozorované nebo očekávané neurotoxicity.

Tuto zkušební metodu lze použít také společně s doporučeními OECD o strategiích a metodách testování neurotoxicity (OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods) (1) při plánování zkoušek určených k další charakterizaci nebo zvýšení citlivosti kvantifikace vztahu dávka-odezva s cílem lépe odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky, anebo potvrdit známá nebo očekávaná rizika chemických látek. Lze například navrhnout zkoušky, které by identifikovaly a zhodnotily neurotoxický mechanismus (neurotoxické mechanismy) nebo doplnily údaje, které již byly získány základními neurobehaviorálními a neuropatologickými vyšetřovacími postupy. Takové studie nemusí replikovat údaje použitím standardních postupů doporučených v této metodě, jsou-li takové údaje již k dispozici a nepovažují se za nezbytné k interpretaci výsledků z této studie.

Používá-li se tato zkouška neurotoxicity samotná nebo v kombinaci, poskytuje informace, které mohou:

- určit, zda zkoušené chemické látky ovlivňují nervový systém trvale, nebo vratně,
- přispět k charakterizaci změn nervového systému spojených s expozicí chemické látky a přispět k pochopení mechanismů účinku,

▼ B

— stanovit vztahy mezi dávkou a odezvou a časem a odezvou s cílem odhadnout úroveň nevyvolávající pozorovatelné nepříznivé účinky (NOAEL) (kterou lze použít pro vytvoření bezpečnostních kritérií pro chemickou látku).

Tato zkušební metoda používá orální aplikaci zkušební látky. Jiné typy aplikace (např. kožní nebo inhalační) mohou být vhodnější a mohou si také vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích.

1.2 DEFINICE

Nepříznivý účinek: jakákoliv změna spojená s aplikací, která snižuje schopnost organismu přežít, rozmnožovat se nebo přizpůsobit prostředí.

Dávka: množství podané zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje jako hmotnost zkoušené látky (v gramech nebo miligramech) nebo jako hmotnost zkoušené látky na jednotku hmotnosti pokusného zvířete (např. v miligramech na kilogram tělesné hmotnosti) nebo jako konstantní koncentrace v potravě (v ppm nebo v miligramech na kilogram potravy).

Dávkování: obecný termín zahrnující dávku, četnost a trvání podávání látky.

Neurotoxicita: nepříznivá změna struktury nebo funkce nervového systému, která je výsledkem expozice chemickému, biologickému nebo fyzikálnímu činiteli.

Neurotoxické agens: jakýkoliv chemický, biologický nebo fyzikální činitel, který má neurotoxický potenciál.

NOAEL: zkratka pro hladinu bez pozorovaného nepříznivého účinku; odpovídá nejvyšší úrovni dávky nebo expozice, při které nejsou pozorovány žádné nepříznivé nálezy související s podáním látky.

1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená chemická látka se podává orálně v různých dávkách několika skupinám laboratorních hlodavců. Obvykle se vyžaduje podávání opakovaných dávek a dávkovací režim může být buď 28denní, nebo subchronický (90 dnů), nebo chronický (1 rok nebo déle). Postupy stanovené v této zkušební metodě lze použít i při studii akutní neurotoxicity. Zvířata jsou testována za účelem zjištění nebo charakterizace behaviorálních a/nebo neurologických odchylek. Během každého pozorovacího období se hodnotí řada znaků chování, které by mohly být ovlivněny neurotoxickými látkami. Na konci zkoušky se u podskupiny zvířat obou pohlaví z každé skupiny provede perfuze *in situ* a připraví se a vyšetří fezy mozku, míchy a periferních nervů.

Pokud se zkouška provádí jako samostatná zkouška pro vyšetření neurotoxicity nebo charakterizaci neurotoxických účinků, lze zvířata z každé skupiny, která nebyla použita k perfuzi a k následnému histopatologickému vyšetření (viz tabulka 1), použít ke specifickým neurobehaviorálním, neuropatologickým, neurochemickým nebo elektrofyzilogickým vyšetřením, která mohou doplnit údaje získané ze standardních vyšetření vyžadovaných v této metodě (1). Tyto doplňující postupy mohou být zvláště užitečné tehdy, jestliže empirická pozorování nebo předpokládané účinky naznačují specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity chemické látky. Zbývající zvířata lze případně použít k některým jiným hodnocením, jako jsou např. hodnocení požadovaná ve zkušebních metodách u studií toxicity po opakovaných dávkách na hlodavcích.

▼B

Pokud se postupy této zkušební metody kombinují s postupy jiných zkušebních metod, je nezbytný dostatečný počet zvířat, aby byly splněny požadavky pro pozorování v obou studiích.

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.4.1 Výběr živočišných druhů**

Upřednostňovaným druhem hlodavce je potkan, s odpovídajícím zdůvodněním lze použít i jiné druhy hlodavců. Mělo by se jednat o běžně používané laboratorní kmeny mladých zdravých dospělých zvířat. Samice musí být nullipary a nesmí být březí. Podávání látky by mělo začít co nejdříve po odstavení, nejlépe když zvířata dosáhnou stáří šesti týdnů a v každém případě dříve, než dosáhnou stáří devíti týdnů. Pokud se však tato zkouška kombinuje s dalšími zkouškami, je možné, že požadavky týkající se stáří zvířat budou vyžadovat určité změny. Na začátku studie by měl být u používaných zvířat jen minimální rozptyl hmotnosti a neměl by překročit 20 % průměrné hmotnosti u jednotlivých pohlaví. Pokud se před dlouhodobou studií provádí orientační krátkodobá studie toxicity po opakovaných dávkách, je třeba u obou studií použít pokusná zvířata ze stejných kmenů a stejného zdroje.

1.4.2 Podmínky chovu a krmení

Teplota v místnosti pro pokusná zvířata by měla být 22 °C (\pm 3 °C), relativní vlhkost vzduchu by měla být minimálně 30 % a pokud možno nepřesáhnout 70 %, kromě doby úklidu místnosti, cílem by měla být hodnota 50–60 %. Osvětlení bude umělé se střídáním 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení lze použít konvenční laboratorní stravu s neomezenou dodávkou pitné vody. Na výběr stravy může mít vliv nutnost zajistit vhodnou přísadu pro zkoušenou látku, je-li látka podávána touto metodou. Zvířata lze chovat jednotlivě, anebo je lze umístit v klecích v malých skupinkách zvířat stejného pohlaví.

1.4.3 Příprava zvířat

Zdravá mladá zvířata jsou náhodně rozdělena do experimentálních a kontrolních skupin. Klece by měly být uspořádány tak, aby byl vliv umístění klecí minimalizován. Jednotlivá zvířata se jednoznačně identifikují a umístí se do klecí nejméně pět dnů před začátkem studie, aby si mohla zvyknout na laboratorní podmínky.

1.4.4 Způsob aplikace a příprava dávek

V této zkušební metodě se jedná konkrétně o orální způsob aplikace zkoušené látky. Orální aplikaci lze provádět prostřednictvím žaludeční sondy, potravy, pitné vody nebo tobolek. Použít lze i jiné způsoby aplikace (např. kožní nebo inhalační), které si mohou vyžádat modifikaci doporučených postupů. Výběr způsobu aplikace závisí na způsobu expozice člověka a na dostupných toxikologických nebo kinetických informacích. Je třeba uvést důvody pro výběr způsobu aplikace a odpovídající modifikace postupů v rámci této zkušební metody.

▼B

Zkoušená látka se podle potřeby rozpustí nebo suspenduje ve vhodném vehikulu. Je-li to možné, doporučuje se zvážít použití vodného roztoku/suspense, potom použití roztoku/emulze v oleji (např. v kukuřičném oleji) a nakonec roztoku/suspence v jiném vehikulu. Je třeba znát toxické vlastnosti vehikula. Kromě toho je třeba věnovat pozornost následujícím typickým znakům vehikula: účinku na absorpci, distribuci, metabolismus nebo retenci zkoušené látky a dále účinku na chemické vlastnosti zkoušené látky, které mohou pozměnit její toxické charakteristiky, a účinku na spotřebu potravy nebo vody anebo nutriční stav zvířat.

1.5 POSTUPY

1.5.1 Počet a pohlaví zvířat

Pokud se studie provádí jako samostatná studie, je třeba použít v každé dávkové a kontrolní skupině alespoň 20 zvířat (10 samic a 10 samců) pro vyhodnocení podrobných klinických a funkčních pozorování. Alespoň u pěti samců a pěti samic vybraných z těchto deseti samců a samic je třeba na konci zkoušky provést perfúzi *in situ* a použít je k podrobnému neurohistopatologickému vyšetření. V případě, kdy jsou v dané dávkové skupině pozorovány příznaky neurotoxických účinků pouze u omezeného počtu zvířat, je třeba zvážít přiřazení těchto zvířat ke zvířatům vybraným pro perfúzi. Pokud se studie provádí v kombinaci se studií toxicity po opakovaných dávkách, je třeba použít odpovídající počet zvířat, aby bylo možné splnit cíle obou studií. Minimální počet zvířat na skupinu u nejrůznějších kombinací studií je uveden v tabulce 1. Pokud se plánuje utracení ve vložených intervalech nebo vytvoření reparační skupiny ke sledování vratných účinků, perzistence nebo zpožděného výskytu toxických účinků po skončení aplikace, nebo se zvažují dodatečná sledování, je třeba zvýšit počet zvířat, aby se zajistil dostatečný počet zvířat požadovaných ke sledování a k histopatologickému vyšetření.

1.5.2 Experimentální a kontrolní skupina

Obecně by měly být použity nejméně tři experimentální a jedna kontrolní skupina; pokud se však podle jiných údajů neočekávají žádné účinky po opakovaných dávkách 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den, může být provedena limitní zkouška. Nejsou-li k dispozici žádné vhodné údaje, může být provedena předběžná studie pro stanovení rozpětí dávek, které mají být použity. S výjimkou aplikace zkoušené látky je třeba se zvířaty v kontrolní skupině zacházet stejným způsobem jako se zvířaty v experimentální skupině. Pokud se při podávání zkoušené látky používá vehikulum, podává se kontrolní skupině v nejvyšším použitém objemu.

1.5.3 Kontrola spolehlivosti

Laboratoř provádějící zkoušku by měla předložit údaje prokazující její způsobilost pro uskutečnění zkoušky a citlivost používaných postupů. Takové údaje by měly poskytnout důkaz o schopnosti odhalit a popřípadě kvantifikovat změny v různých ukazatelích doporučených ke sledování, jako jsou např. vegetativní příznaky, reaktivita na smyslové podněty, síla úchopu a motorická aktivita. Informace o chemických látkách, které způsobují různé typy neurotoxických reakcí a které jsou vhodné jako pozitivní kontrolní látky, lze nalézt v literatuře (2 až 9). Historické údaje lze použít tehdy, pokud zůstanou stejné základní aspekty experimentálních postupů. Doporučuje se pravidelná aktualizace historických údajů. Nové kontrolní údaje by měly být doplněny tehdy, pokud provádějící laboratoř v průběhu zkoušky změní některý základní prvek provádění zkoušky nebo postupu.

▼B**1.5.4 Výběr dávky**

Úrovně dávek je třeba vybrat s ohledem na předchozí zjištěnou toxicitu a kinetické údaje dostupné pro zkoušenou sloučeninu nebo podobné látky. Nejvyšší úroveň dávky se zvolí tak, aby vyvolala neurotoxické nebo jasné systémové toxické účinky, aby bylo možné prokázat závislost odpovědi na dávkách a úroveň dávky bez pozorovatelného nepříznivého účinku (NOAEL), zvolí se sestupná posloupnost úrovní dávek. V zásadě je třeba stanovit úrovně dávek tak, aby bylo možné odlišit primární toxické účinky na nervový systém od systémové toxicity. Obvykle jsou optimální dva až tři intervaly a často je vhodnější přidání čtvrté zkušební skupiny než používání velkých intervalů mezi jednotlivými dávkami (např. lišících se faktorem 10). Rovněž je třeba vzít v úvahu i odhad úrovně expozice u člověka, je-li k dispozici.

1.5.5 Limitní zkouška

Pokud zkouška provedená podle postupů popsaných v této studii při jedné dávce nejméně 1 000 mg/kg tělesné hmotnosti na den nevyvolá pozorovatelné neurotoxické účinky a pokud se na základě údajů o látce s podobnou strukturou nepředpokládá toxicita, není nezbytné provádět kompletní studii za použití tří úrovní dávek. V některých případech předpokládaná expozice u člověka si vyžádá použití vyšší orální dávky v limitní zkoušce. U dalších způsobů podávání látky, jako je inhalační nebo kožní aplikace, může být maximální dosažitelná úroveň expozice dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi zkoušené látky. Při provedení orální akutní zkoušky by dávka pro limitní zkoušku měla činit alespoň 2 000 mg/kg.

1.5.6 Aplikace dávek

Zkoušená látka se podává zvířatům denně, 7 dnů v týdnu, po dobu alespoň 28 dnů. Použití 5denního dávkovacího režimu nebo kratší expozice je třeba zdůvodnit. Je-li látka podávána prostřednictvím žaludeční sondy, měla by se podávat v jedné dávce pomocí sondy nebo vhodné intubační kanyly. Maximální množství tekutiny, které lze jednorázově podat, závisí na velikosti pokusného zvířete. Objem by neměl překročit 1 ml/100 g tělesné hmotnosti. V případě vodných roztoků je však možné zvážit i použití až 2 ml/100 g tělesné hmotnosti. Kromě dráždivých nebo žravých látek, které při vyšších koncentracích obvykle vyvolají silnější účinky, by se měly změny množství zkoušené látky minimalizovat upravením koncentrace, aby se na všech úrovních dávek zajistilo konstantní množství.

U látek podávaných prostřednictvím potravy nebo pitné vody je důležité zajistit, aby množství použité zkoušené látky neovlivnilo vyváženost běžné potravy nebo příjmu vody. Je-li zkoušená látka podávána v potravě, je třeba používat buď konstantní koncentraci v potravě (v ppm), nebo konstantní úroveň dávky, pokud jde o tělesnou hmotnost zvířete. Použití jiné alternativy je třeba zdůvodnit. U látky podávané prostřednictvím žaludeční sondy je třeba dávku podávat každý den přibližně ve stejnou dobu a alespoň jednou týdně ji přizpůsobit tak, aby se udržela konstantní úroveň dávky vzhledem k tělesné hmotnosti zvířete. Provádí-li se studie s opakovanou dávkou jako předběžná studie pro dlouhodobou studii, měla by být v obou studiích používána stejná potrava. Nelze-li v případě studie akutní toxicity použít jednotlivou dávku, je možné podávat dávku po menších částech po dobu, která nepřekročí 24 hodin.

▼ B

1.6 POZOROVÁNÍ

1.6.1 Četnost pozorování a zkoušek

U studií s opakovanou dávkou by doba pozorování měla pokrýt celé dávkovací období. U studií akutní toxicity pokračuje pozorování ještě 14 dnů po skončení aplikace. U zvířat v satelitních skupinách, která jsou v období po skončení aplikace chována bez expozice, by pozorování mělo zahrnovat i toto období.

Pozorování je třeba provádět dostatečně často, aby se maximalizovala pravděpodobnost odhalení všech behaviorálních a/nebo neurologických anomálií. Pozorování se provádí denně, pokud možno ve stejnou dobu a s přihlédnutím k době očekávaného maxima účinku po podání látky. Četnost klinických pozorování a funkčních zkoušek je shrnuta v tabulce 2. Pokud kinetické nebo jiné údaje získané z předchozích studií naznačují potřebu zvolit časové body pozorování nebo zkoušek nebo období po skončení pozorování, je nutné zvolit takový náhradní plán, na jehož základě lze získat co nejvíce informací. Změny plánu je třeba zdůvodnit.

1.6.1.1 *Pozorování celkového zdravotního stavu a úmrtnosti/nemocnosti*

U všech zvířat se alespoň jednou denně pečlivě zkontroluje jejich zdravotní stav a nejméně dvakrát denně se provede prohlídka všech zvířat za účelem zjištění nemocnosti a úmrtnosti.

1.6.1.2 *Podrobná klinická pozorování*

Podrobná klinická pozorování se provedou u všech zvířat vybraných k těmto účelům (viz tabulka 1) nejprve před první expozicí (aby bylo možné intraindividuální srovnání) a poté v různých intervalech podle trvání studie (viz tabulka 2). Podrobná klinická pozorování u satelitních zotavovacích skupin se provedou na konci zotavovacího období. Podrobná klinická pozorování se provádějí mimo chovnou klec ve standardním pozorovacím prostoru. Pozorování se pečlivě zaznamenají pomocí systémů hodnocení, které zahrnují kritéria nebo bodovací stupnice pro jednotlivá měření v rámci pozorování. Používaná kritéria nebo stupnice musí být explicitně definovány zkušební laboratoří. Je třeba dbát na to, aby byly rozdíly ve zkušebních podmínkách co nejmenší (a nesouvisely systematicky s aplikací) a aby vyšetření prováděly osoby, které nejsou informovány o skupině, do které zvíře patří.

Doporučuje se provádět pozorování strukturovaně, přičemž se u každého zvířete při každém pozorování systematicky používají jasně definovaná kritéria (včetně definice normálního „rozpětí“). „Normální rozpětí“ je třeba dostatečně zdokumentovat. Všechny pozorované příznaky se zaznamenají. Je-li to možné, zaznamená se rovněž závažnost pozorovaných příznaků. Klinická pozorování zahrnují kromě jiného změny kůže, srsti, očí a sliznic, výskyt sekretů a exkretů a autonomních funkcí (slzení, zježení srsti, velikost zornic, nezvyklý průběh dýchání a/nebo dýchání ústy, nezvyklé příznaky močení nebo defekace a zbarvení moči).

▼ B

Zaznamenají se rovněž nezvyklé projevy, pokud jde o polohu těla, úroveň aktivity (např. snížené nebo zvýšené zkoumání standardního pozorovacího prostoru) a koordinaci pohybu. Zaznamenají se také změny chůze (např. kolébání, ataxie), polohy (nahrbení hřbetu) a reakce na manipulaci, umístění a další stimuly související s prostředím, dále přítomnost klonických a tonických pohybů, křečí nebo třesu, stereotypů v chování (např. nadměrného čištění, nezvyklých pohybů hlavy nebo opakovaného kroužení) nebo zvláštního chování (např. kousání nebo nadměrného olizování, sebepoškozování, pohybu pozpátku, vydávání zvuků) anebo agresivity.

1.6.1.3 *Funkční zkoušky*

Podobně jako podrobná klinická pozorování se u jednotlivých zvířat vybraných k těmto účelům provedou i funkční zkoušky – nejprve před expozicí a potom vícekrát po jejím provedení (viz tabulka 1). Četnost funkčního testování závisí rovněž na trvání studie (viz tabulka 2). Mimo dobu pozorování stanovenou v tabulce 2 se provede také funkční pozorování satelitní zotavovací skupiny, a to těsně před plánovaným usmrcením. Funkční zkoušky zahrnují reakce na různé smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a proprioceptivní podněty (5, 6, 7)), změní se síla úchopu končetiny (8) a motorická aktivita (9). Motorická aktivita se měří pomocí automatického přístroje schopného odhalit jak snížení, tak i zvýšení této aktivity. Pokud se použije jiný systém, měl by být kvantitativní a je třeba prokázat jeho citlivost a spolehlivost. Každý přístroj je nutné otestovat, aby se zajistila jeho spolehlivost po celé časové období a homogenita s ostatními přístroji. Další podrobnosti o postupech, kterými se lze řídit, jsou uvedeny v příslušných odkazech. Pokud neexistují žádné údaje (např. údaje o vztahu mezi strukturou a biologickou aktivitou, epidemiologické údaje, jiné toxikologické studie), které by ukazovaly na potenciální neurotoxické účinky, je nutné za účelem podrobnějšího vyšetření těchto možných účinků zvážit začlenění specializovanějších zkoušek smyslových a motorických funkcí nebo učení a paměti. Další informace o specializovanějších zkouškách a jejich používání je uvedeno v literatuře (1).

Ve výjimečných případech lze zvířata vykazující známky toxicity v takové míře, která by významně narušila provedení funkční zkoušky, z této zkoušky vyřadit. Vyřazení těchto zvířat z funkčních zkoušek je nutné zdůvodnit.

1.6.2 **Tělesná hmotnost a spotřeba potravy a vody**

U studií s délkou trvání do 90 dnů se všechna zvířata váží alespoň jednou týdně a každý týden se rovněž provádí měření spotřeby potravy (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média). U dlouhodobých studií se všechna zvířata váží alespoň jednou týdně během prvních 13 týdnů a poté alespoň jednou za 4 týdny. Během prvních 13 týdnů se měří spotřeba potravy (měření spotřeby vody se provádí tehdy, je-li zkoušená látka aplikována prostřednictvím tohoto média) a poté přibližně v tříměsíčních intervalech, pokud si změny zdravotního stavu nebo změny tělesné hmotnosti nevyžadají jiný interval.

▼ B**1.6.3 Oftalmologické vyšetření**

U studií delších než 28 dnů se před aplikací zkoušené látky a před ukončením studie provede oftalmologické vyšetření pomocí oftalmoskopu nebo jiného vhodného nástroje, a to nejlépe u všech zvířat, alespoň však u všech zvířat ze skupin s vysokou dávkou a z kontrolních skupin. Pokud se zjistí změny na očích nebo pokud klinické příznaky ukazují na nutnost vyšetření očí, vyšetří se všechna zvířata. U dlouhodobých studií se oftalmologické vyšetření provede ve 13. týdnu stáří zvířat. Oftalmologická vyšetření není nutné provádět tehdy, jsou-li již k dispozici údaje z jiných podobně dlouhých studií s podobnými úrovněmi dávek.

1.6.4 Hematologické a biochemické vyšetření

Pokud se studie neurotoxicity provádí v kombinaci se studií systémové toxicity po opakovaných dávkách, provede se hematologické vyšetření a stanovení klinických biochemických parametrů tak, jak je uvedeno v příslušné metodě studie systémové toxicity. Odebírání vzorků se provede tak, aby se minimalizovaly jakékoliv účinky na chování.

1.6.5 Histopatologie

Neuropatologické vyšetření se navrhne tak, aby doplnilo a rozšířilo pozorování provedená v rámci této studie během fáze *in vivo*. Tkáně alespoň pěti zvířat každého pohlaví z každé skupiny (viz tabulka 1 a další odstavec) se fixují *in situ* za použití obecně uznávaných perfuzních a fixačních technik (viz odkaz na literaturu 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Zaznamenají se jakékoliv výrazné změny. Pokud se studie provádí jako samostatná studie neurotoxicity nebo studie charakterizující neurotoxické účinky, lze použít zbytek zvířat buď ke specifickým neurobehaviorálním (10, 11), neuropatologickým (10, 11, 12, 13), neurochemickým (10, 11, 14, 15), nebo elektrofyziologickým (10, 11, 16, 17) postupům, které mohou doplnit zde popsané postupy a vyšetření, anebo zvýšit počet subjektů vyšetřovaných k histopatologickým účelům. Tyto doplňkové postupy jsou zvláště užitečné tehdy, pokud empirická pozorování nebo očekávané účinky ukazují na specifický typ nebo cílovou strukturu neurotoxicity (2, 3). Je také možné zbytek zvířat použít k běžným patologickým hodnocením, která jsou popsána v metodě studií po opakovaných dávkách.

U všech tkáňových vzorků zalitých parafínem se provede běžný postup barvení, např. pomocí hematoxylinu a eosinu (H&E), a mikroskopické vyšetření. Jsou-li pozorovány nebo existuje-li podezření na příznaky periferní neuropatie, vyšetří se vzorky periferních nervů zalitých do pryskyřic (vosků). Klinické příznaky mohou rovněž poukázat na další místa, která je nutné vyšetřit, nebo na nutnost použít speciální postupy barvení. Pokyny k určení dalších míst, která je třeba vyšetřit, lze nalézt v literatuře (3, 4). K prokázání charakteristických typů patologické změny může přispět i odpovídající speciální barvení (18).

▼ B

U reprezentativních řezů centrálního a periferního nervového systému se provede histologické vyšetření (viz odkaz na literaturu 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Mezi vyšetřované oblasti obvykle patří: přední mozek, střední část mozku, včetně řezu hippocampem, střední mozek, mozeček, Varolův most, prodloužená mícha, oko se zrakovým nervem a sítnicí, mícha v oblasti cervikálního a lumbálního zesílení, dorsální kořenová ganglia, dorsální a ventrální kořenová vlákna, proximální část *n. ischiadicus* a proximální část *n. tibialis* (v oblasti kolena) a *n. tibialis* z oblasti lýtkového svalu. Řezy míchy a periferních nervů by měly zahrnovat jak příčné, tak i podélné řezy. Pozornost je nutné věnovat uspořádání cév v oblasti nervového systému. Rovněž se vyšetří vzorky z kosterního svalstva, a to zvláště z lýtkového svalu. Zvláštní pozornost je nutné věnovat místům s buněčnou a vláknitou strukturou a těm strukturám v oblasti CNS a PNS, o nichž je známo, že na ně mají neurotoxické látky značný vliv.

Informace o neuropatologických změnách, které typicky vznikají v důsledku expozice toxickým látkám, lze nalézt v literatuře (3, 4). Doporučuje se postupné vyšetření tkáňových vzorků, při kterém se porovnají nejprve vzorky řezů ze skupiny s vysokou dávkou se vzorky řezů z kontrolní skupiny. Nejsou-li ve vzorcích z těchto skupin zjištěny žádné neuropatologické změny, není nutné provádět další analýzu. Jsou-li zjištěny ve skupině s vysokou dávkou neuropatologické změny, je třeba následně okódotovat a vyšetřit vzorky ze všech potenciálně zasažených tkání ze skupin se střední a nízkou dávkou.

Pokud je během kvalitativního vyšetření zjištěna přítomnost neuropatologických změn, provede se druhé vyšetření všech oblastí nervového systému, které vykazují tyto změny. Okódují se řezy ze všech dávkových skupin ze všech potenciálně zasažených oblastí a vyšetří v náhodném pořadí bez znalosti kódu. Zaznamená se četnost a závažnost všech lézí. Po zhodnocení všech oblastí ze všech dávkových skupin se kód odkryje a provede se statistická analýza za účelem vyhodnocení vztahu dávka-odezva. U každé léze se popíše příklady různých stupňů závažnosti.

Neuropatologické výsledky se vyhodnotí v souvislosti s pozorováním a měřením chování a rovněž spolu s dalšími údaji z předchozích a souběžných studií systémové toxicity zkoušené látky.

2. ÚDAJE

2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se jednotlivá data, která se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou experimentální nebo kontrolní skupinu uvede počet zvířat na začátku zkoušky, počet zvířat uhynulých v průběhu zkoušky nebo počet zvířat usmrčených z humánních důvodů a doba uhynutí nebo humánního usmrcení, počet zvířat vykazujících příznaky toxicity, popis zjištěných příznaků toxicity, včetně doby nástupu, trvání, typu a závažnosti jakýchkoliv příznaků toxicity, počet zvířat vykazujících léze, včetně typu a závažnosti léze (lézí).

▼B

2.2 HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky studie je třeba vyhodnotit z hlediska výskytu, závažnosti a korelace neurobehaviorálních a neuropatologických účinků (rovněž i neurochemických nebo elektrofyziologických účinků, jsou-li provedena doplňující vyšetření) a z hlediska dalších zjištěných nepříznivých účinků. Je-li to možné, je třeba vyhodnotit číselné výsledky vhodnými a obecně uznávanými statistickými metodami. Statistické metody je třeba zvolit během plánování studie.

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Zkoušená látka:

- fyzikální vlastnosti (včetně isomerie, čistoty a fyzikálně-chemických vlastností),
- identifikační údaje.

Vehikulum (je-li použito):

- zdůvodnění výběru vehikula.

Pokusná zvířata:

- použitý druh/kmen,
- počet, stáří a pohlaví zvířat,
- původ, podmínky chovu, aklimatizace, potrava atd.,
- hmotnost jednotlivých zvířat na začátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o úpravě směsi zkoušené látky či přípravě potravy, dosažené koncentraci, stabilitě a homogenitě přípravku,
- specifikace aplikovaných dávek, včetně podrobností o vehikulu, objemu a fyzikální formě aplikovaného materiálu,
- podrobnosti o způsobu podávání zkoušené látky,
- zdůvodnění výběru úrovně dávky,
- zdůvodnění způsobu aplikace a trvání expozice,
- přepočítání koncentrace zkoušené látky v potravě nebo pitné vodě (ppm) na skutečnou denní dávku v mg/kg tělesné hmotnosti,
- podrobnosti o potravě a kvalitě vody.

Pozorovací a zkušební postupy:

- podrobnosti o přiřazení zvířat z jednotlivých skupin do podskupin s perfuzí,
- podrobnosti o systémech hodnocení, včetně kritérií a hodnotících stupnic pro jednotlivá měření v rámci podrobných klinických pozorování,

▼ B

- podrobnosti o funkčních zkouškách pro měření reakce na různé smyslové podněty (např. sluchové, zrakové a hmatové), pro měření síly úchopu končetiny, motorické aktivity (včetně podrobností o automatických zařízeních pro zjišťování aktivity) a další použité postupy,
- podrobnosti o oftalmologických vyšetřeních, hematologických a klinických biochemických zkouškách s příslušnými výchozími (normálními) hodnotami,
- podrobnosti o specifických neurobehaviorálních, neuropatologických, neurochemických nebo elektrofyziologických postupech.

Výsledky:

- tělesná hmotnost a její změny, včetně tělesné hmotnosti v době usmrcení,
- spotřeba potravy a případně vody,
- údaje o toxických reakcích podle pohlaví a úrovně dávek, včetně popisu příznaků toxicity nebo úmrtnosti,
- povaha, závažnost a trvání (doba nástupu a následný průběh) podrobných klinických nálezů (zda jsou vratné nebo nevratné),
- podrobný popis všech výsledků funkčních testů,
- pitevní nálezy,
- podrobný popis všech neurobehaviorálních, neuropatologických a neurochemických nebo elektrofyziologických výsledků, jsou-li k dispozici,
- údaje o absorpci a metabolismu, jsou-li k dispozici,
- statistické vyhodnocení výsledků, je-li to možné.

Diskuse o výsledcích:

- informace o závislosti účinku na dávce,
- význam jakýchkoliv dalších toxických účinků pro závěry týkající se neurotoxického potenciálu zkoušené chemické látky,
- dávková úroveň bez pozorovatelných nepříznivých účinků (NOAEL).

Závěry:

- je žádoucí uvést konkrétní vyjádření o celkové neurotoxicitě zkoušené chemické látky.

4. **LITERATURA**

- 1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris. Návrh.
- 2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Návrh.
- 3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- 4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

- 5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999–1003.
- 6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691–704.
- 7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267–283.
- 8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233–236.
- 9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599–609.
- 10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). *Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series*. Raven Press, New York.
- 11) Chang, L.W., ed. (1995). *Principles of Neurotoxicology*. Marcel Dekker, New York.
- 12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689–695.
- 13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343–352.
- 14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Eurotoxicol. Teratol.*, 10, 445–452.
- 15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368–378.
- 16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: *Nervous System Toxicology*. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, s. 299–335.
- 17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, s. 726–742.
- 18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.



Tabulka 1

Minimální počet zvířat na skupinu, provádí-li se studie neurotoxicity samostatně nebo v kombinaci s dalšími studii

	TYP PROVEDENÉ STUDIE NEUROTOXICITY			
	Samostatná studie	Kombinovaná studie s 28denní studií	Kombinovaná studie s 90denní studií	Kombinovaná studie se studií chronické toxicity
Počet zvířat na skupinu	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	15 samců a 15 samic	25 samců a 25 samic
Počet zvířat vybraných k funkčnímu testování, včetně podrobných klinických pozorování	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic	10 samců a 10 samic
Počet zvířat vybraných k perfuzi <i>in situ</i> a neurohistopatologickému vyšetření	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic	5 samců a 5 samic
Počet zvířat vybraných k pozorování toxicity po opakované dávce subchronické/chronické, k hematologickému vyšetření, klinickému biochemickému vyšetření, k histopatologickému vyšetření atd., jak je uvedeno v příslušných doporučeních		5 samců a 5 samic	10 samců ⁽¹⁾ a 10 samic ⁽¹⁾	20 samců ⁽¹⁾ a 20 samic ⁽¹⁾
Případná doplňující pozorování	5 samců a 5 samic			

⁽¹⁾ Zahrnuto je pět zvířat vybraných k funkčnímu testování a podrobnému klinickému pozorování jako součást studie neurotoxicity.



Tabulka 2

Četnost klinických pozorování a funkčních testů

Typ pozorování		Délka studie			
		akutní	28denní	90denní	chronická
U všech zvířat	Celkový zdravotní stav	Denně	Denně	Denně	Denně
	Mortalita/morbidity	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně	Dvakrát denně
U všech zvířat vybraných k funkčním pozorováním	Podrobná klinická pozorování	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — v průběhu 8 hodin po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku — 7. a 14. den po skončení dávkování 	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — poté jednou týdně 	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — jednou během prvního nebo druhého týdne expozice — poté měsíčně 	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — před první expozicí jednou na konci prvního měsíce expozice — poté každé tři měsíce
	Funkční testy	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — v průběhu 8 hodin po podání dávky v době odhadovaného nejvyššího účinku — 7. a 14. den po skončení dávkování 	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — během čtvrtého týdne aplikace co nejbliže ke konci období expozice 	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — jednou během prvního nebo druhého týdne expozice — poté měsíčně 	<ul style="list-style-type: none"> — před první expozicí — před první expozicí jednou na konci prvního měsíce expozice — poté každé tři měsíce

▼ B**B.44 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VIVO*****1. METODA**

Tato zkušební metoda je ekvivalentní testu OECD TG 427 (2004).

1.1 ÚVOD

Expozice mnohým chemickým látkám se děje hlavně cestou přes kůži, zatímco většina toxikologických studií provedených na pokusných zvířatech užívá perorální podání. Perkutánní absorpční studie *in vivo* stanovená tímto návodem skýtá propojení nezbytné pro extrapolaci z perorálních studií na posouzení bezpečnosti po expozicích dermálních.

Látka musí proniknout velkým počtem buněčných vrstev kůže, než se může dostat do krevního oběhu. Vrstvou určující rychlost je pro většinu látek *stratum corneum* (zrohovatělá vrstva) složená z mrtvých buněk. Permeabilita (propustnost) skrz kůži závisí na lipofilítě chemické látky a na tloušťce vnější vrstvy epidermis a také na faktorech, jako je např. molární hmotnost a koncentrace dané látky. Obecně je vrstva kůže potkanů a králíků permeabilnější než kůže lidská, zatímco kůže morčat a opic se kůži lidské podobají více.

Metody měření perkutánní absorpce se dělí do dvou kategorií: *in vivo* a *in vitro*. Metody *in vivo* jsou schopny skýtat dobré informace o absorpci kůží s různými druhy pokusných zvířat. Nedávno byly vyvinuty *in vitro* metody. Ty využívají transport přes plnou či částečnou tloušťku kůže zvířecí či lidské do rezervoáru tekutiny. Metody *in vitro* jsou popsány ve zvláštní metodě zkoušení (1). Doporučuje se brát v úvahu dokument OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2) na pomoc při výběru nejvhodnější metody pro danou situaci, neboť popisuje podrobněji vhodnost metod *in vivo* a *in vitro*.

Metoda *in vivo* zde popsána umožňuje stanovení průniku zkoušené látky kůží do systémových kompartmentů. Tento postup je široce používán mnoho let (3, 4, 5, 6, 7). Ačkoli perkutánní absorpční studie *in vitro* mohou být vhodně v mnoha případech, mohou nastat situace, kdy lze získat potřebné údaje pouze studií provedenou *in vivo*.

Výhodou *in vivo* metody je, že využívá fyziologicky a metabolicky intaktní systém, využívá druhy společné mnoha studiím toxicity a může být modifikována pro použití s jinými druhy. Nevýhodou je využívání živých zvířat, potřeba radioznačených materiálů k usnadnění spolehlivých výsledků, potíže se stanovením časné fáze absorpce a rozdíly v permeabilitě kůže preferovaného druhu (potkan) a kůže lidské. Zvířecí kůže je obecně permeabilnější, a proto může být perkutánní absorpce u člověka nadhodnocena (6, 8, 9). Leptavé/žiravé látky by na živých zvířatech zkoušeny být neměly.

▼ B

1.2 DEFINICE

Neabsorbovaná dávka: množství smyté z povrchu kůže po expozici a množství, které ulpělo na neuzavíracím krytu, včetně množství prokazatelně odtékaného z kůže během expozice.

Absorbovaná dávka (*in vivo*): množství v moči, ve zbytcích v kleci, ve výkalech, ve vydechovaném vzduchu (je-li měřeno), v krvi, v tkáních (jsou-li sbírány) a ve zbývajících částech mrtvých těl po odstranění kůže z místa aplikace.

Absorbovatelná dávka: množství na kůži nebo v kůži po omytí.

1.3 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební látka, nejlépe radioaktivně značená, se aplikuje na zvířecí kůži zbavenou srsti na jedné nebo více vhodných úrovních dávky ve formě reprezentativní pro užívání přípravku. Zkoušený přípravek se ponechá ve styku s kůží po předem určenou dobu pod vhodným krytem (neokluzivním, semiokluzivním či okluzivním), aby nedošlo k požití zkušebního přípravku. Po uplynutí doby expozice se kryt odstraní a kůže se očistí vhodným čisticím činidlem, kryt a čisticí materiály se uchovají pro analýzu a aplikuje se nový kryt. Zvířata jsou držena před expozicí, během ní a po ní v jednotlivých metabolických klecích a jejich exkrementy a vydechovaný vzduch během uvedených období se sbírají pro analýzy. Od sběru vydechovaného vzduchu lze upustit, jsou-li známy dostatečné údaje o tom, že se tvoří jen málo radioaktivních těkavých metabolitů nebo že se netvoří žádné. Každá studie bude obvykle zahrnovat několik skupin zvířat, která budou exponována zkoušenému přípravku. Jedna skupina zvířat bude usmrcena na konci doby expozice. Ostatní skupiny zvířat budou usmrcovány v naplánovaných časových intervalech poté (2). Po uplynutí vzorkovacího období se usmrtí zbývajících zvířat, krev se odebere k analýze, místo aplikace se odebere k analýze a těla se analyzují vzhledem k nevyměšnému materiálu. Vzorky se analyzují vhodnými prostředky a odhadne se míra percutánní absorpce (6, 8, 9).

1.4 POPIS METODY

1.4.1 Výběr druhu zvířat

Nejběžnějším používaným druhem je potkan, ale lze používat rovněž kmeny bez srsti a druhy s rychlostí absorpce kůží podobnější lidským (3, 6, 7, 8, 9). Používána by měla být mladá dospělá zdravá zvířata stejného pohlaví (automaticky voleným pohlavím jsou samci) běžně využívaných pokusných kmenů. Na počátku studie by hmotnostní váhové odchylky zvířat váhy neměly přesáhnout ± 20 % střední hmotnosti. Například jsou vhodné samci potkanů o hmotnosti 200–250 g, zvláště v horní polovině uvedeného rozsahu.

▼ B**1.4.2 Počet a pohlaví zvířat**

Pro každý zkoušený přípravek a každý stanovený konečný čas by měla být použita skupina nejméně čtyř zvířat stejného pohlaví. Každá skupina zvířat bude usmrcena po různých časových intervalech, např. na konci expoziční doby (obvykle 6 nebo 24 hodin) a v následných intervalech (např. 48 a 72 hodin). Pokud dostupné údaje prokazují podstatný rozdíl v dermální toxicitě u samců a samic, mělo by být vybráno citlivější pohlaví. Nejsou-li takové údaje dostupné, lze použít obě pohlaví.

1.4.3 Podmínky útulku a krmení

Teplota v experimentálních zvířecích místnostech by měla být 22 °C (± 3 °C). Ačkoli relativní vlhkost by měla být nejméně 30 % a přednostně by neměla přesáhnout 70 %, kromě doby čištění místností, žádoucí vlhkost je 50–60 %. Osvětlení by mělo být umělé a mělo by se střídát 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Ke krmení může být použita konvenční laboratorní potrava, měla by být volně dostupná spolu s neomezovaným zdrojem pitné vody. Během studie a přednostně rovněž během aklimatizace jsou zvířata držena jednotlivě v metabolických klecích. Protože rozsypaná potrava a rozlitá voda může ohrozit výsledky, měla by být pravděpodobnost takových událostí minimalizována.

1.4.4 Příprava zvířat

Zvířata jsou označena způsobem umožňujícím jejich individuální identifikaci a držena v jejich klecích nejméně pět dnů před zahájením studie, aby se aklimatizovala na laboratorní podmínky.

Po aklimatizačním období a přibližně 24 hodin před aplikací dávek je každé zvíře zbaveno srsti na kůži v oblasti plece a zad. Permeabilita poškozené a nepoškozené kůže se liší a mělo by se předcházet jejímu odření. Po odstranění srsti a přibližně 24 hodin před aplikací zkoušené látky na kůži (viz bod 1.4.7) by kůže měla být zbavena kožního tuku omytím acetonem. Nedoporučuje se další omytí mýdlem a vodou, protože zbytky mýdla by mohly podpořit absorpci zkoušené látky kůží. Dotyčná oblast musí být dostatečně velká, přednostně nejméně 10 cm², aby bylo možno spolehlivě vypočítat absorbované množství zkoušené chemické látky na cm². Takto velkou plocha mají potkani o tělesné hmotnosti 200–250 g. Po přípravě jsou zvířata vrácena do metabolických klecí.

1.4.5 Zkoušená látka

Zkoušená látka je entita, jejíž penetrační vlastnosti mají být zjištěny. V ideálním případě by zkoušená látka měla být radioaktivně značena.

1.4.6 Zkoušený přípravek

Zkoušený látkový přípravek (např. čistý, zředěný, nebo přísadami doplněný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku, která je aplikována na kůži) by měl být stejný jako přípravek, kterému lidé nebo jiné potenciálně cílové druhy mohou být exponováni (nebo by měl být jeho realistickou náhražkou). Jakákoli odchylka od užívaného přípravku musí být zdůvodněna. Je-li to nutné, je zkoušená látka rozpuštěna nebo suspendována ve vhodném vehikulu. Pro jiné vehikulum než voda by měly být známy charakteristiky jeho absorpce a potenciální interakce se zkoušenou látkou.

▼B**1.4.7 Aplikace na kůži**

Na povrchu kůže je definováno místo aplikace se specifickou velikostí povrchu. Na toto místo je rovnoměrně naneseno známé množství zkoušeného přípravku. Toto množství by normálně mělo imitovat potenciální expozici člověka, obvykle 1–5 mg/cm² pro tuhé látky a až 10 μl/cm² pro kapaliny. Jiná množství by měla být zdůvodněna předpokládanými podmínkami použití, cíli studie nebo fyzikálními vlastnostmi zkoušeného přípravku. Po aplikaci musí být aplikační místo chráněno před setřením. Příklad obvyklého opatření je na obrázku 1. Obvykle je aplikační místo chráněno neuzavřeným krytem (např. překrytím permeabilní nylonovou gázou). Avšak pro neurčité aplikace by aplikační místo mělo být uzavřeno. V případě, že vypařování polotěkavých zkoušených látek snižuje podíl znovuzachycené zkoušené látky až na nepřijatelný rozsah (viz též bod 1.4.10, první odstavec), je nutné zachycovat vypařovanou látku na filtru z aktivního uhlí kryjícím aplikační zařízení (viz obrázek 1). Důležité je, aby žádné aplikační zařízení nepoškozovalo kůži, neabsorbovalo zkoušený přípravek, ani s ním nereagovalo. Zvířata jsou vrácena do jednotlivých metabolických klecí ke sběru exkrementů.

1.4.8 Doba trvání expozice a vzorkování

Doba trvání expozice (expoziční doba) je časový interval mezi aplikací a odstraněním zkoušeného přípravku omytím kůže. Relevantní expoziční doby (obvykle 6 až 24 hodin) by měly být stanoveny na základě předpokládané doby expozice člověka. Po expoziční dobu jsou zvířata držena v metabolických klecích až do stanoveného ukončení. Zvířata by měla být v pravidelných intervalech po celou dobu trvání studie pozorována, zda nevykazují příznaky toxicity/abnormálních reakcí. Na konci expoziční doby by exponovaná kůže měla být prohlédnuta ke zjištění viditelných příznaků dráždění.

Metabolické klece by měly umožnit separovaný sběr moči a výkalů během studie. Rovněž by měly umožnit sběr oxidu uhličitého s ¹⁴C-uhlíkem a těkavé organické sloučeniny s ¹⁴C-uhlíkem, které by měly být analyzovány, jestliže jich vzniká množství > 5 %. Moč, výkaly a zachycené plyny (např. oxid uhličitý s ¹⁴C a těkavé organické sloučeniny s ¹⁴C) by měly být odděleně sbírány pro každou skupinu v každém vzorkovacím čase. Pokud je dostatečně známo, že vzniká málo těkavých radioaktivních metabolitů nebo nevznikají žádné, lze použít otevřené klece.

Exkrementy jsou sbírány během expoziční doby, až 24 hodin od počátečního styku s kůží, a potom denně až do ukončení experimentu. Ačkoliv normálně postačí tři intervaly sběru exkrementů, z předpokládaného použití zkoušeného přípravku nebo ze známých kinetických údajů mohou vyplnout vhodnější nebo dodatečné časy sběru exkrementů pro studii.

Po uplynutí expoziční doby je ochranný kryt odstraněn z každého zvířete a uchován pro analýzu odděleně. Exponovaná kůže všech zvířat by měla být omyta nejméně třikrát čisticím činidlem užitím vhodných tamponů. Pečlivě je nutno dbát na to, aby se vyloučila kontaminace jiných částí těla. Čisticí činidlo by mělo představovat obvyklou hygienickou praxi, např. vodný roztok mýdla. Nakonec by měla být kůže vysušena. Veškeré tampony a mycí činidla by měla být zachována pro analýzu. Před vrácením do jednotlivých klecí by měla být exponovaná místa zvířat, která budou zachována pro pozdější pozorování, chráněna čerstvým krytem.

▼B**1.4.9 Terminální postupy**

V každé skupině budou jednotlivá zvířata usmrcována v plánovaných časových intervalech a krev sbírána k analýze. Ochranný kryt nebo zařízení by mělo být odebráno k analýze. Kůže z aplikačního místa a podobná neexponovaná oblast kůže zbavené srsti by měla být odebrána ke zvláštní analýze z každého zvířete. Kůže z aplikačního místa může být rozdělena oddělením *stratum corneum* od podložní epidermis ke zjištění více údajů o distribuci zkoušené chemické látky. Stanovení časové závislosti této distribuce po expoziční době by mělo poskytnout určité údaje o osudu zkoušené chemické látky v *stratum corneum*. Rozdělení kůže (po posledním omytí kůže a usmrcení zvířete) je usnadněno sejmutím všech ochranných krytů. Kůže z aplikačního místa spolu s prstencem okolní kůže je vyříznuta z potkana a přišpendlena na desku. Na povrch kůže se jemně přitlačí lepící páska a tato páska se sejme spolu s částí *stratum corneum*. Stejně se použijí další pásky až do stavu, kdy se páska na kůži již nelepí a *stratum corneum* je úplně odstraněno. Pro každé zvíře jsou všechny pásky společně dány do stejného obalu, kam je přidáno digestivum solubilizující *stratum corneum*. Před analýzou absorbované dávky ve zbylém těle z něj lze vyjmout jakoukoli potenciálně cílovou tkáň. Těla jednotlivých zvířat by měla být zachována pro analýzu. Obvykle postačí analýza celkového obsahu. Cílové orgány lze vyjmát pro zvláštní analýzu (pokud tak indikují další studie). Moč z měchýře v plánované době usmrcení by měla být přidána k moči sebrané dříve. Po sběru exkrementů z metabolických klecí v plánovaném době usmrcení by klece a jejich filtry měly být omyty vhodným rozpouštědlem. Podobně by měla být analyzována i další potenciálně kontaminovaná zařízení.

1.4.10 Analýza

Ve všech studiích by mělo být dosaženo dostatečného znovuzáchyty (výťažku) (tj. střední hodnoty 100 ± 10 % radioaktivity). Znovuzáchyty mimo tento rozsah musí být zdůvodněny. Množství podané dávky v každém vzorku musí být analyzováno vhodně validovaným postupem.

Statistické hodnocení by mělo zahrnout míru rozptylu opakovaných měření pro každou aplikaci.

2. ÚDAJE

Pro každé zvíře v každém vzorkovacím čase by pro zkoušenou chemickou látku a/nebo metabolity měla být provedena následující měření. Kromě jednotlivých údajů by měly být hlášeny střední hodnoty dat seskupených podle vzorkovacích časů:

— množství spojené s ochrannými prostředky,

— množství, které lze uvolnit z kůže,

— množství na kůži či v kůži, které nelze z kůže smýt,

▼ B

- množství ve vzorcích krve,
- množství v exkrementech a vydechovaném vzduchu (je-li to relevantní),
- množství v těle a v orgánech odebraných pro zvláštní analýzy.

Množství zkoušené chemické látky a/nebo metabolity v exkrementech, ve vydechovaném vzduchu, v krvi a v těle umožní stanovení celkového absorbovaného množství v každém vzorkovacím čase. Rovněž lze vyčíslit měrné množství zkoušené chemické látky absorbované jedním cm^2 kůže exponované zkoušené látce během expoziční doby.

3. **ZPRÁVY**

3.1 ZKUŠEBNÍ PROTOKOL

Zkušební protokol musí zahrnout požadavky stanovené protokolem, včetně zdůvodnění použitého zkušebního systému, a měl by obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

- identifikační údaje (např. číslo CAS, je-li známo; zdroj; čistota (radiochemická čistota); známé nečistoty; číslo šarže),
- fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti (např. pH, těkavost, rozpustnost, stabilita, molární hmotnost a rozdělovací koeficient $\log P_{ow}$).

Zkoušený přípravek:

- složení a zdůvodnění použití,
- podrobnosti o zkušebním přípravku, aplikované množství, dosažená koncentrace, vehikulum, stabilita a homogenita.

Pokusná zvířata:

- použitý druh a kmen,
- počet, věk a stáří zvířat,
- zdroj zvířat, podmínky jejich umístění, krmení, atd.,
- hmotnosti jednotlivých zvířat na počátku zkoušky.

Zkušební podmínky:

- podrobnosti podání zkušebního přípravku (místo aplikace, metody analýz, uzavřený/neuzavřený ochranný kryt, objem, extrakce, detekce),
- podrobnosti o jakosti krmení a vody.

Výsledky:

- všechny známky toxicity,
- tabelované absorpční údaje (vyjádřené jako podíl, množství nebo procentní podíl),

▼B

- celkové znovuzachycené množství v experimentu,
- interpretace výsledků, srovnání s dostupnými údaji o perkutánní absorpci zkoušené sloučeniny.

Rozbor výsledků.

Závěry.

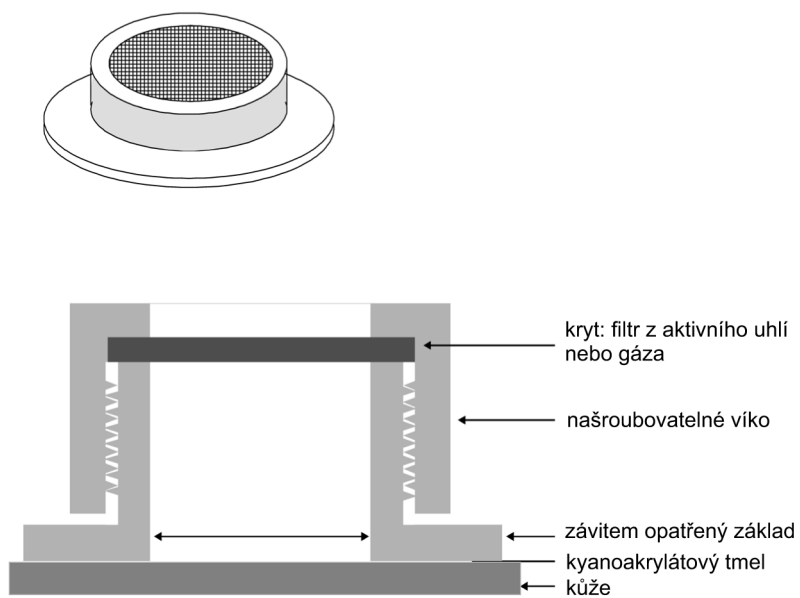
4. LITERATURA

- 1) Zkušební metoda B.45 Absorpce kůží: Metoda *in vitro*.
- 2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- 3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.
- 4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829–835.
- 5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- 6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.
- 7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.
- 8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369–373.
- 9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399–404.

▼B

Obrázek 1

Příklad konstrukce typického zařízení k definování a ochraně místa dermální aplikace během studie perkutánní absorpce



▼B**B.45 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA *IN VITRO*****1. METODA**

Tato zkušební metoda je rovnocenná testu OECD TG 428 (2004).

1.1 ÚVOD

Tato metoda byla určena ke zjištění informací o absorpci zkoušených látek aplikované na vyříznutou kůži. Může být buď kombinována s metodou Absorpce kůží: metoda *in vivo* (1), nebo může být provedena samostatně. Při návrhu studií založených na této metodě se doporučuje se konzultovat dokument OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2). Tento metodický dokument byl vypracován pro usnadnění výběru vhodných postupů *in vitro* pro specifické podmínky v zájmu zajištění spolehlivosti výsledků získaných touto metodou.

Metody měření absorpce kůží a dermálního přenosu lze dělit do dvou kategorií: *in vivo* a *in vitro*. Metody *in vivo* pro absorpci kůží jsou dobře zavedeny a poskytují farmakokinetické údaje o širokém spektru živočišných druhů. Metoda *in vivo* je samostatně popsána v jiné zkušební metodě (1). Metody *in vitro* jsou používány k měření absorpce kůží po mnoho let. Ačkoli formální validační studie metod *in vitro*, na něž se vztahuje tato zkušební metoda, provedeny nebyly, odborníci OECD se shodli v roce 1999 na tom, že existovaly dostatečné údaje, které byly vyhodnoceny tak, že hovoří ve prospěch této metody *in vitro* (3). Další podrobnosti, které dokládají tuto podporu, včetně značného počtu přímých porovnání metod *in vitro* a *in vivo*, jsou uvedeny v metodickém dokumentu OECD Guidance Document (2). Těto problematice se věnuje řada monografií, které uvádějí také podrobné základy pro využívání metod *in vitro* (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Metody *in vitro* umožňují měřit difuzi chemických látek do kůže a přes kůži do rezervoáru tekutiny a mohou využívat neživotoschopnou kůži k měření samotné difuze, anebo čerstvou, metabolicky aktivní kůži k současnému měření difuze a kožního metabolismu. Tyto metody našly zvláštní použití při porovnávání přenosu chemických látek do kůže a přes kůži z různých směsí a mohou rovněž skýtat užitečné modely pro posuzování percutánní absorpce u člověka.

Metody *in vitro* nemusejí být použitelné za všech situací a pro všechny třídy chemických látek. Zkušební metody *in vitro* lze využívat pro počáteční kvalitativní vyhodnocení pronikání kůží. V určitých případech může být nutné poté zjistit údaje *in vivo*. Při dalším rozpracování otázky okolností, za kterých by byly vhodné *in vitro* metody, by měl být brán v úvahu metodický dokument (2). Dodatečné podrobné údaje na podporu rozhodnutí jsou uvedeny v (3).

Tato metoda uvádí obecné zásady měření absorpce kůží a dermálního přenosu zkoušené látky užitím vyříznuté kůže. Lze použít kůži z mnoha savčích druhů, včetně kůže lidské. Permeabilní vlastnosti kůže jsou po jejím vyříznutí z těla zachovány, neboť hlavní bariéru pro difuzi představuje neživá rohová vrstva *stratum corneum*; aktivní přenos chemických látek kůží nebyl zjištěn. Byla prokázána schopnost kůže metabolizovat určité chemické látky během percutánní absorpce (6), ale tento proces není určující, pokud jde o rozsah skutečně absorbované dávky, ačkoli může ovlivnit povahu materiálu vstupujícího do krevního řečiště.

▼ B

1.2 DEFINICE

Neabsorbovaná dávka: množství smyté z povrchu kůže po expozici a množství, které ulpělo na neuzavíracím krytu, včetně množství prokazatelně odtékané z kůže během expozice.

Absorbovaná dávka (*in vitro*): hmotnost zkušební látky proniklé do recepční tekutiny nebo do systémovém oběhu během určitého časového období.

Absorbovatelná dávka (*in vitro*): množství na kůži nebo v kůži po omytí.

1.3 PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Zkušební látka, která může být označena radioaktivním izotopem, je aplikována na povrch vzorku kůže oddělující dvě komory difusní cely. Dotyčná chemická látka zůstává na kůži určitou dobu za stanovených podmínek před jejím odstraněním vhodným čisticím postupem. Recepční tekutina je vzorkována ve vhodných časových intervalech během experimentu a analyzována na obsah zkoušené chemické látky a/nebo metabolitů.

Jsou-li použity metabolicky aktivní systémy, mohou být vhodnými metodami analyzovány metabolity zkoušené chemické látky. Po skončení experimentu je případně kvantifikována distribuce zkoušené chemické látky a jejich metabolitů.

Za vhodných podmínek, které jsou popsány v této metodě a v metodickém dokumentu (2), je měřena absorpce zkoušené látky během dané doby analýzou recepční tekutiny a exponované kůže. Zkoušená látka zbývající v kůži by měla být pokládána za absorbovanou, nelze-li prokázat, že absorpci lze stanovit z hodnot recepční tekutiny samotné. Analýza dalších složek (materiálu omytého z kůže a materiálu, který zůstal ve vrstvách kůže) umožňuje další vyhodnocení údajů, včetně celkové distribuce zkušební látky a procentní podíl znovuzáchyty.

V zájmu prokázání funkčnosti a spolehlivosti zkušebního systému v provádějící laboratoři by měly být dostupné výsledky pro relevantní referenční látky v souladu s publikovanými výsledky pro použitou metodu. Tento požadavek by mohl být splněn zkoušením vhodných referenčních látek (přednostně s lipofilitou blízkou zkoušené látce) souběžně se zkoušenou látkou nebo poskytnutím dostatečných stávajících výsledků pro řadu referenčních látek různé lipofility (např. kofein, kyselina benzoová a testosteron).

1.4 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.4.1 Difusní cela

Difusní cela se skládá z donorové komory a recepční komory, mezi nimiž je umístěna kůže (příklad obvyklé konstrukce je uveden na obrázku 1). Cela by měla zajistit dobré utěsnění okolo kůže, umožňovat snadné vzorkování a dobré promíchávání recepčního roztoku ve styku se spodní vrstvou kůže a dobrou regulaci teploty cely a jejího obsahu. Přijatelné jsou jak statické, tak průtočné difusní cely. Obvykle je ponechána donorová cela neuzavřená během expozice konečné dávce zkušebního preparátu. Avšak pro neurčité aplikace a určité scénáře pro konečnou dávku může být donorová cela uzavřena.

▼ B**1.4.2 Receptní tekutina**

Přednost se dává používání fyziologicky příznivých receptních tekutin, ačkoliv lze používat i jiné, je-li to odůvodněné. Přesné složení receptní tekutiny by mělo být uvedeno. Měla by být prokázána dostatečná rozpustnost zkoušené chemické látky v receptní tekutině tak, aby netvořily překážku absorpce. Navíc by receptní tekutina neměla poškozovat kožní preparát. V průtočném systému nesmí rychlost toku brzdít difuzi zkoušené látky do receptní tekutiny. V systémech statické cely by kapalina měla být neustále míchána a pravidelně vzorkována. Je-li studován metabolismus, musí receptní tekutina během experimentu podporovat životaschopnost kůže.

1.4.3 Kožní preparáty

Lze používat kůži z lidských a zvířecích zdrojů. Zohledňuje se, že používání lidské kůže podléhá vnitrostátním a mezinárodním etickým ohledům a podmínkám. Ačkoli je preferována životaschopná kůže, lze též použít kůži neživou za předpokladu, že lze prokázat její neporušenost. Přijatelné jsou buď epidermální membrány (separované enzymaticky, teplem nebo chemicky) nebo kůže s rozštěpenou tloušťkou (štěpený kožní transplantát) (obvykle s tloušťkou 200–400 µm) připravené za použití dermatomu. Plná tloušťka kůže může být použita, ale nadměrná tloušťka (přibližně > 1 mm) by měla být vyloučena, pokud není konkrétně žádoucí pro stanovení zkoušené chemické látky ve vrstvách kůže. Výběr druhů, anatomického místa a postupu preparace musí být zdůvodněn. Požadovány jsou přijatelné údaje nejméně ze čtyř opakování s jedním zkušebním preparátem.

1.4.4 Neporušenost kožního preparátu

Je nutné, aby kůže byla řádně preparována. Nevhodná manipulace s kůží může vést k poškození vrstvy *stratum corneum*, proto musí být neporušenost kožního preparátu kontrolována. Je-li zkoumán kožní metabolismus, měla by čerstvě vyříznutá kůže být použita co nejdříve a za podmínek známých jako příznivé pro metabolickou činnost. Obecně se doporučuje čerstvě vyříznutou kůži použít do 24 hodin, avšak přijatelná skladovací doba se může lišit v závislosti na enzymovém systému zapojeném do metabolizace a na teplotě skladování (13). Jsou-li kožní preparáty před použitím skladovány, měly by být uvedeny důkazy o zachování jejich bariérové funkčnosti.

1.4.5 Zkoušená chemická látka

Zkoušená látka je entita, jejíž schopnosti pronikání mají být studovány. V ideálním případě by měla být označena radioaktivním izotopem.

1.4.6 Zkoušený přípravek

Přípravek zkušební látky (např. čistý, zředěný nebo přísadami doplněný materiál obsahující zkoušenou chemickou látku která je aplikována na kůži) by měl být stejný jako přípravek, kterému lidé nebo jiné potenciálně cílové druhy mohou být exponováni (nebo by měl být jeho realistickou náhražkou). Jakákoli odchylka od užívaného přípravku musí být zdůvodněna.

▼ B**1.4.7 Koncentrace a přípravky zkoušené látky**

Obvykle je použita více než jedna koncentrace zkoušené látky zahrnující maximální potenciální expozice člověka. Podobně by mělo být uváženo zkoušení určitého spektra skladby obvyklých přípravků.

1.4.8 Aplikace na kůži

Za běžných podmínek expozice lidí chemickým látkám se obvykle setkáváme s konečnými dávkami. Proto by mělo být aplikováno množství, které imituje expozici člověka, obvykle 1–5 mg/cm² kůže pro tuhé látky a až 10 µl/cm² pro kapaliny. Aplikované množství by mělo být zdůvodněno předpokládanými podmínkami použití, cíli studie nebo fyzikálními vlastnostmi zkoušeného přípravku. Např. aplikace na povrch kůže může být neurčitá, jsou-li aplikovány velké objemy na jednotku plochy.

1.4.9 Teplota

Pasivní difuze chemických látek (a tudíž i jejich absorpce kůží) závisí na teplotě. Difusní komora a kůže by měly být udržovány při konstantní teplotě blízké normální teplotě kůže okolo 32 ± 1 °C. Různé konstrukce cely budou vyžadovat různou vodní lázeň nebo teplotu vyhřívání bloků k zajištění toho, aby byl dotyčný receptor kůže temperován na svůj fyziologický standard. Vlhkost by měla být přednostně v rozmezí 30 až 70 %.

1.4.10 Doba trvání expozice a vzorkování

Expozice kůže zkoušenému přípravku může trvat po celou dobu experimentu nebo po kratší doby (tj. může imitovat specifické typy lidské expozice). Kůže by měla být omytím zbavena nadbytku zkušebního preparátu relevantním čistícím činidlem a tato činidla by měla být sebrána pro účely analýzy. Tyto postupy očištění od zkoušeného přípravku závisí na předpokládaných podmínkách použití a měly by být zdůvodněny. Obvykle se požaduje doba vzorkování 24 hodin, aby bylo možno dostatečně charakterizovat absorpční profil. Doba vzorkování by za normálních okolností neměla přesáhnout 24 hodin, neboť po této době se neporušenost kůže může začít horšit. V případě zkoušených látek rychle pronikající kůží to nemusí být nutné, v případě látek pronikajících kůží pomalu však není vyloučena nutnost delších dob. Frekvence vzorkování receptorů tekutiny by měla umožnit grafickou prezentaci absorpčního profilu zkoušené látky.

1.4.11 Terminální postupy

Všechny složky zkušebního systému by měly být analyzovány a měl by být stanoven výtěžek znovuzáchyty. To zahrnuje donorovu komoru, oplachy povrchu kůže, kožní preparát a receptorní tekutinu/-komoru. V některých případech může být kůže frakcionována na exponovaný povrch kůže a povrch kůže pod přírubou cely a na frakce vrstvy *stratum corneum*, epidermis a dermis k odděleným analýzám.

1.4.12 Analýza

Ve všech studiích by mělo být dosaženo dostatečného znovuzáchyty (cílem by mělo být dosažení střední hodnoty 100 ± 10 % radioaktivity). Množství zkoušené látky v receptorové tekutině, v kožním preparátu, ve zbytcích po očištění povrchu kůže a oplachu aparatury by měly být analyzováno vhodným postupem.

▼ B**2. ÚDAJE**

Prezentovány by měly být údaje o analýze receptorové tekutiny, distribuci zkoušené chemické látky a časové závislosti absorpčního profilu. Pro podmínky expozice konečnou dávkou by mělo být vypočteno množství omyté z kůže, množství spojené s kůží (a v různých vrstvách kůže, je-li analyzováno) a množství obsažené v recepci tekutině (podíl a množství nebo procentní podíl aplikované dávky). Absorpce kůží může být v některých případech vyjádřena pouze užitím údajů o recepci tekutině. Zůstává-li však zkoušená látka v kůži při skončení studie, může být nutné toto množství zahrnout do celkového absorbovaného množství (viz odkaz na literaturu 3, odstavec 66). Pro podmínky expozice neurčitou dávkou mohou údaje umožnit výpočet permeabilní konstanty (K_p). Za těchto podmínek není absorbovaný procentní podíl relevantní.

3. ZPRÁVY**3.1 ZKUŠEBNÍ PROTOKOL**

Zkušební protokol musí zahrnout požadavky stanovené protokolem, včetně zdůvodnění použitého zkušebního systému, a měl by obsahovat:

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti (přínejmenším molární hmotnost a rozdělovací koeficient $\log P_{ow}$), čistota (radiochemická čistota),
- identifikační údaje (např. číslo šarže),
- rozpustnost v recepci tekutině.

Zkoušený přípravek:

- složení a zdůvodnění použití,
- homogenita.

Zkušební podmínky:

- zdroj a místo kůže, metoda preparace, podmínky skladování před použitím, všechny předúpravy (čištění, antibiotické ošetření atd.), zjišťování neporušenosti kůže, metabolický status, zdůvodnění použití,
- konstrukce cely, složení recepci tekutiny, rychlost toku recepci tekutiny nebo doby a postupy vzorkování,
- podrobnosti aplikace zkoušeného přípravku a kvantifikace aplikované dávky,
- doba expozice,
- podrobnosti odstranění zkoušeného přípravku z kůže, např. oplachem kůže,
- podrobnosti analýzy kůže a frakcionačních postupů použitých ke zjištění distribuce v kůži,

▼B

- postupy mytí cely a zařízení,
- metody stanovení, extrakční postupy, meze detekce a validace analytických metod.

Výsledky:

- celkový znovuzáchyť experimentu (aplikovaná dávka = obsah v mycích činidlech z kůže + obsah v kůži + obsah v receptní tekutině + obsah v mycích činidlech cely),
- tabelované výsledné znovuzáchyty jednotlivých cel v každém kompartmentu,
- absorpční profil,
- tabelované absorpční údaje (vyjádřené jako podíl, množství nebo procentní podíl).

Rozbor výsledků.

Závěry.

4. LITERATURA

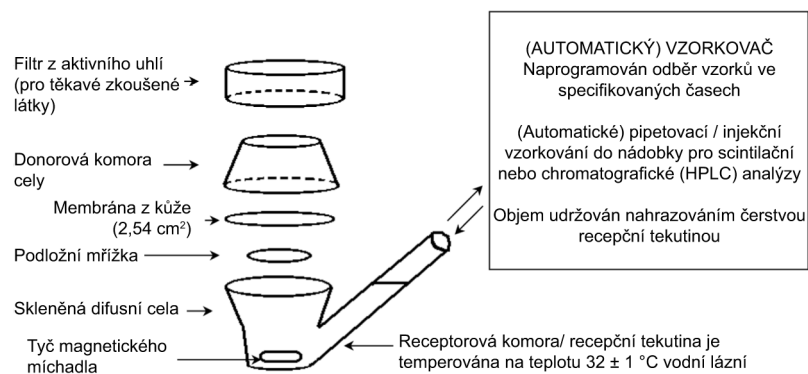
- 1) Zkušební metoda B.44 Absorpce kůží: metoda *in vivo*.
- 2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- 3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.
- 4) Kempainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- 5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, s. 237–241.
- 6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- 7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- 8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191–205.
- 9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- 10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼ **B**

- 11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.
- 12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- 13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356–365.

Obrázek 1

Příklad obvyklé konstrukce statické difusní cely pro studie perkutánní absorpce *in vitro*



▼ **M1****B.46 DRÁŽDĚNÍ KŮŽE *IN VITRO*: ZKOUŠKA POMOCÍ MODELU REKONSTRUOVANÉ LIDSKÉ EPIDERMIS****1. METODA****1.1 ÚVOD**

Dráždění kůže znamená tvorbu reverzibilního poškození kůže po použití zkoušené látky v délce 4 hodin (jak ji definuje globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (OSN) (GHS)) (1). Tato zkušební metoda poskytuje postup *in vitro*, který v závislosti na informačních požadavcích může povolovat stanovení dráždivých účinků látek na kůži jakožto samostatná náhradní zkouška v rámci strategie zkoušení v přístupu založeném na vážení důkazů (2).

Hodnocení dráždění kůže typicky zahrnovalo používání laboratorních zvířat (viz metoda B.4) (3). V souvislosti s ohledy na dobré zacházení se zvířaty metoda B.4 umožňuje stanovit poleptání/dráždění kůže uplatněním strategie postupného zkoušení, použitím validovaných metod *in vitro* a *ex vivo*, což vylučuje bolest a utrpení zvířat. Tři validované zkušební metody *in vitro* nebo zkušební pokyny B.40, B.40a a TG 435 (4, 5, 6) jsou užitečné pro tu část strategie postupného zkoušení B.4, jež se týká poleptání.

Tato zkušební metoda je založena na modelech rekonstruované lidské epidermis, které svým celkovým uspořádáním (použitím keratinocytů získaných z lidské epidermis jakožto zdroje buněk, reprezentativní tkáně a cytoarchitektury) věrně napodobují biochemické a fyziologické vlastnosti svrchních částí lidské kůže, tj. epidermis. Postup popsaný podle této zkušební metody dovoluje rozpoznat nebezpečí dráždivých látek v souladu s kategorií 2 GHS OSN. Tato zkušební metoda rovněž zahrnuje množinu standardů chování pro hodnocení podobných a modifikovaných zkušebních metod založených na rekonstruované lidské epidermis (7).

Pro dvě zkušební metody *in vitro* (8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17), komerčně dostupné jako EpiSkin™ a EpiDerm™, které používají modely rekonstruované lidské epidermis, byly dokončeny prevalidační, optimalizační a validační studie. Tyto odkazy byly založeny na větě označující rizikovost R38. Některými aspekty přepočtu pro účely GHS se zabývá v rámci použité literatury odkaz 25. Metody, u nichž chování odpovídá EpiSkin™ (validovaná referenční metoda 1), jsou doporučeny jakožto samostatná náhradní zkušební metoda pro zkoušku na králících *in vivo*, která slouží ke klasifikaci dráždivých látek kategorie 2 GHS. Metody, u nichž chování odpovídá EpiDerm™ (validovaná referenční metoda 2), jsou doporučeny pouze jako rozřaďovací zkušební metoda nebo jako součást strategie postupného zkoušení u přístupu založeného na vážení důkazů pro klasifikaci dráždivých látek kategorie 2 GHS. Předtím, než lze pro regulační účely použít navrhovanou zkoušku s modelem rekonstruované lidské epidermis *in vitro* k podráždění kůže, je zapotřebí stanovit její spolehlivost, relevanci (přesnost) a omezení vztahující se na její navrhované použití, aby se zajistila její srovnatelnost s uvedenými parametry validované referenční metody 1 v souladu se standardy chování stanovenými v této zkušební metodě (dodatek).

▼ **M1**

V souladu s požadavky podle této zkušební metody byly validovány dvě další zkušební metody s rekonstruovanou lidskou epidermis *in vitro* a vykazují podobné výsledky jako validovaná referenční metoda 1 (18). Jsou to modifikovaná zkušební metoda EpiDerm™ (upravená referenční metoda 2) a zkušební metoda SkinEthic RHE™ (metoda 1 „me-too“).

1.2 DEFINICE

V rámci této zkušební metody se používají následující definice:

Přesnost: Blížkost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to míra chování zkušební metody a jeden aspekt relevance. Termín se často používá zaměnitelně za „shodu“, čímž se má na mysli podíl správných výsledků zkušební metody.

Kontrolní látka šarže: Srovnávací látka vyvolávající u tkáně odezvu životaschopnosti buněk středního rozsahu.

Životaschopnost buněk: Parametr měřící celkovou aktivitu buněčné populace, např. jako schopnost buněčných mitochondriálních dehydrogenáz redukovat vitální barvivo MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř), které v závislosti na naměřeném cílovém bodu a použitém designu zkoušky koreluje s celkovým počtem nebo vitalitou živých buněk.

ET₅₀: Doba expozice požadovaná pro snížení životaschopnosti buněk o 50 % po nasazení látky markeru ve specifikované pevné koncentraci, viz rovněž IC₅₀.

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně identifikovaných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden ukazatel chování zkušební metody.

Míra falešné pozitivity: Podíl všech negativních (neúčinných) látek, které jsou falešně identifikovány jako pozitivní. Je to jeden ukazatel chování zkušební metody.

Nekonečná dávka: Množství zkušební látky nanesené na kůži, které přesahuje množství požadované pro úplné a rovnoměrné pokrytí povrchu kůže.

GHS (globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): Systém navrhuje klasifikaci látek a směsí podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních nebezpečí a řešící příslušné komunikační prvky, jako jsou piktogramy, signální slova, výroky o nebezpečí, výroky o bezpečnostních opatřeních a bezpečnostní datové listy, které obsahují informace o jejich nežádoucích účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, dělníků, přepravců, spotřebitelů a osob reagujících na havárie) a životního prostředí (1); tento systém je v EU proveden nařízením (ES) č. 1272/2008.

IC₅₀: Koncentrace, při níž látka markeru snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené době expozice, viz rovněž ET₅₀.

▼ **M1**

Standardy chování: Standardy založené na validované referenční metodě, které slouží jako základna pro vyhodnocení srovnatelnosti navrhované zkušební metody, jež je mechanicky a funkčně podobná. Mezi ně patří I) zásadně důležité složky zkušební metody, II) minimální seznam referenčních látek vybraných z látek používaných k prokázání přijatelného chování validované referenční metody a III) srovnatelné hladiny přesnosti a spolehlivosti založené na tom, co bylo získáno pro validovanou referenční metodu, které by navrhovaná zkušební metoda měla prokázat při vyhodnocení za použití minimálního seznamu referenčních látek.

Spolehlivost: Měří rozsah, v němž lze provádět zkušební metodu reprodukovatelně v rámci laboratoří a mezi nimi navzájem po danou dobu, přičemž se metoda provádí s využitím stejného protokolu. Vyhodnocuje se na základě výpočtu vnitrolaboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti.

Citlivost: Podíl všech pozitivních/účinných látek, které jsou správně klasifikovány zkouškou. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody.

Specifičnost: Podíl všech negativních/neúčinných látek, které jsou správně zkouškou klasifikovány. Je to měřítko přesnosti zkušební metody, která dává kategorické výsledky, a je důležitým prvkem při hodnocení relevance zkušební metody.

Dráždění kůže: Tvorba reverzibilního poškození kůže po použití zkoušené látky až po dobu 4 hodin. Dráždění kůže je lokálně vznikající neimunogenní reakce, která se objevuje krátce po stimulaci (24). Její hlavní charakteristikou je reverzibilní proces zahrnující zánětlivé reakce a většinu klinických charakteristických příznaků dráždění (erytém, edém, svědění a bolest) v souvislosti se zánětlivým procesem.

1.3 ROZSAH A OMEZENÍ

Omezení zkoušek rekonstruované lidské epidermis spadajících do této zkušební metody spočívá v tom, že pouze klasifikují látky jako dráždivé pro kůži podle kategorie 2 GHS OSN. Protože nedovolují klasifikaci látek podle volitelné kategorie 3, jak ji definuje GHS OSN, všechny zbývající látky klasifikovány nebudou (bez kategorie). V závislosti na potřebách regulace a na možném budoucím zahrnutí nových cílových bodů, zlepšení nebo vývoji nových zkoušek typu „me-too“ bude možná nutné tuto zkušební metodu revidovat.

Tato zkušební metoda dovoluje rozpoznat nebezpečí dráždivých jednosložkových látek (19), ale neposkytuje adekvátní informace o poleptání kůže. Plyny a aerosoly zkoušet nelze, zatímco směsi dosud nebyly ve validační studii hodnoceny.

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkoušená látka se topicky nanese na trojrozměrný model rekonstruované lidské epidermis obsahující normální lidské epidermální keratinocyty, které byly kultivovány s cílem vytvořit vícevrstevnatý, vysoce diferenciováný model lidské epidermis. Skládá se z organizovaných bazálních, výběžkovitých a granulárních vrstev a vícevrstevnatého stratum corneum, jež obsahuje mezibuněčné lamelární lipidové vrstvy uspořádané do vzorců analogických k těm, které se nachází *in vivo*.

▼ **M1**

Princip zkoušky na modelu rekonstruované lidské epidermis je založen na předpokladu, že dráždivé látky jsou schopny proniknout přes stratum corneum difúzí a že jsou cytotoxické pro buňky v podkladových vrstvách. Životaschopnost buněk se měří přeměnou vitálního barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-2H-tetrazolium-bromid, thiazolylová modř, číslo EINECS 206-069-5, číslo CAS 298-93-1] účinkem dehydrogenázy na sůl modrého formazanu, který se kvantitativně měří po extrakci z tkání (20). Dráždivé látky se identifikují na základě jejich schopnosti snižovat životaschopnost buněk pod definované prahové úrovně (tj. ≤ 50 % pro dráždivé látky kategorie 2 GHS OSN). Látky, které produkují životaschopnosti buněk nad definovanou prahovou hladinu, klasifikovány nebudou (tj. > 50 %, žádná kategorie).

Modelové systémy rekonstruované lidské epidermis lze použít k testování pevných látek, kapalin, polotuhých látek a vosků. Kapaliny mohou být vodné či nevodné, pevné látky mohou být ve vodě rozpustné či nerozpustné. Pevné látky je zapotřebí zkoušet ve formě jemného prášku, bude-li to možné. Protože do validace zkušebních systémů založených na modelu rekonstruované lidské epidermis bylo zahrnuto 58 pečlivě vybraných látek reprezentujících široké spektrum chemických tříd, očekává se, že metody budou obecně použitelné napříč chemickými třídami (16). Validace zahrnuje 13 dráždivých látek kategorie 2 GHS. Je třeba poznamenat, že do validace nebyly zařazeny nežiravé kyseliny, zásady, soli a jiné anorganické látky a nebyly do ní zahrnuty ani některé známé třídy organických dráždivých látek, například hydroperoxydy, fenoly a povrchově aktivní látky, či byly zařazeny jen v omezené míře.

1.5 PROKÁZÁNÍ ODBORNOSTI

Před rutinním používáním validované metody, která se řídí touto zkušební metodou, mohou laboratoře projevit přání prokázat technickou odbornost při použití deseti látek doporučených v tabulce 1. Podle této zkušební metody se volitelná kategorie 3 GHS OSN nepovažuje za kategorii. U originálních podobných zkušebních metod (typu „me-too“) vyvinutých podle této zkušební metody, které jsou strukturálně a funkčně podobné validovaným referenčním metodám, nebo u úprav validovaných metod je zapotřebí použít standardy chování popsané v dodatku k této zkušební metodě pro

prokázání srovnatelné spolehlivosti a přesnosti nové zkušební metody před jejím použitím pro regulační zkoušení.

Tabulka 1

Látky k prokázání odbornosti, které jsou podmnožinou referenčních látek uvedených na seznamu v dodatku

Látka	Číslo CAS	Skóre <i>in vivo</i>	Skupenství	Kategorie GHS
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	0	pevné	žádná kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	0,3	kapalné	žádná kategorie
methyl-stearát	112-61-8	1	pevné	žádná kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	kapalné	volitelná kategorie 3

▼ **M1**

Látka	Číslo CAS	Skóre <i>in vivo</i>	Skupenství	Kategorie GHS
hexyl-salicylát	6259–76–3	2	kapalné	volitelná kategorie 3
cyklamenaldehyd	103–95–7	2,3	kapalné	kategorie 2
1-bromhexan	111–25–1	2,7	kapalné	kategorie 2
butyl-methakrylát	97–88–1	3	kapalné	kategorie 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271–27–2	3,3	pevné	kategorie 2
heptanal	111–71–7	4	kapalné	kategorie 2

1.6 POPIS METODY

Následuje popis složek a postupů zkoušky založené na modelu rekonstruované lidské epidermis při hodnocení dráždění kůže. Model rekonstruované lidské epidermis lze sestavit, připravit nebo získat komerčně (např. EpiSkin™, EpiDerm™ a SkinEthic RHE™). Protokoly standardní zkušební metody pro EpiSkin™, EpiDerm™ a SkinEthic RHE™ lze získat na adrese [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>] (21, 22, 23). Zkoušení lze provádět následujícím způsobem:

1.6.1 **Složky modelu rekonstruované lidské epidermis**1.6.1.1 *Všeobecné podmínky modelu*

K sestavení epitelu je zapotřebí použít normální lidské keratinocyty. Pod funkčním *stratum corneum* by měly být přítomny vícenásobné vrstvy životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevnaté a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. dodecylsulfátu sodného (SDS) nebo přípravku Triton X-100. Funkci bariéry lze hodnotit buď stanovením koncentrace, při níž látka markeru snižuje životaschopnost tkání o 50 % (IC₅₀) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby požadované ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET₅₀) po nasazení látky markeru ve specifikované pevně stanovené koncentraci. Zadržovací vlastnosti modelu by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by způsobilo špatné modelování expozice kůže. Model kůže by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmou ani mykózami.

1.6.1.2 *Funkční podmínky modelu*1.6.1.2.1 **Životaschopnost**

MTT (20) je upřednostňovanou kvantitativní analýzou pro stanovení míry životaschopnosti. Optická hustota (OD) extrahovaného (rozpusťitelného) barviva z tkáně ošetřené negativní kontrolou (NC) by měla být nejméně dvacetinásobně větší než OD extrakčního rozpouštědla samotného. Je nutné prokázat, že tkáň ošetřená NC je stabilní v kultuře (poskytnout podobná měření životaschopnosti) po dobu trvání lhůty zkušební expozice.

1.6.1.2.2 **Bariérová funkce**

Stratum corneum a jeho lipidové složení by mělo dostačovat na to, aby odolávalo rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. SDS nebo Triton X-100, podle odhadu na základě IC₅₀ nebo ET₅₀.

▼ M1

1.6.1.2.3 Morfologie

Histologické vyšetření rekonstruované kůže/epidermis by měl provádět vhodně kvalifikovaný personál a mělo by prokázat strukturu podobnou lidské kůži/epidermis (včetně vícevrstevnatého *stratum corneum*).

1.6.1.2.4 Reprodukovatelnost

Výsledky metody používající specifický model by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času, nejlépe pomocí vhodné kontrolní (srovnávací) látky šarže (viz dodatek).

1.6.1.2.5 Kontroly kvality (QC) modelu

Každá šarže použitého epidermálního modelu by měla splňovat definovaná produkční kritéria uvolnění do oběhu, kdy mezi nejvýznamnější patří kritérium životaschopnosti (bod 1.6.1.2.1) a bariérové funkce (bod 1.6.1.2.2). Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC₅₀ nebo ET₅₀ je zapotřebí zjistit u dodavatele modelu kůže (nebo experimentátora, pokud se používá vlastní model). Bariérové vlastnosti tkání je nutno ověřit laboratorně po dodání tkání. Pro spolehlivou předpověď dráždivých účinků mohou být přijatelné pouze výsledky vyprodukované pomocí náležitých tkání. Jako příklad jsou dále uvedeny rozsahy přijatelnosti pro validované referenční metody.

Tabulka 2

Příklady kritérií kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

	Dolní mez přijatelnosti	Průměr rozsahu přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
Validovaná referenční metoda 1 (18 hodin ošetření SDS)	IC ₅₀ = 1,0 mg/ml	IC ₅₀ = 2,32 mg/ml	IC ₅₀ = 3,0 mg/ml
Validovaná referenční metoda 2 (1 % Triton X100)	ET ₅₀ = 4,8 h	ET ₅₀ = 6,7 h	ET ₅₀ = 8,7 h

1.6.1.3 Nasazení zkoušené a kontrolní látky

Pro každou léčbu a pro kontroly (minimálně tři replikáty na jednu zkoušku) je zapotřebí použít dostatečný počet tkáňových replikátů. U kapalných i u pevných látek je zapotřebí nanášet dostatečné množství zkušební látky, aby rovnoměrně pokryla povrch kůže, a současně se vyhnout nekonečné dávce (viz bod 1.2 Definice), tj. minimálně by se mělo použít 25 µl/cm² nebo 25 mg/cm². U pevných látek by měl být povrch epidermis před nanesením zvlhčen deionizovanou nebo destilovanou vodou, aby se zajistil dobrý kontakt s kůží. Pevné látky je zapotřebí zkoušet ve formě jemného prášku, bude-li to možné. Na konci expoziční lhůty je nutné zkušební látku pečlivě spláchnout z povrchu kůže vodným pufrům nebo roztokem 0,9 % NaCl. V závislosti na použitém modelu rekonstruované lidské epidermis se může doba expozice měnit od 15 do 60 minut a teplota inkubace v rozmezí 20 až 37 °C. Podrobnosti naleznete ve standardních prováděcích postupech pro tyto tři metody (21, 22, 23).

▼ M1

Souběžné NC a pozitivní kontroly (PC) je nutné používat pro každou studii, aby se prokázalo, že životaschopnost (NC), bariérová funkce a následná tkáňová citlivost (PC) tkání je v rámci definovaného rozpětí historické přijatelnosti. Navrhovanou látkou PC je 5 % vodný SDS. Navrhovanými látkami NC jsou voda a fosfátový pufrový fyziologický roztok (PBS).

1.6.1.4 *Měření životaschopnosti buněk*

Nejdůležitějším prvkem zkušebního postupu je to, že se měření životaschopnosti neprovádí okamžitě po expozici působení zkoušených látek, ale po dostatečně dlouhé inkubační době po ošetření opláchnutých tkání v čerstvém médiu. Toto období umožňuje jak regeneraci po slabých dráždivých účincích, tak i po vzniku jasných cytotoxických účinků. Během optimalizační fáze zkoušky (9, 10, 11, 12, 13) se jako optimální ukázala 42hodinová inkubační doba po ošetření, a byla proto použita při validaci referenčních zkušebních metod.

Kvantitativní analýza konverze MTT je kvantitativní validovaná metoda, kterou je nutné používat k měření životaschopnosti buněk. Je kompatibilní s použitím soustavy trojrozměrné tkáně. Vzorek kůže se umístí do roztoku MTT o vhodné koncentraci (např. 0,3 až 1 mg/ml) na 3 hodiny. Vysrážený modrý formazan se poté extrahuje z tkáně pomocí rozpouštědla (např. isopropylalkohol, kyselý isopropylalkohol) a koncentrace formazanu se měří stanovením OD při 570 nm pomocí pásmové propustnosti maximálně ± 30 nm.

Optické vlastnosti zkoušené látky nebo její chemické působení na MTT může interferovat s kvantitativní analýzou, což vede k nepravdivému odhadu životaschopnosti (protože zkoušená látka může bránit tvorbě barvy nebo ji zpětně převracet a stejně tak ji i způsobovat). K tomu může docházet v případě, že se specifická zkoušená látka zcela neodstraní z kůže oplachováním, nebo v případě, že pronikne přes epidermis. Jestliže zkoušená látka působí přímo na MTT, má přírodní zabarvení nebo se zabarví během ošetřování tkáně, pak jsou zapotřebí ke zjištění interference zkušební látky s technikou měření životaschopnosti a k její korekci dodatečné kontroly. Podrobný popis postupu testování přímé redukce MTT naleznete v protokolu zkušební metody pro validované referenční metody (21, 22, 23). Nespecifická barva (NSC) způsobená těmito interferencemi by neměla překročit 30 % NC (pro korekce). Jestliže je NSC > 30 %, zkoušená látka bude považována za látku se zkouškou nekompatibilní.

1.6.1.5 *Kritéria přijatelnosti kvantitativní analýzy*

U každé kvantitativní analýzy využívající platných šarží (viz bod 1.6.1.2.5) je zapotřebí, aby tkáně ošetřené NC vykazovaly OD odrážející kvalitu tkání, která vznikla po všech přepravních a přejímacích krocích a celém procesu dráždění dle protokolu. Hodnoty OD kontrol by neměly být pod historicky zjištěnými dolními hranicemi. Podobně by tkáně ošetřené PC, tj. 5 % vodným SDS, měly reflektovat citlivost, kterou si tkáně uchovaly, a jejich schopnost reagovat na dráždivou látku v podmínkách každé individuální kvantitativní analýzy (např. životaschopnost ≤ 40 % pro validovanou referenční metodu 1 a ≤ 20 % pro validovanou referenční metodu 2). Je nutno definovat související a vhodná měření variability mezi tkáňovými replikáty (např. pokud se používají standardní odchylky, měly by být ≤ 18 %).

▼ M1**2. ÚDAJE****2.1 ÚDAJE**

Pro každou léčbu by údaje z individuálních vzorků zkoušek replikátu (např. hodnoty OD a údaje vypočítané procentuální životaschopnosti pro každou zkoušenou látku včetně klasifikace) měly být uváděny ve formě tabulky včetně údajů z opakovaných experimentů v případě potřeby. Navíc je pro každý pokus zapotřebí udávat průměry \pm standardní odchylky. Pozorované interakce s činidlem MTT a barevnými zkoušenými látkami je nutno uvádět pro každou zkoušenou látku.

2.2 VÝKLAD VÝSLEDKŮ

Hodnoty OD získané s každým zkušebním vzorkem lze použít pro výpočet procentuálního podílu životaschopnosti v porovnání s NC, která je stanovena na 100 %. Je zapotřebí jasně definovat, dokumentovat a v případě potřeby prokázat hodnotu hraniční meze („cut-off“) procentuálního podílu životaschopnosti buněk odlišujícího dráždivou látku od neklasifikovaných zkoušených látek a statistický postup (statistické postupy) použité k hodnocení výsledků a identifikaci dráždivých látek. Mezní hodnoty pro předpověď dráždění spojené s validovanými referenčními hodnotami jsou uvedeny níže:

Zkoušená látka je považována za dráždivou pro kůži v souladu s kategorií 2 GHS OSN:

- i) jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření menší nebo rovna (\leq) 50 %.

Zkoušená látka se považuje za nezařazenou do žádné kategorie:

- ii) jestliže je životaschopnost tkáně po expozici a inkubaci po ošetření větší ($>$) 50 %.

3. ZPRÁVY**3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat následující informace:

Zkoušená a kontrolní látka:

- chemický název (názvy), např. dle IUPAC nebo název CAS a číslo CAS, jsou-li známy,
- čistota a složení látky (v hmotnostních procentech),
- fyzikálně-chemické vlastnosti významné pro provádění studie (např. skupenství, stabilita a těkavost, pH, rozpustnost ve vodě, pokud je známa),
- případné ošetření zkoušených/kontrolních látek před zkouškou (např. zahřívání, mletí),
- podmínky uchovávání.

Odůvodnění modelu kůže a použitého protokolu.

Zkušební podmínky:

- použitý buněčný systém,

▼ M1

- informace o kalibraci měřicího zařízení a pásma propustnosti použitého pro měření životaschopnosti buněk (např. spektrofotometr),
- úplné podpůrné informace pro specifický použitý model kůže včetně jeho chování. Ten by měl zejména zahrnovat:
 - i) životaschopnost,
 - ii) bariérovou funkci,
 - iii) morfologii,
 - iv) reprodukovatelnost a předvídatelnost,
 - v) kontroly kvality (QC) modelu,
- podrobnosti použitého zkušební postupu,
- použité zkušební dávky, doba expozice a doba inkubace po ošetření,
- popis jakýchkoli úprav zkušební postupu,
- odkaz na historické údaje modelu. Ten by měl zejména zahrnovat:
 - i) přijatelnost údajů QC s odkazem na historické údaje šarže,
 - ii) přijatelnost hodnot pozitivních a negativních kontrol s odkazem na průměry a rozsahy pozitivních a negativních kontrol,
- popis použitých hodnotících kritérií včetně odůvodnění výběru bodu (bodů) hraniční meze pro model předpovědi.

Výsledky:

- údaje z individuálních zkušebních vzorků ve formě tabulky,
- popis ostatních pozorovaných účinků.

Diskuse o výsledcích.

Závěry.

4. LITERATURA

- (1) Organizace spojených národů (OSN) (2007). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek Organizace spojených národů (OSN) (GHS), OSN New York a Ženeva, druhé revidované vydání, 2007. K dispozici na adrese: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html.
- (2) REACH: Pokyn pro požadavky na informace a hodnocení chemické bezpečnosti. K dispozici na adrese: http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/information_requirements_en.htm?time=1232447649.
- (3) Zkušební metoda B.4. AKUTNÍ TOXICITA, DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI.
- (4) Zkušební metoda B.40. LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER).

▼ M1

- (5) Zkušební metoda B.40a. LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI *IN VITRO*: ZKOUŠKA POMOCÍ MODELU LIDSKÉ KŮŽE.
- (6) OECD (2006). Zkušební pokyn 435. Pokyn OECD ke zkoušení chemikálií. Metoda membránového bariérového testu *in vitro*. Schváleno 19. července 2006. K dispozici na adrese: http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html.
- (7) ECVAM (2009) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. K dispozici jako studijní dokumenty ke stažení (Download Study Documents) na adrese: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (8) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J. W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. & Botham, P. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 15, 57–93.
- (9) Portes, P., Grandidier, M.H., Cohen, C. & Roguet, R.(2002). Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study. *Toxicology in Vitro* 16, 765–770.
- (10) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. & Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests. *ALTEX* 21, 107–114.
- (11) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. & Spielmann H. (2005) The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test. *ATLA* 33, 351–367.
- (12) Cotovio, J., Grandidier, M.–H., Portes, P., Roguet, R. & G. Rubinstein. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model within the Framework of the ECVAM Validation Process. *ATLA* 33, 329–249.
- (13) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. & Worth, A.(2002). Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation. ECVAM Skin Irritation Task Force Report 2. *ATLA* 30,109–129.
- (14) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cocks-hott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. *ATLA* 35, 559–601.
- (15) Hoffmann, S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1- α . 135 pp. + annexes. K dispozici jako studijní dokumenty ke stažení (Download Study Documents) na adrese: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.

▼ M1

- (16) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. *ATLA* 35, 603–619.
- (17) J. Cotovio, M.–H. Grandidier, D. Lelièvre, R. Roguet, E. Tinois-Tessonnaud, J. Leclaire (2007). In vitro acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, Special Issue-proceedings from WC6. Vol. 14, 351–358.
- (18) Prohlášení ESAC o aktualizovaných analýzách EpiDerm a podobných analýzách SkinEthic. 5. listopad 2008.
- (19) ES (2006). Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnice Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. *Úřední věstník Evropské unie*, L 396/1, 30.12.2006. OPOCE, Lucemburk.
- (20) Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.
- (21) EpiSkin™ SOP, Version 1.6 (January 2005). Validation of the EpiSkin Skin Irritation Test – 42 Hours Assay For The Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals. K dispozici jako studijní dokumenty ke stažení (Download Study Documents) na adrese: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (22) EpiDerm™ SOP, Version 5.0 (October 2004). Draft Standard Operating Procedure. *In Vitro* Skin Irritation Test: Human Skin Model. Model: EpiDerm™- 200. K dispozici jako studijní dokumenty ke stažení (Download Study Documents) na adrese: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (23) SkinEthic RHE™ SOP. K dispozici jako studijní dokumenty ke stažení (Download Study Documents) na adrese: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>.
- (24) Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995) Irritant contact dermatitis IN: Guin J.D. *Practical Contact Dermatitis* Mc Graw-Hill New York, pp 7–18.
- (25) Griesinger C, Barroso J & Zuang V: ECVAM background document on the recent adaptations of the ECVAM performance standards for in vitro skin irritation testing in the context of the drafting process of an EU test method and an OECD draft test guideline. Ispra, 13. listopad 2008.

▼ **M1***Dodatek***Hodnocení charakteristik chování navrhovaných modelů rekonstruované lidské epidermis *in vitro* pro dráždění kůže**

ÚVOD

Navrhované postupy pro použití v rámci této zkušební metody je nutné vyhodnotit s cílem stanovit jejich spolehlivost a přesnost pomocí látek zastupujících plný rozsah Draizeho škály dráždivosti. Při vyhodnocení pomocí 20 doporučených referenčních látek (tabulka 2) by navrhované postupy měly mít hodnoty spolehlivosti a přesnosti, které jsou srovnatelné s hodnotami validované referenční metody 1 (tabulka 3) (1). Standardy přesnosti a spolehlivosti, kterých by mělo být dosaženo, jsou uvedeny v částech II a III níže. Neklasifikované a klasifikované látky (kategorie 2 GHS OSN), představující platné chemické třídy, jsou zahrnuty s tím, že spolehlivost a chování (citlivost, specifická, míry falešné negativity a pozitivivity a přesnost) navrhované zkušební metody lze srovnávat se spolehlivostí a dalšími parametry validované referenční metody 1. Spolehlivost zkušební metody společně s její schopností správně identifikovat dráždivé látky kategorie 2 GHS OSN by měla být stanovena před jejím použitím ke zkoušení nových látek.

STANDARDY CHOVÁNÍ

Standardy chování zahrnují následující tři prvky I) zásadní složky zkušební metody, II) referenční látky a III) definované hodnoty přesnosti a spolehlivosti (2). Tyto standardy chování jsou založeny na standardech chování definovaných po dokončení validační studie dráždění kůže ECVAM (3).

I) **Zásadní složky zkušební metody***Všeobecné podmínky modelu*

K sestavení epitelu je zapotřebí použít normální lidské keratinocyty. Pod funkčním *stratum corneum* by měly být přítomny vícenásobné vrstvy životaschopných epitelových buněk (bazální vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mělo být vícevrstevnaté a obsahovat profil esenciálních lipidů k vytvoření funkční bariéry robustní natolik, aby vzdorovala rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. SDS nebo přípravku Triton X-100. Funkci bariéry lze hodnotit buď stanovením koncentrace, při níž látka markeru snižuje životaschopnost tkáně o 50 % (IC_{50}) po pevně stanovené expoziční době, nebo stanovením expoziční doby požadované ke snížení životaschopnosti buněk o 50 % (ET_{50}) po nasazení látky markeru ve specifikované pevně stanovené koncentraci. Zadržovací vlastnosti modelu by měly zabránit průchodu materiálu v oblasti *stratum corneum* do životaschopné tkáně, což by způsobilo špatné modelování expozice kůže. Model kůže by neměl být kontaminován bakteriemi, viry, mykoplazmou ani mykózami.

*Funkční podmínky modelu***Životaschopnost**

MTT (4) je upřednostňovanou kvantitativní analýzou pro stanovení míry životaschopnosti. OD extrahovaného (rozpuštělného) barviva z tkáně ošetřené NC by měla být nejméně dvacetinásobně větší než OD extrakčního rozpouštědla samotného. Je nutné prokázat, že tkáň ošetřená NC je stabilní v kultuře (poskytnout podobná měření životaschopnosti) po dobu trvání lhůty zkušební expozice.

▼ **M1***Bariérová funkce*

Stratum corneum a jeho lipidové složení by mělo dostačovat na to, aby odolávalo rychlému průniku cytotoxických látek markeru, např. SDS nebo Triton X-100, podle odhadu na základě IC_{50} nebo ET_{50} .

Morfologie

Histologické vyšetření rekonstruované kůže/epidermis by měl provádět vhodně kvalifikovaný personál a mělo by prokázat strukturu podobnou lidské kůži/epidermis (včetně vícevrstevnatého *stratum corneum*).

Reprodukovatelnost

Výsledky metody používající specifický model by měly prokázat reprodukovatelnost v průběhu času, nejlépe pomocí vhodné kontrolní (srovnávací) látky šarže (viz definice v bodě 1.2).

Kontroly kvality (QC) modelu

Každá šarže použitého epidermálního modelu by měla splňovat definovaná produkční kritéria uvolnění do oběhu, kdy mezi nejvýznamnější patří kritérium *životaschopnosti* a *bariérové funkce*. Rozsah přijatelnosti (horní a dolní mez) pro IC_{50} nebo ET_{50} je zapotřebí zjistit u dodavatele modelu kůže (nebo experimentátora, pokud se používá vlastní model). Bariérové vlastnosti tkání je nutno ověřit laboratorně po dodání tkání. Pro spolehlivou předpověď dráždivých účinků mohou být přijatelné pouze výsledky vyprodukované pomocí náležitých tkání. Jako příklad jsou dále uvedeny rozsahy přijatelnosti pro validované referenční metody.

Tabulka 1

Příklady kritérií kontroly kvality pro uvolnění šarže do oběhu

	Dolní mez přijatelnosti	Průměr rozsahu přijatelnosti	Horní mez přijatelnosti
Validovaná referenční metoda 1 (18 hodin ošetření SDS)	$IC_{50} = 1,0$ mg/ml	$IC_{50} = 2,32$ mg/ml	$IC_{50} = 3,0$ mg/ml
Validovaná referenční metoda 2 (1 % Triton X100)	$ET_{50} = 4,8$ h	$ET_{50} = 6,7$ h	$ET_{50} = 8,7$ h

II) **Referenční látky**

Referenční látky slouží k rozhodnutí o tom, zda spolehlivost a přesnost navrhované originální zkušební metody založené na rekonstruované lidské epidermis *in vitro*, kdy se prokázalo, že je strukturálně a funkčně dostatečně podobná validovaným referenčním metodám, nebo kdy představuje drobnou úpravu validované referenční metody, vykazuje srovnatelné chování s chováním validované referenční metody 1 (1). 20 referenčních látek uvedených v tabulce 2 zahrnuje látky představující různé příslušné chemické třídy a zároveň i látky kategorie 2 GHS OSN. Látky uvedené v tomto seznamu zahrnují 10 látek kategorie 2 GHS OSN, 3 látky volitelné kategorie 3 GHS OSN a 7 nekategorizovaných látek. Podle této zkušební metody se volitelná kategorie 3 nepovažuje za kategorii. Tyto referenční látky představují minimální počet látek, které je zapotřebí použít pro vyhodnocení přesnosti a spolehlivosti navrhované zkušební metody pro dráždění kůže založené na rekonstruované lidské epidermis. V situacích, kdy látka na seznamu není k dispozici, lze použít jiné látky, pro něž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje *in vivo*. Bude-li to žádoucí, lze k minimálnímu seznamu referenčních látek přidat dodatečné látky zastupující další chemické třídy, pro něž jsou k dispozici odpovídající referenční údaje *in vivo*, pro další hodnocení přesnosti navrhované zkušební metody.



Tabulka 2

Referenční látky pro stanovení hodnot přesnosti a spolehlivosti pro modely dráždění kůže založené na rekonstruované lidské epidermis

Látka (*)	Číslo CAS	Číslo EINECS	Skupenství	Skóre <i>in vivo</i>	Kategorie GHS <i>in vitro</i>	Kategorie GHS <i>in vivo</i>
1-brom-4-chlorbutan	6940-78-9	230-089-3	kapalné	0	kategorie 2	žádná kategorie
diethyl-ftalát	84-66-2	201-550-6	kapalné	0	žádná kategorie	žádná kategorie
kyselina naftalen-1-octová	86-87-3	201-705-8	pevné	0	žádná kategorie	žádná kategorie
allyl-fenoxyacetát	7493-74-5	231-335-2	kapalné	0,3	žádná kategorie	žádná kategorie
isopropylalkohol	67-63-0	200-661-7	kapalné	0,3	žádná kategorie	žádná kategorie
4-(methylthio)benzaldehyd	3446-89-7	222-365-7	kapalné	1	kategorie 2	žádná kategorie
methyl-stearát	112-61-8	203-990-4	pevné	1	žádná kategorie	žádná kategorie
heptyl-butyrát	5870-93-9	227-526-5	kapalné	1,7	žádná kategorie	volitelná kategorie 3
hexyl-salicylát	6259-76-3	228-408-6	kapalné	2	žádná kategorie	volitelná kategorie 3
triisobutyl-fosfát	126-71-6	204-798-3	kapalné	2	kategorie 2	volitelná kategorie 3
dekan-1-ol	112-30-1	203-956-9	kapalné	2,3	kategorie 2	kategorie 2
cyklamenaldehyd	103-95-7	203-161-7	kapalné	2,3	kategorie 2	kategorie 2
1-bromhexan	111-25-1	203-850-2	kapalné	2,7	kategorie 2	kategorie 2
2-(chlormethyl)-4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-hydrochlorid	86604-75-3	434-680-9	pevné	2,7	kategorie 2	kategorie 2
α -terpineol	98-55-5	202-680-6	kapalné	2,7	kategorie 2	kategorie 2
dipropyldisulfid	629-19-6	211-079-8	kapalné	3	žádná kategorie	kategorie 2
butyl-methakrylát	97-88-1	202-615-1	kapalné	3	kategorie 2	kategorie 2
5- <i>terc</i> -butyl-2-methylbenzen-1-thiol	7340-90-1	438-520-9	kapalné	3,3	kategorie 2	kategorie 2
3-fenyl-1-methylpiperazin	5271-27-2	431-180-2	pevné	3,3	kategorie 2	kategorie 2
heptanal	111-71-7	203-898-4	kapalné	4	kategorie 2	kategorie 2

(*) Těchto 20 referenčních látek zahrnuje reprezentativní výběr z 58 látek, které byly původně použity pro validaci referenční metody 1 (EpiSkin™). Je k dispozici úplný seznam zkoušených látek a kritéria pro jejich výběr (5).

Látky uvedené v tabulce 2 poskytují reprezentativní rozdělení 58 látek použitých v mezinárodní validační studii dráždění kůže ECVAM (1). Jejich výběr je založen na následujících kritériích:

- látky jsou komerčně dostupné,
- jsou to zástupci plného rozsahu Draizeho škály dráždivosti (od nedráždivých až po silně dráždivé),

▼ **M1**

- mají dobře definovanou chemickou strukturu,
- jsou představitelem reprodukovatelnosti a předpovědní schopnosti validované metody, jak je určuje validační studie ECVAM,
- jsou představitelem chemické funkčnosti používané ve validačním procesu,
- nejsou spojeny s mimořádně toxickým profilem (např. karcinogenní nebo toxický pro reprodukční systém) a nejsou spojeny s neúnosnými náklady na likvidaci.

III) Definované hodnoty přesnosti a spolehlivosti

Chování (citlivost, specifičnost, míra falešné negativity, míra falešné pozitivivity a přesnost) navrhované zkušební metody by mělo být srovnatelné s parametry validované referenční metody 1 (tabulka 3), tj. citlivost by měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 80 %, specifičnost by měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 70 % a přesnost by měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 75 %. Výpočet daného chování je nutno provést s použitím všech klasifikací získaných pro 20 látek v různých účastnických laboratořích. Klasifikace pro každou látku v každé laboratoři by se měla získat pomocí průměrné hodnoty životaschopnosti v rámci různých prováděných zkoušek (minimálně tři platné zkoušky).

Tabulka 3

Chování validované referenční metody 1 ⁽¹⁾

Zkušební metoda	Počet látek	Citlivost	Specifičnost	Míra falešné negativity	Míra falešné pozitivivity	Přesnost
Validovaná referenční metoda 1 ⁽¹⁾	58	87,2 % ⁽²⁾	71,1 % ⁽³⁾	12,8 %	29,9 %	74,7 %
Validovaná referenční metoda 1 ⁽¹⁾	20	90 %	73,3 %	10 %	26,7 %	81,7 %

⁽¹⁾ EpiSkin™.

⁽²⁾ Na základě 13 dráždivých látek kategorie 2 GHS.

⁽³⁾ Na základě 45 dráždivých látek kategorie 3 GHS nebo látek nezařazených do žádné kategorie GHS.

Spolehlivost navrhované zkušební metody by měla být srovnatelná se spolehlivostí validovaných referenčních metod.

Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost

Hodnocení vnitrolaboratorní variability by mělo ukázat shodu klasifikací (kategorie 2/žádná kategorie) získaných v různých nezávislých zkouškách 20 referenčních látek v rámci jediné laboratoře rovnou nebo vyšší (\geq) než 90 %.

Mezilaboratorní reprodukovatelnost

Hodnocení mezilaboratorní reprodukovatelnosti není zásadně důležité, jestliže se navrhovaná zkušební metoda má používat pouze v jediné laboratoři. U metod, které se mají přenášet mezi laboratořemi, by shoda klasifikací (kategorie 2/žádná kategorie) získaná v různých nezávislých zkouškách 20 referenčních látek mezi nejlépe minimálně třemi laboratořemi měla být rovna nebo vyšší (\geq) než 80 %.

⁽¹⁾ Tabulka 3 uvádí chování validované referenční metody 1 s ohledem na vlastní schopnost správně identifikovat dráždivé látky (kategorie 2 GHS OSN) a neklasifikované látky (žádná kategorie včetně volitelné kategorie 3) pro 58 a 20 referenčních látek v prvním a druhém případě (tabulka 2).

▼ M1

LITERATURA

- (1) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovió, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007) The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test. *ATLA* 35, 559–601.
- (2) Dokument pokynu č. 34 OECD (2005) o hodnocení a mezinárodním přijetí nových či aktualizovaných zkušebních metod pro hodnocení nebezpečnosti. OECD, Paříž.
- (3) ECVAM (2007) Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation. K dispozici jako studijní dokumenty ke stažení (Download Study Documents) na adrese <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>. Vstup na stránky uskutečněn dne 27. října 2008.
- (4) Mosman, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.
- (5) Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. & Zuang, V. (2007) ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals. *ATLA* 35, 603–619.

▼ M2**B. 47 ZKUŠEBNÍ METODA PRO ZÁKAL A PROPUSTNOST ROHOVKY U SKOTU PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI**

ÚVOD

1. Zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP – Bovine Corneal Opacity and Permeability) je zkušební metoda *in vitro*, kterou lze za určitých okolností a s některými omezeními použít pro klasifikaci látek a směsí jako „látky s leptavými a silně dráždivými účinky na oči“ (1) (2) (3). Pro účely této zkušební metody jsou silně dráždivé látky definovány jako látky způsobující oční léze, které přetrvávají u králíků po dobu nejméně 21 dní po jejich podání. I když se BCOP nepovažuje za úplnou náhradu za oční test *in vivo* na králících, doporučuje se použít jako součást strategie stupňovitých zkoušek pro regulační klasifikaci a označování v rámci specifické oblasti použitelnosti (4) (5). Zkoušené látky a směsi (6) lze klasifikovat jako látky s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči bez dalšího zkoušení na králících. Látka, jejíž negativní zkoušky by si vyžádaly zkoušení na králících s použitím strategie stupňovitého zkoušení, jak je uvedeno v metodice OECD 405 (7) (kapitola B. 5 této přílohy).

2. Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních leptavých nebo silně dráždivých účinků zkoušené látky na oči měřené její schopností způsobit zákal a zvýšit propustnost v oddělené rohovce skotu. Toxické účinky na rohovku se měří: i) sníženou propustností světla (zákal) a ii) zvýšenou prostupností barviva fluoresceinu sodného (propustnost). Hodnocení zákalu a propustnosti rohovky po expozici zkoušené látky se spojí, aby se odvodil stav podrážděnosti *in vitro* (IVIS – *In Vitro* Irritancy Score), který se používá pro klasifikaci úrovně dráždivých účinků zkoušené látky.

3. Látky s dráždivými účinky na oči způsobující léze, které odezní nejpozději do 21 dní a nedráždivé látky byly rovněž zkoušeny s použitím zkušební metody BCOP. Přesnost a spolehlivost zkušební metody BCOP u látek těchto kategorií však nebyla oficiálně hodnocena.

4. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

POČÁTEČNÍ POSOUZENÍ A OMEZENÍ

5. Tato zkušební metoda je založena na protokolu zkušební metody BCOP Koordinačního výboru mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) (8) zpracovaném v návaznosti na mezinárodní studii o ověřování platnosti (4)(5)(9) s přispěním Evropského střediska pro validaci alternativních metod (ECVAM) a Japonského střediska pro validaci alternativních metod (JaCVAM). Protokol vychází z informací získaných z Institutu pro vědní obor *in vitro* (IIVS) a z protokolu 124 INVITTOX (10), který představuje protokol používaný pro studii o předběžném ověřování platnosti analýzy BCOP sponzorovanou Evropským společenstvím a vypracovanou v letech 1997–1998. Oba tyto protokoly jsou založeny na metodice analýzy BCOP poprvé ohlášené Gautheronem *et al.* (11).

▼ **M2**

6. Stanovená omezení pro tuto zkušební metodu jsou založena na vysokých mírách falešné pozitivivity pro alkoholy a ketony a na vysoké míře falešné negativivity pro pevné látky sledované v databázi ověřování platnosti (viz bod 44) (5). Jsou-li látky v rámci těchto chemických a fyzikálních tříd vyřazeny z databáze, přesnost BCOP v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS je podstatně vyšší (5). Vycházejí z účelu této analýzy (tj. zjišťovat pouze látky s leptavými/silně dráždivými účinky na oči), míry falešné negativivity nejsou kritické, protože tyto látky by se následně zkoušely na králících nebo jinými náležitě validovanými zkouškami *in vitro* v závislosti na požadavcích právních předpisů s využitím strategie stupňovitěho zkoušení v přístupu založeném na vážení důkazů. Kromě toho současná databáze ověřování platnosti neumožňuje odpovídající hodnocení některých tříd chemických látek nebo produktů (např. směsí). Výzkumníci by však mohli zvážit použití této zkušební metody pro všechny druhy zkoušených látek (včetně směsí), přičemž kladné výsledky by mohly být přijaty jako indikátor reakce očí na leptavé nebo silně dráždivé látky. Kladné výsledky získané u alkoholů a ketonů by se však měly interpretovat opatrně z důvodu rizika nepřiměřené předpovědi.
7. V případě všech postupů týkajících se očí skotu a rohovek skotu by se měla dodržovat nařízení a postupy použitelné na zkušebny pro zacházení s materiály získanými ze zvířat, které kromě jiného zahrnují tkáň a mimobuněčné tekutiny. Doporučují se univerzální laboratorní preventivní opatření (12).
8. Omezení zkušební metody spočívá v tom, že i když tato metoda přihlíží k některým účinkům na oči vyhodnoceným zkušební metodou podráždění očí králíků a do určité míry i k jejich síle, nebere v úvahu poškození spojivky a duhovky. A také ačkoli reverzibilitu lézí rohovky nelze v analýze BCOP hodnotit samu o sobě, na základě studií prováděných na očích králíků bylo navrženo, aby se posouzení počáteční hloubky poškození rohovky použilo k rozlišení mezi nevratnými a vratnými účinky (13). A konečně je třeba uvést, že BCOP neumožňuje posouzení možnosti soustavné toxicity spojené s expozicí očí určitým látkám.
9. Vyvíjí se úsilí, aby se dále popsala účelnost a omezení analýzy BCOP pro zjišťování slabých dráždivých látek a nedráždivých látek (viz také bod 45). Uživatelům se rovněž doporučuje, aby organizacím pro ověřování platnosti poskytli vzorky a/nebo údaje pro oficiální hodnocení případného budoucího použití zkušební metody BCOP, včetně zjišťování slabých dráždivých látek a nedráždivých látek.
10. Každá laboratoř, která poprvé provádí tuto analýzu, by měla použít vhodné chemické látky uvedené v dodatku 2. Laboratoř může použít tyto chemické látky k prokázání své odborné způsobilosti v provádění zkušební metody BCOP před předložením analytických údajů BCOP pro regulační účely klasifikace nebezpečnosti.

ZÁSADA ZKOUŠKY

11. Zkušební metoda BCOP je organotypický model, který zajišťuje krátkodobé udržování běžné fyziologické a biochemické funkce rohovky skotu *in vitro*. V této zkušební metodě se poškození zkoušenou látkou posuzuje kvantitativním měřením změn v zákalu a propustnosti rohovky za pomoci opacitometru (přístroje na měření průhlednosti) a optického lehkého spektrofotometru. Obě měření se používají k výpočtu stavu podráždění *in vitro* (IVIS) za účelem přidělení kategorie klasifikace nebezpečnosti podráždění pro předpovídání potenciálu očního podráždění zkoušenou látkou *in vivo* (viz kritéria rozhodování).

▼ **M2**

12. Zkušební metoda BCOP používá oddělené rohovky z očí čerstvě poráženého skotu. Zákal rohovky se měří kvantitativně jako množství průchodu světla rohovkou. Propustnost se měří kvantitativně jako množství barviva fluoresceinu sodného, které prochází celou tloušťkou rohovky a zjišťuje se v mediu zadní komory. Zkoušené látky se aplikují na epitelální povrch rohovky přidáním do přední komory držáku rohovky. V dodatku 3 je uveden popis a schématický náčrt držáku rohovky používaný v BCOP. Držáky rohovky lze komerčně získat z různých zdrojů, nebo je lze zkonstruovat.

Zdroj a věk očí skotu a výběr druhů zvířat

13. Skot posílaný na jatka se zpravidla poráží buď pro lidskou spotřebu, nebo pro jiná komerční použití. Jako zdroj rohovek pro použití v BCOP se používají pouze zdravá zvířata, která se považují za vhodná pro vstup do lidského potravinového řetězce. Jelikož skot má široký rozsah hmotnosti v závislosti na chovu, věku a pohlaví, neexistuje žádné doporučení týkající se hmotnosti zvířat v době porážky.

14. Mohou se vyskytnout rozdíly ve velikosti rohovky, když se používají oči od zvířat různého věku. Rohovky o vodorovném průměru $> 30,5$ mm a s hodnotami základní tloušťky rohovky (CCT) $\geq 1\ 100$ μm se obvykle získávají ze skotu staršího osmi let, zatímco rohovky o vodorovném průměru $< 28,5$ mm a CCT < 900 μm se obvykle získávají ze skotu mladšího pěti let (14). Z těchto důvodů se zpravidla nepoužívají oči ze skotu staršího 60 měsíců. Oči ze skotu mladšího 12 měsíců se tradičně nepoužívají, protože oči se ještě vyvíjejí a tloušťka a průměr rohovky jsou mnohem menší, než jsou zaznamenány u očí dospělého skotu. Používání rohovek z mladých zvířat (tj. 6 až 12 měsíců starých) je však přípustné, jelikož mají určité výhody, např. zvýšená dostupnost, úzký věkový rozsah a nižší nebezpečnost související s potenciální expozicí zaměstnanců bovinní spongiformní encefalopatii (15). Protože by bylo účelné další hodnocení vlivu velikosti nebo tloušťky rohovky na reakci na leptavé a dráždivé látky, uživatelům se doporučuje oznamovat odhadovaný věk a/nebo hmotnost zvířat, které poskytují rohovky používané ve studii.

Získávání a doprava očí do laboratoře

15. Oči shromažďují zaměstnanci jatek. Aby se minimalizovaly mechanické a jiné druhy poškození očí, měly by se oči odstranit co nejdříve po úmrtí. Aby se zamezilo expozici očí potenciálně dráždivým látkám, zaměstnanci jatek by neměli při oplachování hlavy zvířete používat čisticí prostředky.

16. Oči by měly být ve vhodně velké nádobě úplně ponořeny do Hanksova vyváženého solného roztoku (HBSS) a dopraveny do laboratoře tak, aby se minimalizovalo poškození a/nebo bakteriální znečištění. Jelikož oči se získávají během procesu porážení, mohou být vystaveny krvi a jiným biologickým látkám, včetně bakterií a jiných mikroorganismů. Proto je důležité zajistit, aby riziko znečištění bylo minimalizováno (např. držením nádoby, která obsahuje oči, v mokrém ledu, přidáním antibiotik do Hanksova vyváženého solného roztoku (HBSS) použitého k uchování očí během dopravy [např. penicilin se 100 m.j./ml a streptomycin se 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$]).

▼ M2

17. Časový interval mezi získáním očí a použitím rohovky v BCOP by měl být co nejkratší (získání a použití se uskutečňuje zpravidla tentýž den) a měl by být prokázán, aby se nenarušily výsledky analýzy. Tyto výsledky jsou založeny na kritériích výběru očí a také na reakcích na pozitivní a negativní kontroly. Všechny oči použité v analýze by měly být ze stejné skupiny očí získaných v určitý den.

Kritéria výběru očí používaných v BCOP

18. Jakmile se oči dostanou do laboratoře, jsou pečlivě vyšetřeny z hlediska vad, včetně zvýšeného zákalu, škrábanců a neovaskularizace. Smějí se používat pouze rohovky z očí, které tyto vady nemají.
19. Kvalita každé rohovky se také hodnotí v pozdějších krocích analýzy. Rohovky, které mají zákal větší než sedm zákalových jednotek, se po počáteční jednodinové době vyrovnání vyřadí (POZNÁMKA: opacitometr by měl být kalibrován podle norem zákalu používaných k určení zákalových jednotek, viz dodatek 3).
20. Každá zkušební skupina (zkoušená látka, paralelní negativní a pozitivní kontroly) pozůstává nejméně ze třech očí. V případě rohovek pro negativní kontrolu by se v analýze BCOP měly používat tři rohovky. Protože všechny rohovky jsou vyříznuty z celé oční boule a vloženy do komor rohovky, existuje možnost výtvorů ze zpracování jednotlivých hodnot zákalu a propustnosti rohovky (včetně negativní kontroly). Kromě toho se hodnoty zákalu a propustnosti rohovek z negativních kontrol používají k úpravě zkoušených předmětů a hodnoty zákalu a propustnosti rohovek z pozitivních kontrol se používají ve výpočtech IVIS.

POSTUP**Příprava očí**

21. Rohovky, které nemají vady, se vyřezávají s 2 až 3 mm okrajem očního bělma, který zůstává a pomáhá v následném ošetření, přičemž se musí dávat pozor, aby se zamezilo poškození epitelu a endotelu rohovky. Oddělené rohovky se zasazují do zvlášť k tomu určených držáků rohovek složených z předních a zadních částí, které se dotýkají příslušně epiteliálních a endoteliálních stran rohovky. Obě komory se úplně zaplní předehřátým Eaglovým minimálně nutným médiem (EMEM) (nejdříve zadní komora) a tím se zajistí, že se nevytvoří žádné bubliny. Zařízení se potom vyrovnává na teplotu 32 ± 1 °C nejméně po dobu jedné hodiny, aby se rohovky mohly srovnat s médiem a dosáhnout v co největším rozsahu běžné metabolické aktivity (přibližná teplota povrchu rohovky *in vivo* je 32 °C).
22. Po době vyrovnání se čerstvé předehřáté médium EMEM přidá do obou komor a pro každou rohovku se odeberou základní údaje o zákalu. Všechny rohovky, které vykazují makroskopické poškození tkání (např. poškrábání, pigmentace, neovaskularizace) nebo zákal > 7 jednotek zákalu, se vyřadí. Vypočte se střední zákal vyrovnaných rohovek. Minimálně tři rohovky s hodnotami zákalu, které se blíží střední hodnotě všech rohovek, se vyberou jako rohovky pro negativní kontrolu (nebo pro kontrolu s rozpouštědlem). Zbývající rohovky se potom rozdělí do zkušebních skupin a do skupin pro pozitivní kontrolu.

▼ **M2**

23. Jelikož tepelná kapacita vody je ve srovnání se vzduchem vyšší, voda poskytuje stabilnější teplotní podmínky pro inkubaci. Proto se doporučuje používání vodní lázně pro udržování držáku rohovky a jeho obsahu při teplotě 32 ± 1 °C. Vzduchové inkubátory však lze také použít za předpokladu, že budou přijata preventivní opatření k zachování tepelné stability (např. předehřátím držáků a medií).

Aplikace zkoušené látky

24. Používají se dva různé zkušební protokoly, jeden pro tekutiny a smáčedla (pevné nebo tekuté) a jeden pro pevné látky, které nejsou smáčedla.
25. Tekutiny se zkoušejí neředěné, zatímco smáčedla se zkoušejí při koncentraci 10 % objemové hmotnosti (w/v) v 0,9 % roztoku chloridu sodného, destilované vody nebo jiného rozpouštědla, u něhož se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém. Jako tekutiny se zpravidla zkoušejí polotuhé, krémové a voskovité látky. U alternativních koncentrací roztoku by mělo být předloženo příslušné zdůvodnění. Rohovky jsou vystaveny tekutinám a smáčedlům po dobu 10 minut. Použití jiných dob expozice by mělo být doprovázeno odpovídajícím vědeckým zdůvodněním.
26. Pevné látky, které nejsou smáčedla, se zpravidla zkoušejí jako roztoky nebo suspenze při 20 % koncentraci v 0,9 % roztoku chloridu sodného, destilované vody nebo jiného rozpouštědla, u něhož se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém. Za určitých okolností a s náležitým vědeckým zdůvodněním se pevné látky mohou zkoušet také čistě s přímou aplikací na povrch rohovky a s použitím metody otevřených komor (viz bod 29). Rohovky jsou vystaveny pevným látkám po dobu čtyř hodin, ale podobně jako u tekutých látek a smáčedel lze s odpovídajícím vědeckým zdůvodněním použít alternativní doby expozice.
27. Je možné použít různé metody zkoušení v závislosti na fyzické povaze a chemických vlastnostech zkoušené látky (např. pevné látky, tekutiny, viskózní látky versus neviskózní tekutiny). Kritický faktor zajišťuje, že zkoušená látka náležitě pokrývá epitelální povrch a že je příslušně odstraněna během oplachování. Metoda uzavřených komor se obvykle používá pro neviskózní až mírně viskózní tekuté zkoušené látky, zatímco metoda otevřených komor se zpravidla používá pro poloviskózní a viskózní tekuté zkoušené látky a pro čistě pevné látky.
28. V metodě uzavřených komor se dostatečné množství zkoušené látky (750 µL) k pokrytí epitelální strany rohovky zavádí do přední komory přes dávkovací otvory na horním povrchu komory a otvory jsou potom během expozice uzavřeny komorovými zátkami. Je důležité zajistit, aby každá rohovka byla vystavena zkoušené látce po příslušnou dobu.
29. V metodě otevřených komor se před zkoušením odstraní z přední komory zavírací klíčka okénka a skleněné okénko. Kontrolní nebo zkoušená látka (750 µL nebo dostatečné množství zkoušené látky, aby úplně pokryla rohovku) se aplikuje přímo na epitelální povrch rohovky s použitím mikropipety. Pokud je zkoušenou látku obtížné pipetovat, lze ji zavést pod tlakem do objemové pipety, což pomůže v dávkování. Špička objemové pipety se zasune do dávkovací špičky injekční stříkačky tak, aby látku bylo možné zavést pod tlakem do špičky vytěšňování. Píst injekční stříkačky se tlačí současně s tím, jak se píst pipety vytahuje nahoru. Pokud se ve špičce pipety objeví vzduchové bubliny, zkoušený předmět se odstraní (vytlačí) a postup se opakuje, dokud špička není naplněná bez vzduchových bublin. V případě potřeby lze použít běžnou injekční stříkačku (bez jehly), protože umožňuje měření přesného objemu zkoušené látky a snadnější aplikaci na epitelální povrch rohovky. Po dávkování se skleněné okénko umístí znovu na přední komoru, aby se obnovil uzavřený systém.

▼ **M2****Inkubace po expozici**

30. Po době expozice se zkoušená látka, látka pro negativní kontrolu nebo látka pro pozitivní kontrolu odstraní z přední komory a epitel se nejméně třikrát opláchne (nebo se oplachuje tak dlouho, dokud nepřestanou být viditelné stopy zkoušené látky) médiem EMEM (obsahující fenolovou červeň). Na oplachování se používá médium obsahující fenolovou červeň, protože změnu barvy ve fenolové červeně lze sledovat, aby se zjistila účinnost oplachovacích kyselých nebo alkalických látek. Rohovky se proplachují více než třikrát, pokud je fenolová červeň ještě zbarvená (do žluta nebo do nachova), nebo pokud je zkoušená látka stále viditelná. Jakmile již v médiu není zkoušená látka, rohovky se naposledy opláchnou médiem EMEM (bez fenolové červeně). EMEM (bez fenolové červeně) se používá jako konečný oplach, aby se před měřením zákalu zajistilo odstranění fenolové červeně z přední komory. Přední komora se pak naplní čerstvým EMEM bez fenolové červeně.
31. U tekutin nebo smáčedel se rohovky po oplachu inkubují po dobu dalších dvou hodin při teplotě 32 ± 1 °C. Delší doba po expozici by byla za určitých okolností účelná a mohla by se zvážit případ od případu. Rohovky zkoušené s pevnými látkami se důkladně propláchnou na konci doby čtyřhodinové expozice, ale nevyžadují si další inkubaci.
32. Zákal a propustnost každé rohovky se v případě tekutých látek a smáčedel zaznamená na konci doby inkubace po expozici a v případě pevných látek, které nejsou smáčedla, na konci doby čtyřhodinové expozice. Každá rohovka se sleduje rovněž vizuálně a případná pozorování se zaznamenají (např. odlupování tkáně, zbytky zkoušené látky, nejednotné struktury rohovky). Tato pozorování by mohla být důležitá, protože mohou odrážet změny v údajích opacitometru.

Látky pro kontrolu

33. Do každého pokusu se zařazují souběžné negativní kontroly nebo kontroly s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivní kontroly.
34. Když se zkouší tekutá látka při 100 % koncentraci, souběžná negativní kontrola (např. 0,9 % roztok chloridu sodného nebo destilovaná voda) se zahrne do zkušební metody BCOP tak, aby bylo možné zjistit nespecifické změny ve zkušebním systému a zajistit základnu pro koncové body analýzy. Tím se rovněž zajistí, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci.
35. Když se zkouší rozředěná tekutina, smáčedlo nebo pevná látka, skupina pro souběžnou kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem se zahrne do zkušební metody BCOP tak, aby bylo možné zjistit nespecifické změny ve zkušebním systému a zajistit základnu pro koncové body analýzy. Lze použít pouze rozpouštědlo/vehikul, u kterého se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém.
36. Do každého pokusu se zařadí známá látka s dráždivými účinky na oči jako látka pro souběžnou pozitivní kontrolu, aby se ověřilo, že je vyvolána odpovídající reakce. Protože analýza BCOP se v této zkušební metodě používá ke zjišťování leptavých nebo silných dráždivých látek, ideálně by pro pozitivní kontrolu měla být referenční látka, která v této zkušební metodě vyvolá silnou reakci. Aby se však zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah dráždivé reakce by neměl být nadměrný.
37. Příklady tekutých zkoušených látek pro pozitivní kontrolu jsou dimethylformamid nebo 1 % hydroxid sodný. Příkladem pevných zkoušených látek pro pozitivní kontrolu je 20 % (objemové hmotnosti) imidazol v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

▼ **M2**

38. Srovnávací látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek či produktů nebo pro hodnocení potenciálu relativního podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měřené koncové body

39. Zákal se určuje množstvím světelné propustnosti rohovkou. Zákal rohovky se kvantitativně měří za pomoci opacitometru a výsledkem jsou hodnoty zákalu měřené na celém rozsahu stupnice.
40. Propustnost se určuje množstvím barviva fluoresceinu sodného, které proniká všemi vrstvami buněk rohovky (tj. epitelem na vnějším povrchu rohovky přes endotel na vnitřním povrchu rohovky). 1 ml roztoku fluoresceinu sodného (4 nebo 5 mg/ml, když se příslušně zkoušejí tekuté látky a smáčedla nebo pevné látky, které nejsou smáčedla) se přidává do přední komory držáku rohovky, která je spojena s epiteliální stranou rohovky, zatímco zadní komora, která je spojena s endoteliální stranou rohovky, se naplní čerstvým médiem EMEM. Držák se potom ve vodorovné poloze inkubuje po dobu 90 ± 5 min. na teplotu 32 ± 1 °C. Množství fluoresceinu sodného, který přechází do zadní komory, se kvantitativně měří za pomoci spektrofotometrie UV/VIS. Spektrofotometrická měření hodnocená ve 490 nm se zaznamenají jako optická hustota (OD_{490}) nebo hodnoty absorbance, které se měří na celém rozsahu stupnice. Hodnoty propustnosti fluoresceinu se stanoví s použitím hodnot OD_{490} na základě spektrofotometru viditelného světla s použitím běžné optické délky 1 cm.
41. Alternativně se může použít analyzátor destiček s 96 jamkami, pokud i) lze stanovit lineární dosah analyzátoru destiček pro určení hodnot fluoresceinu OD_{490} ; a ii) v 96jamkové destičce je použito správné množství vzorků fluoresceinu, jehož výsledkem jsou hodnoty OD_{490} odpovídající běžné optické délce 1 cm (to by si mohlo vyžadovat úplně plnou jamku [obvykle 360 μ L]).

ÚDAJE A PODÁVÁNÍ ZPRÁV**Hodnocení údajů**

42. Jakmile se hodnoty zákalu a střední hodnoty propustnosti (OD_{490}) upraví na zákal pozadí a hodnoty propustnosti OD_{490} pro negativní kontrolu, střední hodnoty zákalu a propustnosti OD_{490} pro každou zkušební skupinu by se měly spojit do empiricky odvozeného vzorce, aby se vypočítal stav podráždění *in vitro* (IVIS) pro každou zkušební skupinu takto:

$$\text{IVIS} = \text{střední hodnota zákalu} + (15 \times \text{střední hodnota propustnosti } OD_{490})$$

Sina *et al.* (16) oznámil, že tento vzorec byl odvozen během laboratorních a mezilaboratorních studií. Údaje vytvořené pro řady 36 sloučenin v multilaboratorní studii byly předmětem vícerozměrné analýzy s cílem určit nejvhodnější rovnováhu mezi údaji *in vivo* a *in vitro*. Tuto analýzu uskutečnili ve dvou samostatných společnostech vědci, kteří odvodili téměř stejné vzorce.

43. Hodnoty zákalu a propustnosti by se měly rovněž posuzovat samostatně, aby se určilo, zda zkoušená látka způsobuje poleptání nebo silné podráždění pomocí pouze jednoho nebo dvou koncových bodů (viz kritéria rozhodování).

▼ **M2****Kritéria rozhodování**

44. Látka, která způsobuje $IVIS \geq 55,1$, se definuje jako leptavá nebo silně dráždivá. Jak je uvedeno v bodě 1, pokud zkoušená látka není určena jako látka s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči, mělo by se uskutečnit další zkoušení pro účely klasifikace a označování. Zkušební metoda BCOP má celkovou přesnost 79 % (113/143) až 81 % (119/147), míru falešné pozitivivity 19 % (20/103) až 21 % (22/103) a míru falešné negativity 16 % (7/43) až 25 % (10/40) ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků klasifikovanými podle klasifikačních systémů EPA (1), EU (2) nebo GHS (3). V případě, že látky v určitých chemických třídách (tj. alkoholy, ketony) nebo fyzikálních třídách (tj. pevné látky) jsou vyloučeny z databáze, přesnost BCOP se v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS pohybuje v rozmezí od 87 % (72/83) do 92 % (78/85), míra falešné pozitivivity od 12 % (7/58) do 16 % (9/56) a míra falešné negativity od 0 % (0/27) do 12 % (3/26).
45. I když se klasifikace látek s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči pro zkoušenou látku nezíská, údaje BCOP mohou být užitečné ve spojení s testovacími údaji z oční zkoušky *in vivo* na králících nebo z náležitě validované zkoušky *in vitro*, aby se dále vyhodnotila účinnost a omezení zkušební metody BCOP pro určení slabých dráždivých a nedráždivých látek (dokument s pokyny o používání zkušebních metod oční toxicity *in vitro* se zpracovává).

Kritéria přijetí studie

46. Zkouška se považuje za přijatelnou, pokud pozitivní kontrola vykazuje IVIS spadající do obvyklých odchylek dosavadní střední hodnoty, kterou je třeba aktualizovat nejméně každé tři měsíce nebo pokaždé, když se přijatelná zkouška vykonává v laboratořích, kde se zkoušky nedělají často (tj. méně než jednou měsíčně). Výsledkem reakce na negativní kontrolu nebo na kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem by měly být hodnoty zákalu a propustnosti, které jsou nižší než stanovené horní meze pro hodnoty zákalu pozadí a propustnosti u rohovek skotu zkoušené příslušnou negativní kontrolou nebo kontrolou s rozpouštědlem/vehikulem.

Zpráva o zkoušce

47. Zpráva o zkoušce by měla zahrnovat tyto informace, pokud se týkají uskutečňování studie:

Zkoušené látky a látky pro kontrolu

Chemický název (chemické názvy), např. strukturální název používaný službou chemických abstrakt (CAS) spolu s dalšími názvy, jsou-li známy;

registrační číslo (RN) CAS, je-li známo;

čistota a složení látky nebo směsi (v procentu (procentech) podle váhy), jsou-li tyto informace dostupné;

fyzikálně chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, těkavost, pH, stálost, třída chemických látek, rozpustnost ve vodě odpovídající provádění studie;

případně ošetření zkoušené látky/látky pro kontrolu před zkoušením (např. zahřátí, mletí);

stálost, je-li známa.

▼ **M2***Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení*

Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie;

určení zdroje očí (tj. zařízení, z něhož byly získány);

podmínky skladování a dopravy očí (např. datum a čas získání očí, časový interval před zahájením zkoušení, dopravní prostředky a teplotní podmínky dopravy, všechna použitá antibiotika);

specifické vlastnosti zvířat, z nichž byly získány oči, jsou-li tyto vlastnosti k dispozici (např. věk, pohlaví, hmotnost zvířete, které je dárce).

*Zdůvodnění použité zkušební metody a protokolu**Úplnost zkušební metody*

Postup používaný k zajištění úplnosti (tj. přesnosti a spolehlivosti) zkušební metody v průběhu času (např. pravidelné zkoušení vhodných látek, využití dosavadních údajů negativních a pozitivních kontrol).

Kritéria pro přijatelnou zkoušku

Přijatelné rozsahy souběžných pozitivních a negativních kontrol založené na dosavadních údajích;

případně přijatelné rozsahy souběžných srovnávacích kontrol na základě dosavadních údajů.

Zkušební podmínky

Popis použitého zkušebního systému;

typ použitého držáku rohovek;

informace o kalibraci přístroje použitého k měření zákalu a propustnosti (např. opacitometr a spektrofotometr);

informace o použitých rohovkách skotu, včetně prohlášení o jejich kvalitě;

podrobnosti o použitém zkušebním postupu;

koncentrace použité zkoušené látky;

popis všech změn zkušebního postupu;

odkaz na dosavadní údaje modelu (např. negativní a pozitivní kontroly, vhodné látky, srovnávací látky);

popis použitých hodnotících kritérií.

Výsledky

Sestavení údajů z jednotlivých zkušebních vzorků do tabulek (např. hodnoty zákalu OD₄₉₀ a vypočítaný IVIS pro zkoušenou látku a pozitivní, negativní a srovnávací kontroly [jsou-li zahrnuty] uvedené v tabulkové formě, případně včetně údajů z několikrát opakovaných pokusů a středních hodnot \pm běžné odchylky pro každý pokus);

popis jiných pozorovaných účinků.

*Posouzení výsledků**Závěr*

LITERATURA

- 1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2. vydání. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼ **M2**

- 2) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnice 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006. Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

- 3) OSN (2007). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC). Druhé revidované vydání, New York a Ženeva: publikace Organizace spojených národů, 2007. Dostupné na:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html].

- 4) ESAC (2007). Prohlášení o uzavření retrospektivní studie ICCVAM o orgánových analýzách *in vitro* jako screeningové testy pro zjišťování potenciálních látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči. Dostupné na:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- 5) ICCVAM (2007). Zpráva o hodnocení zkušebních metod – zkušební metody oční toxicity *in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

- 6) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

- 7) OECD (2002). Metodika 405. Pokyn OECD pro zkoušení chemických látek. Akutní podráždění/poleptání očí. Dostupné na:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

- 8) ICCVAM (2007). Doporučený protokol zkušební metody BCOP ICCVAM. Ve: Zprávě o hodnocení zkušebních metod ICCVAM – zkušební metody oční toxicity *in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

- 9) ICCVAM. (2006). Současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu. Publikace NIH č.: 06-4512. Research Triangle Park: národní toxikologický program. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm].

- 10) INVITTOX (1999). Protokol 124: analýza zákalu a propustnosti rohovky skotu – SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Itálie: Evropské středisko pro ověřování platnosti alternativních metod (ECVAM).

▼ M2

- 11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- 12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health-care Settings. Dostupné na:
[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- 13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- 14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- 15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- 16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- 17) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP). Dostupné na:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].
- 18) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *In Vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE). Dostupné na:
[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

▼ **M2***Dodatek 1*

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Termín se často používá namísto „souladu“, kterým se rozumí podíl správných výsledků zkušební metody.

Srovnávací látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích a v) známá síla v rozsahu žádoucí reakce.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a očníci a propouští světlo dovnitř oka.

Zákal rohovky: Měření rozsahu zákalu rohovky po expozici zkoušené látky. Zvýšený zákal rohovky je příznačný pro poškození rohovky. Zákal lze hodnotit subjektivně, jak se to dělá ve Draizeově oční zkoušce na králících, nebo objektivně s přístrojem jako „opacitometr“.

Propustnost rohovky: Kvantitativní měření poškození epitelu rohovky určením množství barviva fluoresceinu sodného, který prochází všemi vrstvami buněk rohovky.

Kategorie 1 EPA: Zasažení leptavou látkou (nevratné poškození oční tkáně) nebo zasažení rohovky či podráždění přetrvávající déle než 21 dní (1).

Kategorie R41 EU: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzické slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (2).

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné pozitivivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): Systém klasifikace chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních rizik a odpovídajícího označování pomocí prvků informací o nebezpečnosti, jako jsou výstražné symboly nebezpečnosti, signální slova, standardní věty o nebezpečnosti, pokyny pro bezpečné zacházení a bezpečnostní listy, aby poskytl informace o nepříznivých účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, zaměstnanců, dopravců, spotřebitelů a respondérů nebezpečí) a životního prostředí (3).

▼ M2

Kategorie 1 GHS: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (3).

Nebezpečnost: Základní charakteristika chemické látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Stav podráždění *in vitro* (IVIS): Empiricky odvozený vzorec používaný v analýze BCOP, přičemž střední hodnoty zákalu a propustnosti se pro každou zkušební skupinu spojí do jedné hodnoty *in vitro* pro každou zkušební skupinu. $IVIS = \text{střední hodnota zákalu} + (15 \times \text{střední hodnota propustnosti})$.

Negativní kontrola: Nezkoušená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené látky a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Nedráždivá látka: Látky, které nejsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie I, II, nebo III EPA; kategorie R41 nebo R36 EU; nebo kategorie 1, 2A, nebo 2B GHS.

Látka s leptavými účinky na oči: a) Látka, která způsobuje nevratné poškození tkání oka; b) látky které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU (1) (2) (3).

Látka s dráždivými účinky na oči: a) Látka, která způsobuje nevratnou změnu v oku po aplikaci na přední plochu oka; b) látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie II nebo III EPA, kategorie R36 EU nebo kategorie 2A nebo 2B GHS (1) (2) (3).

Látka se silně dráždivými účinky na oči: a) Látka způsobující poškození v oku po aplikaci na přední plochu oka, které neodezní do 21 dní po aplikaci, nebo způsobující závažné fyzikální slábnutí vidění; b) látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU, (1) (2) (3).

Opacitometr: Přístroj používaný k měření „zákalu rohovky“ kvantitativním hodnocením světelné propustnosti přes rohovku. Typický přístroj má dvě části, každá s vlastním zdrojem světla a fotobuňkou. Jedna část se používá pro zkoušenou rohovku a druhá pro kalibraci a vynulování přístroje. Světlo z halogenové lampy se posílá přes kontrolní část (prázdná komora bez okének nebo tekutin) do fotobuňky a vyrovnané se světlem se posílá do fotobuňky přes zkušební část, ve které je umístěna komora obsahující rohovku. Rozdíl ve světelné propustnosti z fotobuňek se porovnává a numerická hodnota zákalu se zobrazí na digitální obrazovce.

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s látkou, o níž je známo, že vyvolává pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný.

▼ M2

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém může být zkušební metoda časem reprodukovatelná v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikulu, který se zpracovává ošetřenou zkoušenou látkou a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků ošetřených zkoušenou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší souběžnou negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Stupňovité zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda jsou k dispozici dostačující informace pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud lze potenciál dráždivých účinků zkoušené látky určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže potenciál dráždivých účinků zkoušené látky nelze určit na základě existujících informací, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech, dokud se neurčí jednoznačná klasifikace.

Validovaná zkušební metoda: zkušební metoda, pro kterou byly zpracovány validační studie s cílem určit důležitost (včetně přesnosti) a spolehlivost pro specifický účel. Je nutné poznamenat, že validovaná zkušební metoda nemusí poskytnout postačující výsledek z hlediska přesnosti a spolehlivosti, aby byla shledána přijatelnou pro navržený účel.

Váha důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti látky.

▼ M2

Dodatek 2

Vhodné látky pro zkušební metodu BCOP

Než laboratoře rutinně použijí zkušební metodu, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace 10 látek s dráždivými účinky na oči doporučených v tabulce 1. Tyto látky byly vybrány tak, aby představovaly rozsah reakcí v případě místního podráždění/poleptání očí, které vycházejí z výsledků očních zkoušek *in vivo* na králících (TG 405) (tj. kategorie 1, 2A, 2B nebo neklasifikované a označené podle GHS OSN) (3) (7). S přihlédnutím k validované účelnosti těchto analýz (tj. zjišťování pouze látek s leptavými/silně dráždivými účinky na oči) však existují pouze dva výsledky zkoušky pro klasifikační účely (leptavá/silně dráždivá látka nebo neleptavá/slabá dráždivá látka), aby byla prokázána odborná způsobilost. Dalším kritériem výběru bylo to, zda látka je komerčně dostupná, zda jsou k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a zda jsou kvalitní údaje ze dvou metod *in vitro*, pro které byly zpracovány metodiky. Z tohoto důvodu byly dráždivé látky vybrány z doporučeného seznamu 122 referenčních látek ICCVAM pro ověření platnosti zkušebních metod oční toxicity *in vitro* (viz dodatek H: Doporučené referenční látky ICCVAM) (5). Referenční údaje jsou dostupné v základním dokumentu o přezkumu ICCVAM pro zkušební metodu BCOP a odděleného kuřecího oka (ICE) (17) (18).

Tabulka 1

Doporučené látky k prokázání odborné způsobilosti pro BCOP

Látka	CASRN	Třída chemických látek (1)	Fyzikální forma	Klasifikace <i>in vivo</i> (2)	Klasifikace <i>in vitro</i> (3)
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniová sloučenina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dibenzoyl-L-tartarová kyselina	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Kyselina trichloroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dichlorbenzoylchlorid	4659-45-4	Acyhalogenid	Tekutá	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Etyl-2-metylacetoacetát	609-14-3	Keton, ester	Tekutá	Kategorie 2B	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Dusičnan amonný	6484-52-2	Anorganická sůl	Pevná	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka

▼ **M2**

Látka	CASRN	Třída chemických látek ⁽¹⁾	Fyzikální forma	Klasifikace <i>in vivo</i> ⁽²⁾	Klasifikace <i>in vitro</i> ⁽³⁾
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/Slabá dráždivá látka
n-hexan	110-54-3	Uhlovodík (acyklický)	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/slabá dráždivá látka

Zkratky: CASRN = registrační číslo podle služby chemických abstrakt

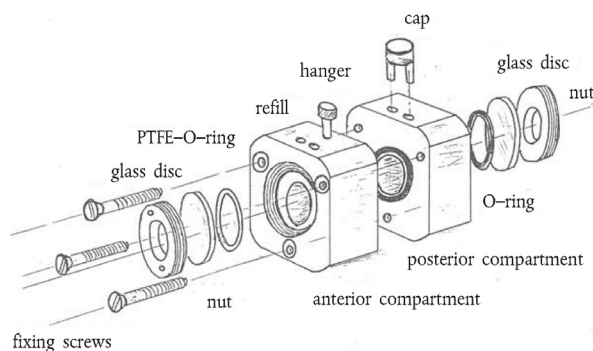
⁽¹⁾ Třídy chemických látek byly přiděleny každé zkoušené látce s použitím standardního klasifikačního schématu na základě klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH) (dostupné na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (OECD TG 405) s použitím GHS OSN (3)(7).

⁽³⁾ Založena na výsledcích v BCOP a ICE.

▼ **M2***Dodatek 3***DRŽÁK ROKOVEK BCOP**

1. Držáky rohovek BCOP se vyrábějí z inertního materiálu (např. polypropylen). Držáky se skládají ze dvou polovin (přední a zadní komora) a mají dvě podobné cylindrické vnitřní komory. Každá komora pojme obsah 5 ml a končí ve skleněném okénku, přes které se zaznamenávají měření zákalu. Každá vnitřní komora má průměr 1,7 cm a hloubku 2,2 cm ⁽¹⁾. Použije se těsnicí kroužek umístěný na zadní komoře, aby se zamezilo úniku látky. Rohovky jsou umístěny na endoteliální straně pod těsnícím kroužkem zadních komor a přední komory se nacházejí na epiteliální straně rohovek. Komory se udržují na místě za pomoci třech nerezavých šroubů umístěných na vnějších okrajích komory. Na konci každé komory se nachází skleněné okénko, které lze odstranit, aby byl snadný přístup k rohovce. Jeden těsnicí kroužek je také umístěn mezi skleněným okénkem a komorou, aby se zamezilo úniku látky. Dva otvory v horní části každé komory umožňují zavedení a odstranění média a zkoušených směsí. Po dobu zkoušení a inkubace jsou uzavřeny gumovými uzávěry.

*Glosář*

Glass disc: Skleněná kruhová destička

PTFE-O-ring: Těsnicí kroužek z PTFE

Refill: Plnicí otvor

Hanger: Skoba

Cap: Krytka

Nut: Matice

O-ring: Těsnicí kroužek

Posterior compartment: Zadní komora

Anterior compartment: Přední komora

Fixing screws: Spojovací šrouby

⁽¹⁾ Poskytnuté rozměry vycházejí z držáku rohovek, který se používá u krav ve věku od 12 do 60 měsíců. V případě, že se používají zvířata ve věku od 6 do 12 měsíců, držák by musel být zkonstruován tak, aby každá komora měla objem 4 ml a aby každá vnitřní komora měla průměr 1,5 cm a hloubku 2,2 cm. U každého nově zkonstruovaného držáku rohovek je velmi důležité, aby poměr exponované plochy povrchu rohovky k objemu zadní komory byl stejný jako poměr v tradičním držáku rohovek. Je to nutné k zajištění, že hodnoty propustnosti budou stanoveny správně pro výpočet IVIS za pomoci navrženého vzorce.

▼ M2

OPACITOMETR

2. Opacitometr je přístroj pro měření světelné propustnosti. Světlo z halogenové lampy se posílá přes kontrolní část (prázdna komora bez okének nebo tekutiny) do fotobuňky a vyrovnané se světlem se posílá do fotobuňky přes zkušební část, ve které se nachází komora obsahující rohovku. Rozdíl ve světelné propustnosti z fotobuněk se porovnává a numerická hodnota zákalu se zobrazí na digitální obrazovce. Tím se určí zákalové jednotky.
3. Opacitometr by měl poskytnout lineární odezvu za pomoci řady údajů o zákalu, které zahrnují mezní hodnoty používané pro různé klasifikace popsané v modelu předpovědi (tj. až do mezní hodnoty, která určuje leptavost/silnou dráždivost). Aby se zajistily lineární a přesné údaje až do 75 – 80 zákalových jednotek, je nutné opacitometr kalibrovat s použitím řady kalibračních přístrojů. Kalibrátory (neprůhledné fólie z polyesteru) se umístí do kalibrační komory (komora rohovky určena k držení kalibrátorů) a čtou se na opacitometru. Kalibrační komora je určena k držení kalibrátorů přibližně ve stejné vzdálenosti mezi světlem a fotobuňkou, v jaké se umístí rohovky během měření zákalu. Opacitometr se nejdříve kalibruje na 0 zákalových jednotek s použitím kalibrační komory bez kalibrátoru. Potom se tři různé kalibrátory umístí jeden po druhém do kalibrační komory a měří se zákal. Výsledkem kalibrátorů 1, 2 a 3 by měly být údaje o zákalu rovnající se příslušně nastaveným hodnotám 75, 150, a 225 zákalových jednotek, $\pm 5 \%$.

▼ **M2****B. 48 ZKUŠEBNÍ METODA ODDĚLENÉHO KUŘECÍHO OKA PRO ZJIŠŤOVÁNÍ LÁTEK S LEPTAVÝMI A SILNĚ DRÁŽDIVÝMI ÚČINKY NA OČI**

ÚVOD

1. Zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE – Isolated Chicken Eye) je zkušební metoda *in vitro*, kterou lze za určitých okolností a s některými omezeními použít pro klasifikaci látek a směsí jako látky s leptavými a silně dráždivými účinky na oči (1) (2) (3). Pro účely této zkušební metody jsou silně dráždivé látky definovány jako látky způsobující oční léze, které přetrvávají u králíků po dobu nejméně 21 dní po jejich podání. I když se metoda ICE nepovažuje za úplnou náhradu za oční test *in vivo* na králících, doporučuje se použít ji jako součást strategie stupňovitých zkoušek pro regulační klasifikaci a označování v rámci specifické oblasti použitelnosti (4) (5). Zkoušené látky a směsi (6), které jsou v této analýze pozitivní, lze klasifikovat jako látky s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči bez dalšího zkoušení na králících. Látka s negativním výsledkem zkoušky by si vyžádala zkoušení na králících s použitím strategie stupňovitého zkoušení, jak je uvedeno v metodice OECD 405 (7) (kapitola B. 5 této přílohy).

2. Účelem této zkušební metody je popsat postupy používané k hodnocení potenciálních testovacích látek s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči měřené její schopností způsobit toxicitu v odstraněném kuřecím oku. Toxické účinky na rohovku se měří i) kvalitativním hodnocením zákalu, ii) kvalitativním hodnocením poškození epitelu na základě aplikace fluoresceinu do oka (zadržování fluoresceinu), iii) kvantitativním měřením zvýšené tloušťky (otok) a iv) kvalitativním hodnocením makroskopického morfologického poškození povrchu. Hodnocení zákalu a otoku rohovky a poškození po expozici zkoušené látky se posuzuje samostatně a potom se spojí za účelem odvození klasifikace dráždivých účinků na oči.

3. Látky s dráždivými účinky na oči způsobující léze, které odezní nejpozději do 21 dní a nedráždivé látky byly rovněž zkoušeny s použitím zkušební metody ICE. Přesnost a spolehlivost zkušební metody ICE u látek těchto kategorií však nebyla oficiálně hodnocena.

4. Definice jsou uvedeny v dodatku 1.

POČÁTEČNÍ POSOUZENÍ A OMEZENÍ

5. Tato zkušební metoda je založena na protokolu zkušební metody ICE Koořdinačního výboru mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) (8) zpracovanému v návaznosti na mezinárodní studii o ověřování platnosti (4) (5) (9) s přispěním Evropského střediska pro ověřování platnosti alternativních metod, Japonského střediska pro validaci alternativních metod a oddělení toxikologie a aplikované farmakologie TNO Quality of Life (Nizozemsko). Protokol vychází z informací získaných z uveřejněných protokolů a také z aktuálního protokolu, který používá TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼ M2

6. Omezení stanovená pro tuto metodu jsou založena na míře falešné positivity pro alkoholy a na mírách falešné negativivity pro pevné látky a smáčedla (viz bod 47) (4). Jsou-li látky v rámci těchto chemických a fyzikálních tříd vyřazeny z databáze, přesnost ICE v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS je podstatně vyšší (4). Vycházejí z účelu této analýzy (tj. zjišťovat pouze látky s leptavými/silně dráždivými účinky na oči), míry falešné negativivity nejsou kritické, protože tyto látky by se následně zkoušely na králících nebo jinými náležitě validovanými zkouškami *in vitro* v závislosti na požadavcích právních předpisů s využitím strategie stupňovitěho zkoušení v přístupu založeném na vážení důkazů. Kromě toho současná databáze ověřování platnosti neumožňuje odpovídající hodnocení některých chemických tříd nebo tříd produktů (např. směsí). Výzkumníci by však mohli zvážit použití této zkušební metody pro zkoušení všech druhů látek (včetně směsí), přičemž kladný výsledek by mohl být přijat jako příznak reakce očí na leptavé nebo silně dráždivé látky. Kladné výsledky získané u alkoholů by se však měly interpretovat opatrně z důvodu rizika nepřiměřené předpovědi.
7. Veškeré postupy u kuřecích očí by měly dodržovat nařízení a postupy použitelné na zkušební postupy zacházení s lidskými materiály nebo materiály získanými ze zvířat, které kromě jiného zahrnují tkáň a mimobuněčné tekutiny. Doporučují se univerzální laboratorní preventivní opatření (15).
8. Omezení zkušební metody spočívá v tom, že i když přihlíží k některým účinkům na oči vyhodnoceným metodou zkoušení podráždění očí na králících a do určité míry i k jejich síle, nebere v úvahu poškození spojivky a duhovky. Ačkoli reverzibilitu lézí rohovky nelze ve zkušební metodě ICE hodnotit samu o sobě, na základě studií o očích králíků bylo přesto navrženo, že by se posouzení počáteční hloubky poškození rohovky mohlo použít k rozlišení mezi nevratnými a vratnými účinky (16). A konečně je třeba uvést, že zkušební metoda ICE neumožňuje posouzení potenciálu soustavné toxicity spojené s expozicí očí.
9. Vyvíjí se úsilí, aby se dále popsala účelnost a omezení zkušební metody ICE pro zjišťování slabých dráždivých látek a nedráždivých látek (viz také bod 48). Uživatelům se rovněž doporučuje, aby organizacím pro ověřování platnosti poskytli vzorky a/nebo údaje pro oficiální hodnocení případného budoucího použití zkušební metody ICE, včetně zjišťování látek se slabými dráždivými a nedráždivými účinky na oči.
10. Každá laboratoř, která poprvé provádí tuto analýzu, by měla použít osvědčené chemické látky uvedené v dodatku 2. Laboratoř může použít tyto chemické látky k prokázání své odborné způsobilosti v používání zkušební metody ICE před předložením údajů ICE pro regulační účely klasifikace nebezpečí.

ZÁSADA ZKOUŠKY

11. Zkušební metoda ICE je organotypický model, který zajišťuje krátkodobé uchování kuřecího oka *in vitro*. V této zkušební metodě se poškození zkoušenou látkou posuzuje určením otoku a zákalu rohovky a zadržování fluoresceinu. Zatímco dva poslední parametry se týkají kvalitativního hodnocení, analýza otoku rohovky zajišťuje kvantitativní hodnocení. Každé měření se buď převádí na kvantitativní hodnotu používanou k výpočtu celkového ukazatele podráždění, nebo je přiřazeno kvalitativní kategorizaci, která se používá ke stanovení klasifikace leptavých a silně dráždivých účinků na oči *in vitro*. Každý z těchto výsledků potom může být použit k předvídaní potenciálu zkoušené látky působit jako látka s leptavými a silně dráždivými účinky na oči *in vivo* (viz kritéria rozhodování).

▼ M2**Zdroj a věk kuřecích očí**

12. Tradičně se pro tuto analýzu používají kuřecí oči získané z jatek, kde se kuřata zabíjejí pro lidskou spotřebu, čímž se eliminuje potřeba laboratorních zvířat. Používají se pouze oči zdravých zvířat, které se považují za vhodné pro vstup do lidského potravinového řetězce.
13. Ačkoli nebyla zpracována kontrolní studie pro hodnocení optimálního věku kuřat, věk a hmotnost kuřat tradičně používaných v této zkušební metodě odpovídá mladým kuřatům tradičně zpracovávaným na jatkách pro drůbež (tj. přibližně 7 týdnů staré, o váze 1,5 – 2,5 kg).

Shromáždování a doprava očí do laboratoře

14. Hlavy by se měly odstranit ihned po usmrcení kuřat obvykle elektrickým šokem a naříznutím krku za účelem zbavení krve. Místní zdroj kuřat blízko laboratoře by měl být umístěn tak, aby hlavy kuřat mohly být dopraveny z jatek do laboratoře dostatečně rychle s cílem minimalizovat zkažení a/nebo bakteriální znečištění. Časový interval mezi shromážděním kuřecích hlav a použitím očí ve zkušební metodě ICE by měl být co nejkratší (zpravidla do dvou hodin) a měl by být prokázán, aby se nenarušily výsledky analýzy. Tyto výsledky vycházejí z kritérií výběru očí a také z reakcí na pozitivní a negativní kontroly. Všechny oči použité v analýze by měly být ze stejné skupiny očí shromážděných v určitý den.
15. Protože oči se oddělují v laboratoři, neporušené hlavy se dopravují z jatek za okolní teploty v umělohmotných krabicích, které jsou navlhčeny ručníky namočenými v izotonickém fyziologickém roztoku.

Kritéria výběru očí používaných v ICE

16. Oči, které mají vysoké základní zbarvení fluoresceinem (tj. $> 0,5$) nebo vysokou hodnotu zákalu rohovky (tj. $> 0,5$) se po jejich odstranění vyřadí.
17. Každá zkušební skupina a souběžná pozitivní kontrola pozůstává nejméně ze třech očí. Skupina pro negativní kontrolu nebo pro kontrolu s rozpouštědlem (používá-li se jiné rozpouštědlo než fyziologický roztok) pozůstává nejméně z jednoho oka.

POSTUP**Příprava očí**

18. Oční víčka se opatrně vyříznou a přitom se dává pozor, aby se nepoškodila rohovka. Neporušenost rohovky se rychle posoudí kápnutím 2 % (objemové hmotnosti) fluoresceinu sodného aplikovaného na povrch rohovky po dobu několika vteřin, který se potom opláchně izotonickým fyziologickým roztokem. Oči ošetřené fluoresceinem se pak zkoumají pod mikroskopem se štěrbinovou lampou, aby se zajistilo, že se rohovka nepoškodí (tj. hodnoty zadržení fluoresceinu a zákalu rohovky $\leq 0,5$).
19. Není-li oko poškozeno, vyřízne se z lebky a přitom se dává pozor, aby se nepoškodila rohovka. Oční bulbus se vyjme z očnice tak, že se chirurgickou pinzetou pevně uchopí mžurka a oční sval se ustříhne zahnutými tupými nůžkami zakončenými hrotem. Je důležité zamezit poškození rohovky nadměrným tlakem (tj. kompresní artefakty).
20. Když je oko vyjmuté z očnice, viditelná část očního nervu by se měla nechat spojena. Jakmile se oko vyjme z očnice, položí se na absorpční podložku a mžurka a jiné pojivové tkáně se ustříhnou.

▼ M2

21. Odstraněné oko se nasadí na nerezavý ocelový držák s rohovkou ve svislé poloze. Držák se potom přenesení do komory chladicího přístroje (16). Držáky by se měly v chladicím přístroji postavit tak, aby kapky izotonického fyziologického roztoku dostávala celá rohovka. Teplota komory chladicího přístroje by měla být řízena na $32 \pm 1,5$ °C. V dodatku 3 je schématický náčrt typického chladicího přístroje a očních držáků, které je možné obchodně získat nebo zkonstruovat. Přístroje mohou být upraveny, aby splňovaly potřeby jednotlivé laboratoře (např. umístění různého počtu očí).
22. Když se oči vloží do chladicího přístroje, znovu se prozkoumají pod mikroskopem se šterbinovou lampou, aby se zjistilo, zda nebyly poškozeny během vyřezávání. Tloušťka rohovky by se v této době měla také měřit na vrcholu rohovky s použitím zařízení pro měření hloubky na mikroskopu se šterbinovou lampou. Oči s: i) hodnotou zadržení fluoresceinu $> 0,5$; ii) zákalem rohovky $> 0,5$; nebo iii) jakýmkoli dalšími znaky poškození by se měly vyměnit. V případě očí nevyřazených na základě jakéhokoli z těchto kritérií se musí vyřadit jednotlivé oči s tloušťkou rohovky, která se o víc než 10 % odchyluje od střední hodnoty pro všechny oči. Uživatelé by si měli být vědomi toho, že mikroskopy se šterbinovou lampou by mohly ukazovat měření různé tloušťky rohovky, je-li rozdílné nastavení šířky šterbiny. Šířka šterbiny by se měla nastavit na 0,095 mm.
23. Poté, co byly oči prozkoumány a schváleny, inkubují se po dobu přibližně 45 až 60 minut, aby se uvedly do rovnováhy se zkušebním systémem před dávkováním. Po době vyrovnání se pro tloušťku rohovky a zákal zaznamená nulové referenční měření, které slouží jako základ (tj. čas = 0). Hodnota fluoresceinu stanovená při oddělování se pro tento koncový bod používá jako základní měření.

Aplikace zkoušené látky

24. Oči se (v držáku) ihned po nulovém referenčním měření vyberou z chladicího přístroje, postaví se do vodorovné polohy a na rohovku se aplikuje zkoušená látka.
25. Tekuté zkoušené látky se zpravidla zkoušejí neředěné, mohou se však ředit, pokud se to považuje za nutné (např. jako součást návrhu studie). Preferovaným ředidlem pro ředěné látky je fyziologický roztok. Za řízených podmínek lze však také použít alternativní ředidla, ale vhodnost jiných ředidel než fyziologického roztoku by se měla prokázat.
26. Tekuté zkoušené látky se aplikují na rohovku tak, že celý povrch rohovky se rovnoměrně pokryje zkoušenou látkou; obvyklý objem je 0,03 ml.
27. Podle možnosti by se pevné látky měly co nejjemněji položit do třecí misky a těrky nebo do srovnatelného drtícího prostředku. Prášek se aplikuje na rohovku tak, že se povrch stejnoměrně pokryje zkoušenou látkou; obvyklé množství je 0,03 g.
28. Zkoušená látka (tekutá nebo pevná) se aplikuje po dobu 10 vteřin a pak se z oka opláchne izotonickým fyziologickým roztokem (přibližně 20 ml) při okolní teplotě. Oko (v držáku) se potom v původní svislé poloze vrátí do chladicího přístroje.

Látky pro kontrolu

29. Do každého pokusu by měly být zařazeny souběžné negativní kontroly nebo kontroly s rozpouštědlem/vehikulem a pozitivní kontroly.

▼ M2

30. Když se zkoušejí 100 % tekuté látky nebo pevné látky, fyziologický roztok se ve zkušební metodě ICE používá pro souběžnou negativní kontrolu, aby se zjistily nespecifické změny ve zkušebním systému a aby se zajistilo, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci.
31. Když se zkoušejí zředěné tekuté látky, do zkušební metody se zařadí skupina pro souběžnou kontrolu s rozpouštědlem/vehikulem, aby se zjistily nespecifické změny ve zkušebním systému a aby se zajistilo, že podmínky analýzy nebudou mít za následek nevhodnou dráždivou reakci. Jak je uvedeno v bodě 25, lze použít pouze rozpouštědlo/vehikul, u kterého se prokázalo, že nemá nepříznivé účinky na zkušební systém.
32. Do každého pokusu se zařadí známá látka s dráždivými účinky na oči jako souběžná pozitivní kontrola, aby se ověřilo, že je vyvolána odpovídající reakce. Protože analýza ICE se v této zkušební metodě používá ke zjišťování leptavých nebo silných dráždivých látek, pozitivní kontrola by měla být referenční látkou, která v této zkušební metodě vyvolá silnou reakci. Aby se však zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný. Měl by se vytvořit dostatek údajů *in vitro* pro pozitivní kontrolu, aby bylo možné vypočítat statisticky stanovený, přijatelný rozsah pozitivní kontroly. Nejsou-li údaje o zkušební metodě ICE z minulosti pro určitou pozitivní kontrolu k dispozici, bude nutné uskutečnit studie za účelem získání těchto informací.
33. Příklady tekutých zkoušených látek pro pozitivní kontroly jsou 10 % kyselina octová nebo 5 % benzalkonium chlorid, zatímco příklady pevných zkoušených látek pro pozitivní kontroly jsou hydroxid sodný nebo imidazol.
34. Srovnávací látky jsou účelné pro hodnocení potenciálu podráždění očí neznámými chemickými látkami nebo specifickými třídami chemických látek nebo produktů nebo pro hodnocení relativního potenciálu podráždění látkou s dráždivými účinky na oči ve specifickém rozmezí dráždivých reakcí.

Měřené koncové body

35. Zkoušené rohovky se hodnotí předběžně ošetřené a hodnocení začíná ve 30, 75, 120, 180 a 240 minutách (\pm 5 minut) po oplachu po ošetření. Tyto časové body zajišťují odpovídající počet měření během čtyřhodinové doby zkoušení a přitom ponechávají dostatek času mezi měřeními, aby potřebná pozorování byla uskutečněna pro všechny oči.
36. Hodnocené koncové body jsou zákal a otok rohovky, zadržování fluoresceinu a morfologické účinky (např. tvoření jizev nebo uvolňování epitelu). Všechny koncové body kromě zadržování fluoresceinu (který je stanoven pouze v předběžné úpravě a 30 minut po expozici zkoušené látky) se určují v každém výše uvedeném časovém bodu.
37. Doporučují se fotografické snímky, aby se zdokumentoval zákal rohovky, zadržování fluoresceinu, morfologické účinky a histopatologie, pokud se provádí.
38. Uživatelům se po konečné zkoušce doporučuje, aby po uplynutí doby čtyř hodin uložili oči do vhodného fixačního prostředku (např. neutrální pufovaný formalin) pro případné histopatologické vyšetření.

▼ M2

39. Otok rohovky se určuje měřením tloušťky rohovky, které se provádí optickým pachymetrem pod mikroskopem se šterbinovou lampou. Vyjadřuje se jako procento a vypočítává se z měření tloušťky rohovky podle následujícího vzorce:

$$\left(\frac{\text{corneal thickness at time} - \text{corneal thickness at time} = 0}{\text{corneal thickness at time} = 0} \right) \times 100$$

40. Střední procento otoku rohovky se u všech zkoušených očí vypočítává pro všechny časové body pozorování. Na základě nejvyšší střední hodnoty otoku rohovky pozorované v jakémkoli časovém bodu se potom každé zkoušené látce přidělí celková hodnota kategorie.
41. Zákal rohovky se vypočítává s použitím plochy rohovky pro hodnocení, která je nejvíce zakalena. Střední hodnota zákalu rohovky se u všech zkoušených očí vypočítává pro všechny časové body pozorování. Na základě nejvyšší střední hodnoty zákalu rohovky pozorované v jakémkoli časovém bodě se potom každé zkoušené látce přidělí celková hodnota kategorie (tabulka 1).

Tabulka 1

Hodnoty zákalu rohovky

Hodnota	Pozorování
0	Žádný zákal.
0,5	Velmi slabý zákal.
1	Rozptýlené nebo roztroušené plochy; detaily duhovky jsou jasně viditelné.
2	Snadno rozeznatelná průhledná plocha; detaily duhovky jsou poněkud nejasné.
3	Silný zákal rohovky; nejsou viditelné žádné konkrétní detaily duhovky; velikost pupily je s těží rozeznatelná.
4	Úplný zákal rohovky; duhovka není viditelná.

42. Střední hodnota zadržování fluoresceinu se u všech zkoušených očí vypočítává pouze pro časový bod 30minutového pozorování, který se používá pro celkovou hodnotu kategorie přidělenou každé zkoušené látce (tabulka 2).

Tabulka 2

Hodnoty zadržování fluoresceinu

Hodnota	Pozorování
0	Žádné zadržování fluoresceinu.
0,5	Velmi slabé zbarvení jednotlivých buněk.
1	Zbarvení jednotlivých buněk se rozšířilo po zkoušené ploše rohovky.
2	Fokální nebo splývající úplné zbarvení jednotlivých buněk.
3	Splývající velké plochy zadržování fluoresceinu rohovky.

▼ **M2**

43. Morfologické účinky zahrnují „jizvy“ na epitelálních buňkách rohovky, „uvolňování“ epitelu, „zdrsnění“ povrchu rohovky a „nalepení“ zkoušené látky na rohovku. Tato zjištění se mohou ve své závažnosti měnit a mohou se vyskytovat souběžně. Klasifikace těchto zjištění je subjektivní podle interpretace výzkumníka.

ÚDAJE A PODÁVÁNÍ ZPRÁV

Hodnocení údajů

44. Výsledky ze zákalu a otoku rohovky a zadržování fluoresceinu by se měly hodnotit zvlášť, aby se pro každý koncový bod vytvořila třída ICE. Třídy ICE pro každý koncový bod se pak spojí za účelem vytvoření klasifikace dráždivých účinků pro každou zkoušenou látku.

Kritéria rozhodování

45. Poté, co byl každý koncový bod vyhodnocen, lze na základě předem určeného rozmezí přiřadit třídy ICE. Interpretace tloušťky (tabulka 3) a zákalu rohovky (tabulka 4) a zadržování fluoresceinu (tabulka 5) s použitím čtyř tříd ICE se uskutečňuje podle těchto měřítek:

Tabulka 3

Klasifikační kritéria ICE pro tloušťku rohovky

Střední otok rohovky (%) (*)	Třída ICE
0 až 5	I
> 5 až 12	II
> 12 až 18 (> 75 min. po zkoušení)	II
> 12 až 18 (≤ 75 min. po zkoušení)	III
> 18 až 26	III
> 26 až 32 (> 75 min. po zkoušení)	III
> 26 až 32 (≤ 75 min. po zkoušení)	IV
> 32	IV

(*) Hodnoty otoku rohovky jsou použitelné pouze, měří-li se tloušťka pod mikroskopem se šterbinovou lampou Haag-Streit BP900 s měřicím přístrojem na měření hloubky č. I a nastavením šířky šterbiny na 9/2, což se rovná 0,095 mm. Uživatelé by si měli být vědomi toho, že mikroskopy se šterbinovou lampou by mohly ukazovat měření různé tloušťky rohovky, je-li rozdílné nastavení šířky šterbiny.

Tabulka 4

Klasifikační kritéria ICE pro zákal

Střední maximální hodnota zákalu (*)	Třída ICE
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 4,0	IV

(*) Viz tabulka 1.

▼ M2

Tabulka 5

Klasifikační kritéria ICE pro střední zadržování fluoresceinu

Střední hodnota zadržování fluoresceinu 30 minut po zkoušení (*)	Třída ICE
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 3,0	IV

(*) Viz tabulka 2.

46. Klasifikace celkových dráždivých účinků *in vitro* pro zkoušenou látku se posuzuje z údajů klasifikace dráždivých účinků, která odpovídá kombinaci kategorií získaných pro otok rohovky, zákal rohovky a zadržování fluoresceinu a s použitím schématu uvedeného v tabulce 6.

Tabulka 6

Klasifikace celkových dráždivých účinků *in vitro*

Klasifikace	Kombinace 3 koncových bodů
Leptavá/silně dráždivá látka	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zákal rohovky ≥ 3 ve 30 min. (nejméně ve 2 očích) Zákal rohovky = 4 v každém časovém bodě (nejméně ve 2 očích) Silné uvolňování epitelu (nejméně v 1 oku)

(*) Výskyt těchto kombinací je méně pravděpodobný.

47. Jak je uvedeno v bodě 1, pokud zkoušená látka není zjištěna jako látka s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči, mělo by se uskutečnit další zkoušení pro účely klasifikace a označování. Zkušební metoda ICE má celkovou přesnost 83 % (120/144) až 87 % (134/154), míru falešné pozitivivity 6 % (7/122) až 8 % (9/116) a míru falešné negativity 41 % (13/32) až 50 % (15/30) pro identifikaci látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči, ve srovnání s údaji ze zkušební metody *in vivo* na očích králíků, klasifikovanými podle klasifikačních systémů EPA (1), EU (2) nebo GHS (3). V případě, že látky v určitých chemických (tj. alkoholy a smáčedla) a fyzikálních (tj. pevné látky) třídách jsou vyloučeny z databáze, přesnost ICE se v klasifikačních systémech EU, EPA a GHS pohybuje v rozmezí od 91 % (75/82) do 92 % (69/75), míra falešné pozitivivity od 5 % (4/73) do 6 % (4/70) a míra falešné negativity od 29 % (2/7) do 33 % (3/9) (4).

48. I když se klasifikace látek s leptavými nebo silně dráždivými účinky na oči pro zkoušenou látku nezíská, údaje ICE mohou být užitečné ve spojení s testovacími údaji z oční zkoušky *in vivo* na králících nebo z náležitě validované zkoušky *in vitro*, aby se dále vyhodnotila účelnost a omezení zkušební metody ICE pro zjištění slabých dráždivých a nedráždivých látek (dokument s pokyny o používání zkušebních metod oční toxicity *in vitro* se zpracovává).

▼ M2**Kritéria přijetí studie**

49. Zkouška se považuje za přijatelnou, pokud souběžné negativní kontroly s vehikulem/ rozpouštědlem a souběžné pozitivní kontroly poskytnou klasifikaci dráždivých účinků, které spadají příslušně do tříd nedráždivých a silně dráždivých/leptavých látek.

Zpráva o zkoušce

50. Zpráva o zkoušce by měla zahrnovat tyto informace, pokud se týkají uskutečňování studie:

Zkoušené látky a látky pro kontrolu

Chemický název (chemické názvy), např. strukturální název používaný službou chemických abstrakt (CAS), s dalšími názvy, jsou-li známy;

registrační číslo (RN) CAS, je-li známo;

čistota a složení látky nebo směsi (v procentu (procentech) podle váhy), jsou-li tyto informace dostupné;

fyzikálně chemické vlastnosti, např. fyzikální stav, těkavost, pH, stálost, třída chemických látek, rozpustnost ve vodě odpovídající provádění studie;

případně ošetření zkoušených látek/látek pro kontrolu před zkoušením (např. zahřátí, mletí);

stálost, je-li známa.

Informace týkající se zadavatele a zkušebního zařízení

Jméno a adresa zadavatele, zkušebního zařízení a vedoucího studie;

určení zdroje očí (např. zařízení, z něhož byly získány);

podmínky skladování a dopravy očí (např. datum a čas shromáždění očí, časový interval před zahájením zkoušení);

specifické vlastnosti zvířat, z nichž byly získány oči, jsou-li tyto vlastnosti k dispozici (např. věk, pohlaví, hmotnost dárce).

*Zdůvodnění použité zkušební metody a protokolu**Úplnost zkušební metody*

Postup používaný k zajištění úplnosti (tj. přesnost a spolehlivost) zkušební metody v průběhu času (např. pravidelné zkoušení vhodných látek, využívání dosavadních údajů negativních a pozitivních kontrol).

Kritéria pro přijatelnou zkoušku

případně přijatelné rozsahy souběžných srovnávacích kontrol na základě dosavadních údajů.

Zkušební podmínky

Popis použitého zkušebního systému;

použitý mikroskop se šterbinovou lampou (např. model);

nastavení přístroje pro používaný mikroskop se šterbinovou lampou;

▼ **M2**

informace o použitých kuřecích očích, včetně prohlášení o jejich kvalitě;

podrobnosti o použitém zkušebním postupu;

koncentrace použité zkoušené látky;

popis všech změn zkušebního postupu;

odkaz na dosavadní údaje modelu (např. negativní a pozitivní kontroly, vhodné látky, srovnávací látky);

popis použitých hodnotících kritérií.

Výsledky

popis jiných pozorovaných účinků;

případně fotografické snímky očí.

Posouzení výsledků

Závěr

LITERATURA

- 1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

- 2) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 ze dne 16. prosince 2008 o klasifikaci, označování a balení látek a směsí, o změně a zrušení směrnice 67/548/EHS a 1999/45/ES a o změně nařízení (ES) č. 1907/2006. Úř. věst. L 353, 31.12.2008, s. 1.

- 3) Organizace spojených národů (OSN) (2007). Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek (GHC), druhé revidované vydání, OSN New York a Ženeva, 2007. Dostupné na:

[http://www.unecce.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html].

- 4) ICCVAM (2007). Zpráva o hodnocení zkušební metody – zkušební metody *oční toxicity in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordináční výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm].

- 5) ESAC (2007). Prohlášení o uzavření retrospektivní studie ICCVAM o orgánových analýzách *in vitro* jako screeningové testy pro zjišťování potenciálních látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči. Dostupné na:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- 6) Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 ze dne 18. prosince 2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, o zřízení Evropské agentury pro chemické látky, o změně směrnice 1999/45/ES a o zrušení nařízení Rady (EHS) č. 793/93, nařízení Komise (ES) č. 1488/94, směrnice Rady 76/769/EHS a směrnic Komise 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Úř. věst. L 396, 30.12.2006, s. 1.

- 7) OECD (2002). Metodika 405. Pokyn OECD pro zkoušení chemických látek. Akutní podráždění/poleptání očí. Dostupné na:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

▼ M2

- 8) ICCVAM (2007). Doporučený protokol zkušební metody ICE ICCVAM. Ve: Zprávě o hodnocení zkušební metody ICCVAM – zkušební metody oční toxicity *in vitro* pro zjišťování látek se silně dráždivými a leptavými účinky na oči. Koordinační výbor mezi různými organizacemi pro ověřování platnosti alternativních metod (ICCVAM) a Středisko mezi různými organizacemi pro hodnocení alternativních toxikologických metod (NICEATM) národního toxikologického programu (NTP). Publikace NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]
- 9) ICCVAM. (2006). Současný stav zkušebních metod *In Vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE). Publikace NIH č.: 06-4513. Research Triangle Park: národní toxikologický program. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm].
- 10) Prinsen, M.K. and Koeter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.
- 11) INVITTOX (1994). Protokol 80: Zkouška odstraněného kuřecího oka (CEET). Dostupné na:

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].
- 12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.
- 13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.
- 14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.
- 15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Dostupné na:

[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].
- 16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- 17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.* 19, 471-480.

▼ M2

- 18) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

- 19) ICCVAM (2006). Základní dokument o přezkumu, současný stav zkušebních metod *in vitro* pro zjišťování látek s leptavými a silně dráždivými účinky na oči: zkušební metoda odděleného kuřecího oka (ICE). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

▼ **M2***Dodatek 1*

DEFINICE

Přesnost: Přesnost shody mezi výsledky zkušební metody a přijatými referenčními hodnotami. Je to měření výsledku zkušební metody a jednoho aspektu „důležitosti“. Termín se často používá namísto „souladu“, kterým se rozumí podíl správných výsledků zkušební metody.

Srovnávací látka: Látka použitá jako norma pro srovnání se zkoušenou látkou. Srovnávací látka by měla mít tyto vlastnosti: i) nesporný a spolehlivý zdroj (nesporné a spolehlivé zdroje); ii) strukturální a funkční podobnost s třídou zkoušených látek; iii) známé fyzikální/chemické vlastnosti; iv) podpůrné údaje o známých účincích a v) známá síla v rozsahu žádoucí reakce.

Rohovka: Průhledná přední část oční bulvy, která zahrnuje duhovku a očníci a propouští světlo dovnitř oka.

Zákal rohovky: Měření rozsahu zákalu rohovky po expozici zkoušené látky. Zvýšený zákal rohovky je příznačný pro poškození rohovky.

Otok rohovky: Objektivní měření rozsahu zduření rohovky ve zkoušce ICE po expozici zkoušené látky. Vyjadřuje se procentuálně a vypočítává se z měření základní tloušťky rohovky (před dávkováním) a tloušťky zaznamenané v pravidelných intervalech po vystavení zkoušené látky ve zkoušce ICE. Stupeň otoku rohovky je příznačný pro poškození rohovky.

Kategorie 1 EPA: Zasažení poleptáním (nevratné poškození oční tkáně) nebo zasažení rohovky či dráždění přetrvávající déle než 21 dní (1).

Kategorie R41 EU: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (2).

Míra falešné negativity: Podíl všech pozitivních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako negativní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Míra falešné positivity: Podíl všech negativních látek falešně zjištěných zkušební metodou jako pozitivní. Je to jeden z ukazatelů výsledku zkušební metody.

Zadržování fluoresceinu: Subjektivní měření rozsahu fluoresceinu sodného ve zkoušce ICE, který je zadržován buňkami epitelu v rohovce po expozici zkoušené látky. Stupeň zadržování fluoresceinu je příznačný pro poškození epitelu rohovky.

GHS (Globálně harmonizovaný systém klasifikace a označování chemických látek): Systém klasifikace chemických látek (látek a směsí) podle standardizovaných typů a úrovní fyzikálních, zdravotních a environmentálních rizik a odpovídajícího označování pomocí prvků informací o nebezpečnosti, jako jsou výstražné symboly nebezpečnosti, signální slova, standardní věty o nebezpečnosti, pokyny pro bezpečné zacházení a bezpečnostní listy, aby byly poskytnuty informace o jejich nepříznivých účincích s ohledem na ochranu lidí (včetně zaměstnavatelů, zaměstnanců, dopravců, spotřebitelů a respondérů nebezpečí) a životního prostředí (3).

▼ M2

Kategorie 1 GHS: Tvorba poškození tkání v oku nebo závažné fyzikální slábnutí vidění po aplikaci zkoušené látky na přední plochu oka, které není plně vratné do 21 dní od aplikace (3).

Nebezpečnost: Základní charakteristika látky nebo situace, která má potenciál vyvolat nepříznivé účinky, jsou-li organismus, systém nebo (sub)populace vystaveny této látce.

Negativní kontrola: Nezkoušená replika, která obsahuje všechny složky zkušebního systému. Tento vzorek se zpracovává se vzorky zkoušené látky a jinými kontrolními vzorky, aby se určilo, zda rozpouštědlo vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

Nedráždivá látka: Látky, které nejsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie I, II, nebo III EPA; kategorie R41 nebo R36 EU; nebo kategorie 1, 2A, nebo 2B GHS (1)(2)(3).

Látka s leptavými účinky na oči: a) Látka, která způsobuje nevratné poškození tkání očí. b) Látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU (1)(2)(3).

Látka s dráždivými účinky na oči: a) látka, která způsobuje nevratnou změnu v oku po aplikaci na přední plochu oka; b) látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie II nebo III EPA, kategorie R36 EU nebo kategorie 2A nebo 2B GHS (1) (2) (3).

Silně dráždivá látka: a) Látka, která způsobuje poškození tkání v oku po aplikaci na přední plochu oka, které není vratné do 21 dní od aplikace, nebo způsobuje vážné fyzické snížení vidění. b) Látky, které jsou klasifikovány jako látky s dráždivými účinky na oči kategorie 1 GHS, kategorie I EPA nebo kategorie R41 EU (1)(2)(3).

Pozitivní kontrola: Replika obsahující všechny složky zkušebního systému a zkoušená s látkou, o níž je známo, že způsobuje pozitivní reakci. Aby se zajistilo, že proměnlivost v reakci na pozitivní kontrolu bude možné časem vyhodnotit, rozsah silné reakce by neměl být nadměrný.

Spolehlivost: Měření rozsahu, v jakém se zkušební metoda může časem použít opakovaně v laboratořích a mezi laboratořemi, když se provádí s použitím stejného protokolu. Hodnotí se to výpočtem laboratorní a mezilaboratorní reprodukovatelnosti a laboratorní opakovatelnosti.

Mikroskop se štěrbinovou lampou: Přístroj používaný k přímému vyšetření oka se zvětšením pod binokulárním mikroskopem a vytvořením stereoskopického, přímého obrazu. Ve zkušební metodě ICE se tento přístroj používá k prohlížení předních struktur kuřecího oka a také k objektivnímu měření tloušťky rohovky s přídatným zařízením na měření hloubky.

Kontrola s rozpouštědlem/vehikulem: Neošetřený vzorek obsahující všechny složky zkušebního systému, včetně rozpouštědla nebo vehikulu, který se zpracovává s ošetřenou zkoušenou látkou a jinými kontrolními vzorky, aby se zjistila základní reakce vzorků zkoušených se zkoušenou látkou rozpuštěnou ve stejném rozpouštědle nebo vehikulu. Pokud se vzorek zkouší se souběžnou negativní kontrolou, ukazuje také, zda rozpouštědlo nebo vehikul vzájemně reaguje se zkušebním systémem.

▼ M2

Stupňovité zkoušení: Strategie postupného zkoušení, kde se všechny existující informace o zkoušené látce přezkoumávají ve stanoveném pořadí s použitím postupu váhy důkazů na každém stupni, aby se zjistilo, zda je k dispozici dost informací pro rozhodnutí o klasifikaci nebezpečnosti, než se postoupí do dalšího stupně. Pokud potenciál dráždivých účinků zkoušené látky lze určit na základě existujících informací, další zkoušení není nutné. Jestliže na základě existujících informací nelze určit potenciál dráždivých účinků zkoušené látky, použije se stupňovitý postupný postup zkoušení na zvířatech, dokud se neurčí jednoznačná klasifikace.

Validovaná zkušební metoda: Zkušební metoda, pro kterou byly zpracovány validační studie s cílem určit důležitost (včetně přesnosti) a spolehlivost pro specifický účel. Je nutné poznamenat, že validovaná zkušební metoda nemusí poskytnout postačující výsledek z hlediska přesnosti a spolehlivosti, aby byla shledána přijatelnou pro navržený účel.

Váha důkazů: Postup zvažování silných a slabých stránek různých informací v dosahování a podpoře závěru týkajícího se potenciálu nebezpečnosti látky.

▼ M2

Dodatek 2

VHODNÉ CHEMICKÉ LÁTKY PRO ZKUŠEBNÍ METODU ICE

Než laboratoře rutinně použijí zkušební metodu, která dodržuje tuto zkušební metodu, měly by prokázat svou odbornou způsobilost správným určením klasifikace 10 látek s dráždivými účinky na oči doporučených v tabulce 1. Tyto látky byly vybrány tak, aby představovaly rozsah reakcí pro místní podráždění/poleptání očí, který vychází z výsledků očních zkoušek *in vivo* na králících (TG 405) (tj. kategorie 1, 2A, 2B nebo neklasifikované či označené podle GHS OSN (3)(7)). S přihlédnutím k validované účelnosti těchto analýz (tj. zjišťování pouze látek s leptavými/silně dráždivými účinky na oči) však existují pouze dva výsledky zkoušky pro klasifikační účely (leptavá/silně dráždivá látka nebo neleptavá/slabá dráždivá látka), aby byla prokázána odborná způsobilost. Dalším kritériem výběru bylo to, zda látka je komerčně dostupná, zda jsou k dispozici kvalitní referenční údaje *in vivo* a zda jsou k dispozici kvalitní údaje ze dvou metod *in vitro*, pro které byly zpracovány metodiky. Z tohoto důvodu byly dráždivé látky vybrány z doporučeného seznamu 122 referenčních látek ICCVAM pro ověření platnosti zkušebních metod oční toxicity *in vitro* (viz dodatek H: Seznam doporučených referenčních látek ICCVAM) (4). Referenční údaje jsou dostupné v základním dokumentu o přezkumu ICCVAM pro zkušební metodu pro zákal a propustnost rohovky u skotu (BCOP) a zkušební metodu odděleného kuřecího oka (ICE) (18) (19).

Tabulka 1

Doporučené látky k prokázání odborné způsobilosti pro ICE

Chemická látka	CASRN	Třída chemických látek (*)	Fyzikální forma	Klasifikace (*) <i>in vivo</i>	Klasifikace (*) <i>in vitro</i>
Benzalkoniumchlorid (5 %)	8001-54-5	Oniová sloučenina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Chlorhexidin	55-56-1	Amin, amidin	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dibenzoyl-L-tartarová kyselina	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická	Pevná	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Kyselina trichlorocetová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Tekutá	Kategorie 1	Leptavá/silně dráždivá látka
Dichlorobenzoylchlorid	4659-45-4	Acylohalogenid	Tekutá	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Ethyl-2-metylacetoacetát	609-14-3	Keton, ester	Tekutá	Kategorie 2B	Neleptavá/slabá dráždivá látka
Dusičnan amonný	6484-52-2	Anorganická sůl	Pevná	Kategorie 2A	Neleptavá/slabá dráždivá látka

▼ **M2**

Chemická látka	CASRN	Třída chemických látek (*)	Fyzikální forma	Klasifikace (*) <i>in vivo</i>	Klasifikace (*) <i>in vitro</i>
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/slabá dráždivá látka
n-hexan	110-54-3	Uhlovodík (acyklický)	Tekutá	Neoznačená	Neleptavá/slabá dráždivá látka

Zkratky: CASRN = registrační číslo podle služby chemických abstrakt

(¹) Chemické třídy byly přiděleny každé zkoušené látce s použitím standardního klasifikačního schématu na základě klasifikačního systému Národní knihovny názvů léků a léčivých látek (MeSH) (dostupný na <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(²) Založena na oční zkoušce *in vivo* na králících (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN (3)(7).

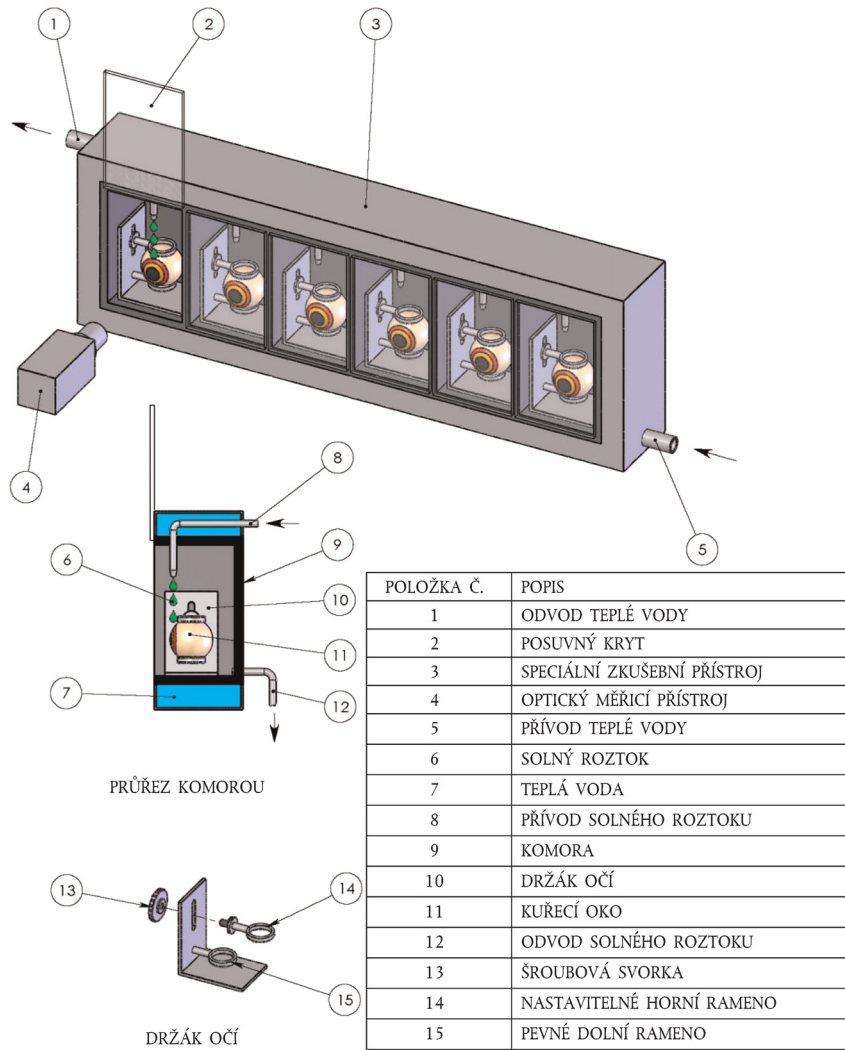
(³) Založena na výsledcích v BCOP a ICE.

▼ M2

Dodatek 3

Schématický náčrt chladicího přístroje a držáků očí ICE

Další obecně použitelné popisy chladicího přístroje a držáku očí viz Burton et al. (17)



▼B**ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY**

OBSAH

- C.1. AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY
- C.2. ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNÍÍ (*DAPHNIA* SP.)
- C.3. ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS A SINIC
- C.4. STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI
- ČÁST I. OBECNÉ ÚVAHY
- ČÁST II. ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC (Metoda C.4-A)
- ČÁST III. MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD (Metoda C.4-B))
- ČÁST IV. ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ CO₂ (Metoda C.4-C)
- ČÁST V. ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ (Metoda C.4-D)
- ČÁST VI. ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (Metoda C.4-E)
- ČÁST VII. ZKOUŠKA MITI (Metoda C.4-F)
- C.5. ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU
- C.6. ROZKLAD – CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU
- C.7. ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE PH
- C.8. TOXICITA PRO ŽÍŽALY
- C.9. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – ZAHN – WELLENISOVA ZKOUŠKA
- C.10. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA S AKTIVOVANÝM KALEM
- C.11. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – ZKOUŠKA NA INHIBICI DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU
- C.12. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST – MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS
- C.13. BIOAKUMULACE: PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH
- C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH
- C.15. ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU
- C.16. ZKOUŠKA AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU
- C.17. VČELA MEDONOSNÁ – ZKOUŠKA AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY
- C.18. STANOVENÍ ADSORPCE/DESORPCE ŠARŽOVITOU ROVNOVÁŽNOU METODOU

▼B

- C.19. ODHAD ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (K_{01}) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)
- C.20. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI *DAPHNIA MAGNA*
- C.21. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI DUSÍKU
- C.22. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI UHLÍKU
- C.23. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V PŮDĚ
- C.24. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA/SEDIMENT
- C.25. AEROBNÍ MINERALIZACE V POVRCHOVÉ VODĚ – SIMULAČNÍ ZKOUŠKA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU
- C.26. ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU *LEMNA* SPP.

▼B**C.1. AKUTNÍ TOXICITA PRO RYBY****1. METODA****1.1. ÚVOD**

Účelem této zkoušky je stanovit akutní letální toxicitu látek pro sladkovodní ryby. Pro usnadnění výběru nejvhodnější zkušební metody (statické, semistatické nebo průtokové) s cílem zajistit dostatečně konstantní koncentrace zkoušené látky po celou dobu experimentu je žádoucí mít pokud možno k dispozici data o rozpustnosti látky ve vodě, o tenzi par, chemické stálosti, disociačních konstantách a o biologické rozložitelnosti látky.

Další informace (např. strukturální vzorec, stupeň čistoty, povaha a podíl významných nečistot v procentech, přítomnost a množství přísad a rozdělovací koeficient n-oktanol/voda) je třeba vzít v úvahu při plánování zkoušky i při interpretaci výsledků.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Akutní toxicitou se rozumí zřetelný nepříznivý účinek, který je v krátké době (řádově ve dnech) v organismu vyvolán expozicí látky. V této zkoušce se akutní toxicita vyjadřuje prostřednictvím střední letální koncentrace (LC_{50}), tj. takové koncentrace látky ve vodě, která během nepřetržité expozice po určitou dobu způsobí úhyn 50 % jedinců ve zkušební skupině ryb.

Všechny koncentrace zkoušené látky se udávají v hmotnosti na jednotku objemu (mg/l). Mohou se také vyjádřit v hmotnostních podílech ($mg \cdot kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Zkoušky s referenčními látkami mohou být provedeny s cílem prokázat, že se reakce zkušebních druhů za laboratorních zkušebních podmínek podstatně nezměnila.

Referenční látky nejsou pro tuto zkoušku stanoveny.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l, s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Ryby se vystaví účinku různým koncentracím zkoušené látky přidávané do vody po dobu 96 hodin. Úhyn se zaznamenává nejméně každých 24 hodin a je-li to možné, vypočtou se při každém pozorování koncentrace, které způsobí úhyn 50 % ryb (LC_{50}).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Kritéria jakosti se vztahují jak na limitní zkoušku, tak na úplný zkušební postup.

Mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 % (nebo jedna ryba, pokud se použije méně než deset ryb).

Koncentrace rozpuštěného kyslíku musí být po celou dobu zkoušky vyšší než 60 % hodnoty nasycení vzduchem.

▼ B

Koncentrace zkoušené látky nesmí po celou zkoušku klesnout pod 80 % původních hodnot koncentrací.

U látek, které se ve zkušebním médiu lehce rozpouštějí a dávají stále roztoky, tj. v podstatné míře netěkají, nerozkládají se, nehydrolyzují nebo se neadsorbují, lze počáteční koncentraci pokládat za ekvivalentní s nominální koncentrací. Musí být potvrzeno, že byly koncentrace po celou zkoušku udrženy a že kritéria jakosti byla dodržena.

U látek, které:

- i) jsou ve zkušebním médiu špatně rozpustné nebo
- ii) mohou vytvářet stále emulze nebo disperse nebo
- iii) jsou ve vodných roztocích nestálé,

musí být počáteční koncentrace brána jako koncentrace naměřená v roztoku (nebo, není-li to technicky možné, ve vodním sloupci) na začátku zkoušky. Koncentrace se stanoví po určité době jejího ustálení, avšak před nasazením zkušebních ryb.

Ve všech uvedených případech musí být během zkoušky provedena další měření s cílem potvrdit skutečné expoziční koncentrace nebo dodržení kritérií jakosti.

pH by se nemělo změnit o více než o 1.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Mohou být použity tři postupy:

Statická zkouška:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká. (Roztoky se během celé zkoušky nemění.)

Semistatická metoda:

Zkouška, při níž zkušební roztok neprotéká, ale je pravidelně po delších časových úsecích (např. po 24 hodinách) zcela vyměňován.

Průtoková metoda:

Zkouška toxicity, při níž se voda ve zkušebních nádržích neustále obměňuje, přičemž se zkoušená látka přivádí s vodou, kterou se zkušební médium obnovuje.

1.6.1. Činidla

1.6.1.1. Roztoky zkoušených látek

Zásobní roztoky o požadované koncentraci se připraví rozpuštěním látky v deionizované vodě nebo ve vodě podle bodu 1.6.1.2.

Zvolené zkoušená koncentrace se připraví ředěním zásobního roztoku. Jsou-li zkoušeny vysoké koncentrace látky, lze látku rozpustit přímo v ředící vodě.

▼B

Látky se obvykle zkouší až do meze jejich rozpustnosti. U některých látek (např. u látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo vysokou hodnotou P_{ow} , nebo u látek, které ve vodě vytvářejí spíše stálé disperse než pravé roztoky) je možné provést zkoušku při koncentraci vyšší, než je mez rozpustnosti, aby bylo zajištěno, že je dosaženo maximální koncentrace odpovídající maximální rozpustnosti/stálosti. Je ovšem nutné, aby tato koncentrace jinak nenarušovala zkušební systém (např. vytvořením filmu na hladině bránícího oxidaci vody atd.).

Pro přípravu zásobních roztoků látek s nízkou rozpustností ve vodě nebo pro usnadnění rozptýlení látky ve zkušebním médiu lze použít ultrazvukovou dispergaci, organická rozpouštědla či emulgátory nebo dispergátory. Použijí-li se takové pomocné látky, měly by všechny zkušební koncentrace obsahovat stejné množství těchto pomocných látek a stejnou koncentraci pomocné látky jako ve zkušebních sériích by měly být exponovány další kontrolní ryby. Koncentrace pomocných látek by měla být minimální a v žádném případě by neměla překročit 100 mg/l zkušebního média.

Zkouška se provede bez úpravy pH. Existují-li známky toho, že dochází k výrazné změně pH, doporučuje se zkoušku opakovat s úpravou pH a výsledky zaznamenat. V takovém případě se upraví pH zásobního roztoku na pH vody k ředění, pokud proti tomu neexistují specifické důvody. Při úpravě pH se dává přednost HCl a NaOH. Úprava pH se provede tak, aby nebyla koncentrace zkoušené látky v zásobním roztoku v podstatné míře změněna. Dojde-li úpravou ve zkušebním médiu k chemické reakci nebo ke srážení, skutečnosti se zaznamenají.

1.6.1.2. *Voda pro chov ryb a ředění*

Může být použita pitná voda (nekontaminovaná potenciálně škodlivými koncentracemi chloru, těžkých kovů nebo jiných látek), kvalitní přírodní voda nebo upravená voda (viz doplněk 1). Upřednostňuje se voda o celkové tvrdosti od 10 do 250 mg/l (vztaženo na CaCO_3) a pH od 6,0 do 8,5.

1.6.2. **Přístroje**

Veškeré přístroje musí být vyrobeny z chemicky inertního materiálu:

- systém pro automatické ředění (pro průtokovou metodu),
- přístroj pro měření koncentrace kyslíku,
- vybavení pro stanovení tvrdosti vody,
- vhodný přístroj pro měření teploty,
- pH-metr.

1.6.3. **Testovací ryby**

Ryby by měly být zdravé a bez zjevných malformací.

▼ B

Použitý druh by měl být zvolen podle praktických kritérií, jako je jejich dostupnost po celý rok, snadný chov, vhodnost pro zkoušení, relativní citlivost k chemickým látkám a jakékoli další významné ekonomické a biologické faktory. Při výběru druhu ryb by měla být také zohledněna potřeba srovnatelnosti získaných dat a mezinárodní harmonizace (1).

Seznam doporučených druhů ryb pro provedení této zkoušky je uveden v doplňku 2; dává se přednost druhům danio pruhované a pstruh duhový.

1.6.3.1. *Chov*

Ryby by měly pocházet pokud možno z jednoho chovu a měly by být stejné délky a stejného stáří. Ryby musí být chovány nejméně 12 dní v těchto podmínkách:

Obsádka:

Vhodná vzhledem k metodě (metoda s recirkulací nebo průtoková metoda) a druhu ryb.

Voda:

Viz 1.6.1.2.

Osvětlení:

Osvětlení 12 až 16 hodin denně.

Koncentrace rozpuštěného kyslíku:

Nejméně 80 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem.

Krmení:

Tříkrát týdně nebo jednou za den; vysazení krmení 24 hodin před začátkem zkoušky.

1.6.3.2. *Mortalita*

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

— mortalita vyšší než 10 % populace za 7 dní:

celá obsádka ryb se vyřadí,

— mortalita 5 až 10 % populace:

v chovu se pokračuje dalších 7 dní.

Nedojde-li k dalším případům úhynu, obsádka se použije, v opačném případě musí být vyřazena,

— mortalita menší než 5 % populace:

obsádka je pro zkoušku použitelná.

1.6.4. **Aklimatizace**

Všechny ryby musí být nejméně na 7 dnů před použitím ve zkoušce nasazeny do vody stejné kvality a stejné teploty, jaká se použije při zkoušce.

▼ B**1.6.5. Zkušební postup**

Před vlastní zkouškou může být provedena předběžná zkouška s cílem získat informace o rozsahu koncentrací, které mají být použity v hlavní zkoušce.

Kromě sérií zkoušek se provede kontrolní zkouška bez zkoušené látky a podle potřeby kontrolní zkouška s pomocnou látkou.

V závislosti na fyzikálních a chemických vlastnostech zkoušené látky se zvolí statická, semistatická nebo průtoková zkouška, aby byla splněna kritéria jakosti.

Ryby se exponují zkoušené látce za níže uvedených podmínek:

- délka expozice: 96 hodin,
- počet ryb: nejméně 7 na každou koncentraci,
- nádrže: vhodný objem vzhledem k doporučené obsádce,
- obsádka: pro statickou a semistatickou zkoušku se doporučuje 1,0 g/l; v průtokovém systému je přijatelná vyšší obsádka,
- zkušební koncentrace: nejméně pět koncentrací, které jsou odstupňovány faktorem nepřevyšujícím 2,2 a které pokrývají rozsah mortality od 0 % do 100 %,
- voda: viz 1.6.1.2,
- osvětlení: osvětlení 12 až 16 hodin denně,
- teplota: podle druhu ryb (doplňek 2), avšak v rámci dané zkoušky kolísající v toleranci ± 1 °C,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku: ne nižší než 60 % hodnoty nasycení vzdušným kyslíkem při dané teplotě,
- krmení: žádné.

Ryby se kontrolují po prvních 2 až 4 hodinách a dále nejméně každých 24 hodin. Ryby se považují za mrtvé, jestliže při dotyku ocasní ploutve nedochází k žádné reakci a nejsou-li patrné žádné dýchací pohyby. Mrtvé ryby se odstraní, jakmile jsou zpozorovány, a úhyn se zaznamená. Zaznamenají se všechny zjevné abnormality (např. ztráta rovnováhy, změny v plavání, chování, v dýchací funkci, v pigmentaci atd.).

Měření pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty se provádí denně.

Limitní zkouška

S využitím postupů popsaných v této metodě může být provedena limitní zkouška s koncentrací 100 mg/l s cílem prokázat, že LC_{50} je vyšší než tato koncentrace.

Je-li povaha zkoušené látky taková, že ve vodě nelze dosáhnout koncentrace 100 mg/l, provede se limitní zkouška při koncentraci odpovídající rozpustnosti této látky v použitém médiu (nebo při maximální koncentraci, kdy látka vytváří stálou disperzi) (viz také bod 1.6.1.1).

▼ B

Limitní zkouška se provede se 7 až 10 rybami a se stejným počtem ryb v kontrole (kontrolách). (Podle teorie binomického rozdělení je při použití 10 ryb a při nulové mortalitě 99,9 % pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než 100 mg/l. Při 7, 8 nebo 9 rybách znamená nulová mortalita nejméně 99 % pravděpodobnost, že je LC_{50} větší než koncentrace použitá v limitní zkoušce.)

Dojde-li k úhynům, musí se provést celá studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky, zaznamenají se.

2. DATA A HODNOCENÍ

Na pravděpodobnostní logaritmický papír se pro každé období, kdy byla prováděna pozorování (24, 48, 72 a 96 hodin), vynese pro každou dobu expozice mortalita v procentech proti koncentraci.

Pokud je to možné, odhadnou se standardními postupy pro každou délku expozice hodnoty LC_{50} a meze spolehlivosti ($p = 0,05$); tyto hodnoty se zaokrouhlí na jednu, nebo nejvýše na dvě platné číslice (příklad zaokrouhlení na dvě platné číslice: 173,5 se zaokrouhlí na 170, 0,127 na 0,13, 1,21 na 1,2).

V případech, kdy je sklon křivky závislosti mortality v procentech na koncentraci látky příliš strmý, aby umožnil výpočet hodnoty LC_{50} , postačuje grafický odhad této hodnoty.

Jestliže dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 2,2 vyvolají mortalitu 0 a 100 %, jsou dostatečnou informací o tom, že se LC_{50} nachází mezi těmito hodnotami.

Zjistí-li se, že není možné udržet stálost nebo homogenitu zkoušené látky, uvede se to ve zprávě a výsledky se interpretují s opatrností.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- údaje o zkušebních rybách (vědecký název, kmen, dodavatel, veškerá předchozí ošetření, velikost a počet ryb použitých při každé zkušební koncentraci),
- zdroj ředící vody a hlavní chemické charakteristiky (pH, tvrdost, teplota),
- u látek s malou rozpustností ve vodě údaj o metodě přípravy zásobních a zkušebních roztoků,
- koncentrace všech pomocných látek,
- přehled použitých koncentrací a veškeré dostupné informace o stálosti zkoušené látky ve zkušebním roztoku při použitých koncentracích,
- jestliže byly provedeny chemické analýzy, údaje o použitých metodách a získané výsledky,
- výsledek limitní zkoušky, pokud byla provedena,
- důvody pro volbu použitého zkušební postupu a podrobnosti o něm (např. statický, semistatický, dávkování, průtoková rychlost, zda byla voda provzdušňována obsádka ryb atd.),

▼ B

- popis zkušebního zařízení,
- světelný režim,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku, hodnoty pH, teplota zkušebních roztoků každých 24 hodin,
- důkaz, že byla splněna kritéria jakosti,
- tabulka kumulativních hodnot mortality při každé koncentraci a při kontrolní zkoušce (a popřípadě při kontrolní zkoušce s pomocnou látkou) při každé z doporučených dob pozorování,
- graf křivky závislosti účinku, vyjádřeného v procentech, na koncentraci na konci zkoušky,
- podle možnosti hodnoty LC_{50} při každé z doporučených dob pozorování (při 95 % intervalu spolehlivosti),
- použité statistické metody stanovení hodnot LC_{50} ,
- při použití referenční látky údaj o získaných výsledcích,
- nejvyšší zkušební koncentrace, která nevyvolala za dobu zkoušky úhyn ryb,
- nejnižší zkušební koncentrace, která vyvolala za dobu zkoušky 100 % mortalitu.

4. **LITERATURA**

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.
- 2) AFNOR -Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* -Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.
- 3) AFNOR- Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* -Static and Flow – Through methods – NFT 90-305 June 1985.
- 4) ISO 7346/1,2 and/3 -Water Quality -Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan -Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.
- 5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.
- 6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (11) und 1 (15).
- 7) JIS k 0102, Acute toxicity test for fish.
- 8) NEN 6506- Water -Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.
- 9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- 10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

- 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. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.
- 15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. tExp. 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.

▼B*Doplňěk 1***Upravená voda***Příklad vhodné ředící vody*

Všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

Voda musí být kvalitní destilovaná nebo deionizovaná s vodivostí menší než 5 $\mu\text{S/cm}$.

Destilační přístroj nesmí obsahovat žádné měděné části.

Zásobní roztoky

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (chlorid vápenatý dihydrát) 11,76 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (síran hořečnatý heptahydrát) 4,93 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

NaHCO_3 (hydrogenuhličitan sodný) 2,59 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

KCl (chlorid draselný) 0,23 g

se rozpustí ve vodě a doplní vodou na 1 litr.

Upravená ředící voda

Smísí se po 25 ml všech čtyř zásobních roztoků a doplní vodou na 1 litr.

Provzdušňuje se, dokud koncentrace rozpuštěného kyslíku neodpovídá koncentraci nasycení vzdušným kyslíkem.

pH musí být $7,8 \pm 0,2$.

Podle potřeby se pH upraví pomocí NaOH (hydroxid sodný) nebo HCl (kyselina chlorovodíková).

Tato ředící voda se nechá 12 hodin stát a nemusí být dále provzdušňována.

Koncentrace úhrnu iontů Ca a Mg v tomto roztoku je 2,5 mmol/l. Poměr množství iontů Ca: Mg je 4:1 a poměr množství iontů Na:k je 10:1. Celková koncentrace alkalických kovů v tomto roztoku je 0,8 mmol/l.

Jakákoli odchylka v přípravě vody k ředění nesmí změnit složení ani vlastnosti vody.

▼ **B**

Doplňěk 2

Druhy ryb doporučené pro zkoušení

Doporučený druh	Doporučený rozsah teplot při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka ryb (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan), danio pruhované	20 až 24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), střevle	20 až 24	5,0 ± 2,5
<i>Cyprinus carpio</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), kapr obecný	20 až 24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck and Schlege 1850), halančik japonský	20 až 24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), živorodka duhová	20 až 24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linneaus 1758), slunečnice modrá	20 až 24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), pstruh duhový	12 až 17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), jelec jesen	20 až 24	6,0 ± 2,0

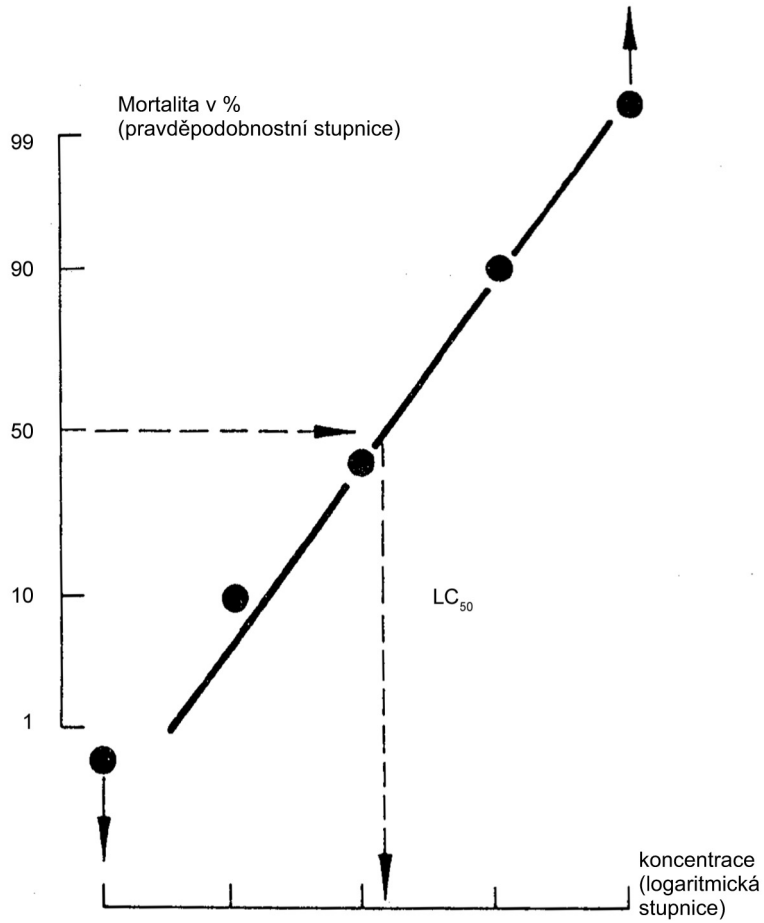
Opatřování ryb

Ryby uvedené v seznamu se snadno chovají nebo jsou dobře dostupné po celý rok. Lze je množit a chovat buď v rybích fámách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

▼ B

Doplňěk 3

Příklad křivky závislosti mortality, vyjádřené v procentech, na koncentraci

Příklad stanovení LC_{50} na pravděpodobnostním logaritmickém papíru

▼B**C.2. ZKOUŠKA AKUTNÍ IMOBILIZACE DAFNÍ (*DAPHNIA SP.*)****1. METODA**

Tato zkušební metoda akutní imobilizace je ekvivalentní testu OECD TG 202 (2004).

1.1. ÚVOD

Tato metoda popisuje zkoušku akutní toxicity ke stanovení účinku chemických látek na dafnie. Stávající zkušební metody byly užity v největším možném rozsahu (1, 2, 3).

1.2. DEFINICE

V kontextu této metody jsou použity tyto definice:

EC₅₀: je koncentrace odhadnutá pro imobilizaci 50 % dafnií během stanovené expoziční doby. Je-li použita jiná definice, musí to být uvedeno spolu s příslušným odkazem.

Imobilizace: Dafnie neschopné plavat do 15 sekund po mírném zamíchání zkušební nádoby jsou pokládány za imobilizované (a to i když stále ještě mohou hýbat tykadly).

1.3. PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Mladé dafnie, staré méně než 24 hodin při zahájení zkoušky, jsou vystaveny zkoušené látce v určitém rozsahu koncentrací po dobu 48 hodin. Imobilizace je zaznamenána po 24 hodinách a po 48 hodinách a porovnána s kontrolními hodnotami. Výsledky jsou analyzovány s cílem vypočítat hodnotu EC₅₀ po 48 hodinách (viz definici v oddílu 1.2). Stanovení hodnoty EC₅₀ pro 24 hodin je volitelné.

1.4. ÚDAJE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro zkoušenou látku by měla být známa rozpustnost ve vodě a tenze par a spolehlivá analytická metoda ke stanovení koncentrace dotyčné látky v zkoušeném roztoku s udanou účinností znovuzáchytu a měly by být dostupné meze stanovení. Užitečné údaje zahrnují strukturní vzorec, čistotu látky, stabilitu ve vodě nebo vůči světlu, rozdělovací koeficient P_{ow} a výsledky zkoušek snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

Poznámka: Návod pro zkoušení látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které činí jejich zkoušení obtížné, je uveden v položce seznamu literatury (4).

1.5. REFERENČNÍ LÁTKY

Hodnoty EC₅₀ pro referenční látky mohou být změřeny pro ověření, že zkušební podmínky jsou spolehlivé. K tomuto účelu jsou doporučeny toxické látky použité v mezinárodních mezilaboratorních zkouškách (1, 5) ⁽¹⁾. Zkoušky s referenčními látkami by měly být prováděny přednostně každý měsíc a nejméně dvakrát ročně.

⁽¹⁾ Výsledky těchto mezilaboratorních zkoušek a technická oprava normy ISO 6341 udává EC₅₀ – 24 hodin pro dvojjodan draselný (K₂Cr₂O₇) v rozmezí 0,6 mg/l až 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KRITÉRIA JAKOSTI

Platnost zkoušky je podmíněna splněním následujících kritérií:

- při kontrolách, včetně kontroly zahrnující solubilizační činidlo, nesmí být imobilizováno více než 10 % dafnií,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky musí být \geq 3 mg/l v kontrolní i ve zkušební nádobě.

Poznámka: Pro první kritérium smí být imobilizováno nebo vykazovat jiné známky choroby nebo stresu, např. odbarvení, neobvyklé chování jako např. zdržování se na povrchu vody, ne více než 10 % kontrolních dafnií.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. Aparatura

Zkušební nádoby a další aparatura, která přichází do styku se zkoušenými roztoky, by měla být zhotovena ze skla nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Zkušebními nádobami běžně budou skleněné zkumavky či kádinky; před každým použitím by měly být umyty standardními laboratorními postupy. Zkušební nádoby by měly být volně překryty ke snížení ztrát vody odparem a k předcházení vnikání prachu do roztoků. Těkavé látky by měly být zkoušeny v plně zaplněných a uzavřených nádobách dostatečně velkých k předcházení příliš nízkým nebo limitním koncentracím kyslíku (viz oddíl 1.6 nebo první odstavce oddílu 1.8.3).

Navíc budou použity některé nebo všechna následující zařízení: kyslíková sonda (s mikroelektrodou nebo jiným vhodným čidlem pro měření koncentrace rozpuštěného kyslíku v nízkoobjemových vzorcích); pH-metr; dostatečný termostat; vybavení pro stanovení koncentrace celkového organického uhlíku (TOC), vybavení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (ChSK); vybavení pro stanovení tvrdosti atd.

1.7.2. Zkušební organismy

Preferovaným zkušebním druhem je *Daphnia magna* Straus, ačkoli v této zkoušce lze využívat i další druhy dafnií (např. *Daphnia pulex*). Na začátku zkoušky by dafnie měly být méně než 24 hodin staré a ke snížení rozptylu je silně doporučeno nepoužívat první generaci potomků. Dafnie by měly pocházet ze zdravého matečného rodu (tj. bez příznaků stresu, jako jsou vysoká úmrtnost, přítomnost samců nebo efípií (vajíček dafnií), zpoždění líhnutí prvních potomků, změna barvy organismů atd.). Všechny organismy použité konkrétní zkoušky by měly pocházet z kultur vypěstovaných ze stejného matečného rodu. Tento rod dafnií musí být chován v kultivačních podmínkách (světlo, teplota, médium) podobných podmínkám v použité zkoušce. Má-li být kultivační médium dafnií použité ve zkoušce odlišné od rutinního kultivačního média dafnií, je správnou praxí zařadit předzkouškové aklimatizační období. K tomuto účelu by generace dafnií měla být chována ve zředěvací vodě při teplotě zkoušky, a to nejméně 48 hodin před začátkem zkoušky.

▼B**1.7.3. Zásobní voda a zředovací voda**

Přírodní voda (povrchová nebo podzemní), rekonstituovaná voda nebo odchlorovaná vodovodní voda je přijatelná jako zásobní a zředovací voda, pokud v ní dafnie přežijí po dobu kultivace, aklimatizace a zkoušení bez známek stresu. Jako zkušební voda je přijatelná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým vlastnostem přijatelných zředovacích vod uvedeným v dodatku 1. Měla by mít stálou jakost během doby zkoušení. Rekonstituovaná voda může být připravena přidáním určitého množství reagentů uznané analytické čistoty k deionizované nebo destilované vodě. Příklady rekonstituované vody jsou uvedeny v položkách seznamu literatury (1, 6) a v dodatku 2. Důležité je, že média obsahující známá chelatační činidla, např. média M4 a M7 uvedená v dodatku 2, by měla být vyloučena ze zkoušení látek obsahujících kovy. Hodnoty pH by měly ležet v rozmezí 6 až 9. Pro *Daphnia magna* je doporučena tvrdost mezi 140 a 250 mg/l (jako CaCO₃), zatímco pro jiné druhy dafnií může být vhodná nižší tvrdost. Zředovací voda může být před zkouškou provzdušňována tak, aby koncentrace rozpuštěného kyslíku dosáhla koncentrace nasycení.

Je-li použita přírodní voda, parametry jakosti by měly být měřeny nejméně dvakrát ročně nebo kdykoli vznikne podezření, že se tyto parametry mohly významně změnit (viz předchozí odstavec a dodatek 1). Rovněž by mělo být provedeno stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Je-li použita odchlorovaná vodovodní voda, je žádoucí každodenní analýza chloru. Pochází-li zředovací voda ze zdrojů povrchových nebo podzemních vod, měla by být stanovena vodivost a celkový organický uhlík (TOC) nebo chemická spotřeba kyslíku (ChSK).

1.7.4. Zkoušené roztoky

Zkoušené roztoky zvolené koncentrace jsou obvykle připraveny ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky by měly být připraveny přednostně rozpouštěním zkoušené látky ve zředovací vodě. Používání rozpouštědel, emulgačních a dispergačních činidel by mělo být podle možností vyloučeno. V některých případech však mohou být taková činidla nutná k přípravě vhodně koncentrovaného zásobního roztoku. Pokyny k výběru vhodných rozpouštědel, emulgačních a dispergačních činidel jsou uvedeny v položce seznamu literatury (4). V žádném případě by koncentrace zkoušené látky ve zkoušených roztocích neměla překročit rozpustnost ve zředovací vodě.

Zkouška by měla být provedena bez úpravy pH. Nezůstane-li pH v rozmezí 6–9, lze provést druhou zkoušku s upraveným pH zásobního roztoku na hodnotu pH zředovací vody před přidáním zkoušené látky. Hodnota pH zásobního roztoku by měla být upravena tak, aby se koncentrace zásobního roztoku významně nezměnila a aby nedošlo k žádné chemické reakci se zkoušenou látkou nebo k jejímu vysrážení. Upřednostněny jsou HCl a NaOH.

▼ B

1.8. POSTUP

1.8.1. **Podmínky expozice**1.8.1.1. *Zkoušené skupiny a kontroly*

Zkušební nádoby jsou naplněny vhodným objemem zředovací vody a roztoku zkoušené látky. Poměr objemů vzduchu a vody v nádobě by měl být stejný pro zkušební i kontrolní skupinu. Dafnie jsou pak vneseny do zkušební nádoby. Pro každou zkoušenou koncentraci a pro kontroly by mělo být užito přinejmenším 20 organismů, přednostně rozdělených do čtyř skupin s pěti organismy v každé skupině. Na každý organismus by mělo být dáno nejméně 2 ml zkoušeného roztoku (tj. objem 10 ml pro pět dafnií ve zkušební nádobě). Zkouška může proběhnout semistaticky doplňováním roztoku nebo v průtočném systému, pokud koncentrace zkoušené látky není stabilní.

Navíc k expoziční řadě musí být provedena jedna řada kontrol zředovací vody, a je-li to relevantní, tak též kontrolní řada obsahující solubilizační činidlo.

1.8.1.2. *Zkušební koncentrace*

Nejsou-li dostupné údaje o toxicitě zkoušené látky, lze rozsah koncentrací konečné zkoušky stanovit testem pro stanovení rozsahu. K tomuto účelu jsou dafnie exponovány řadě široce odstupňovaných koncentrací zkoušené látky. Každé zkušební koncentraci by mělo být exponováno pět dafnií po dobu 48 hodin nebo méně, replikace nejsou zapotřebí. Expoziční dobu lze zkrátit (např. na 24 hodin nebo méně), lze-li vhodné údaje pro test ke stanovení rozsahu získat v kratší době.

Mělo by být použito nejméně pět zkušebních koncentrací. Ty by měly tvořit geometrickou řadu s dělicím faktorem přednostně nepřesahujícím 2,2. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Nejvyšší zkoušená koncentrace by měla přednostně vést ke 100 % imobilizaci, a nejnižší zkoušená koncentrace by neměla mít žádné pozorovatelné účinky.

1.8.1.3. *Inkubační podmínky*

Teplota by měla být v rozsahu 18 °C až 22 °C, a v každé jednotlivé zkoušce by měla být konstantní v rozpětí ± 1 °C. Doporučen je cyklus 16 hodin světla a 8 hodin temna. Úplná tma je rovněž přijatelná, zejména pro zkoušené látky nestabilní na světle.

Zkušební nádoby nesmí být během zkoušky provzdušňovány. Zkouška probíhá bez úpravy hodnot pH. Během zkoušky by dafnie neměly být krmeny.

1.8.1.4. *Doba trvání zkoušky*

Doba trvání zkoušky je 48 hodin.

1.8.2. **Pozorování**

V každé zkušební nádobě by měl být zkontrolován počet imobilizovaných dafnií po 24 a 48 hodinách po zahájení zkoušky (viz definice v oddílu 1.2). Kromě imobilizace by mělo být uvedeno jakékoli nestandardní chování nebo vzhled.

▼B**1.8.3. Analytická měření**

Koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH jsou měřeny na počátku a na konci zkoušky v kontrolách a u zkoušky při nejvyšší koncentraci zkoušené látky. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v kontrolách by měla odpovídat kritériu platnosti (viz oddíl 1.6). Hodnota pH by se neměla standardně v žádné zkoušce změnit o více než 1,5 jednotky. Teplota je obvykle měřena v kontrolních nádobách nebo v okolním ovzduší a měla by být registrována nejlépe nepřetržitě během zkoušky, nebo alespoň na začátku a na konci zkoušky.

Koncentrace zkoušené látky by měla být měřena alespoň při nejvyšší a nejnižší zkoušené koncentraci na začátku a na konci zkoušky (4). Doporučeno je výsledky zakládat na měřených koncentracích. Jsou-li však dostupné důkazy prokazující, že během zkoušky byly koncentrace zkoušené látky uspokojivě udrženy s přesností $\pm 20\%$ jmenovité koncentrace nebo z počáteční naměřené koncentrace, lze výsledky zakládat na jmenovitých nebo počátečních změřených hodnotách.

1.9. MEZNÍ ZKOUŠKA

Mezní zkouška může být provedena postupy popsány v této metodě při koncentraci zkoušené látky 100 mg/l nebo až při její mezní rozpustnosti ve zkoušeném médiu s cílem prokázat, že hodnota EC_{50} je vyšší než tato koncentrace. Mezní zkouška by měla být provedena s 20 dafniemi (přednostně rozdělenými do čtyř skupin po pěti organismech) se stejným počtem v kontrole či v kontrolách. Dojde-li k jakékoli imobilizaci, měla by být provedena úplná studie. Pozorované nestandardní chování by mělo být zaznamenáno.

2. ÚDAJE

Údaje by měly být shrnuty v tabulkách, uvádějících pro každou exponovanou skupinu a kontrolu počet použitých a z toho imobilizovaných dafnií pro všechna pozorování. Procentní podíl imobilizovaných dafnií za 24 hodin a za 48 hodin je vyneseno proti zkoušeným koncentracím. Údaje jsou analyzovány vhodnými statistickými metodami (např. probit analýzou atd.) k výpočtu směrnice dotyčné křivky dávka – odezva a hodnot EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti ($p = 0,05$) (7, 8).

Nelze-li ze získaných údajů vypočítat EC_{50} standardními metodami, měla by být hodnota EC_{50} aproximována jako geometrická střední hodnota z nejvyšší koncentrace nezpůsobující žádnou imobilizaci a nejnižší koncentrace způsobující 100 % imobilitu.

3. ZPRÁVY**3.1. ZKUŠEBNÍ PROTOKOL**

Zkušební protokol musí obsahovat toto:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

▼ B

— chemické identifikační údaje včetně čistoty.

Zkušební druhy:

— zdroj a druhy dafnií *Daphnia*, dodavatel zdroje (je-li znám) a použité kultivační podmínky (včetně zdroje, druhu a množství potravy a frekvence krmení).

Zkušební podmínky:

— popis zkušební nádoby: typ nádoby, objem roztoku, počet dafnií ve zkušební nádobě, počet zkušebních nádob (replikací) při dané koncentraci,

— metody přípravy zásobních a zkoušených roztoků včetně použití jakýchkoli rozpouštědel nebo dispergačních činidel, použité koncentrace,

— podrobné údaje o zředovací vodě: zdroj a charakteristiky jakosti vody (pH, tvrdost, poměr Ca/Mg a Na/K, alkalita, vodivost atd.); složení rekonstituované vody, je-li použita,

— inkubační podmínky: teplota, intenzita a periodičita světla, koncentrace rozpuštěného kyslíku, pH atd.

Výsledky:

— počet a procentní podíl dafnií imobilizovaných nebo vykazujících nepříznivé účinky (včetně nestandardního chování) v kontrolách a v každé exponované skupině, v každém pozorovacím čase a popis povahy pozorovaných účinků,

— výsledky a datum zkoušky provedené s referenční látkou, jsou-li dostupné,

— jmenovité zkoušené koncentrace a výsledky všech analýz ke stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách; regenerační účinnost metody a mez stanovení by rovněž měla být uvedena,

— veškerá fyzikálně-chemická měření teploty, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku provedená během zkoušky,

— hodnoty EC₅₀ po 48 hodinách pro imobilizaci s uvedením intervalu spolehlivosti a grafů proloženého modelu použitého pro jejich výpočet, směrnice křivek dávka – odezva a jejich standardní odchylka; statistické postupy použité ke stanovení hodnoty EC₅₀ (pokud byly měřeny tyto datové položky i pro 24 hodin, měly by být rovněž uvedeny),

— vysvětlení jakýchkoli odchylek od této zkušební metody a případné ovlivnění výsledků těmito odchylkami.

4. LITERATURA

- 1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.
- 2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

- 3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
- 4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
- 5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia*.
- 6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.
- 7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. s. 65–84.
- 8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼ B*DODATEK 1***NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ
ZŘEĐOVACÍ VODY**

Látka	Koncentrace
Hmotné částice (prach)	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný (neiontový) amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organické chlorované pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organicky vázaný chlor	< 25 ng/l



DODATEK 2

PŘÍKLADY VHODNÉ REKONSTITUOVANÉ ZKUŠEBNÍ VODY

Zkušební voda ISO (1)

Zásobní roztok (jednotlivé látky)		K přípravě rekonstituované vody přidejte následující objem zásobních roztoků k 1 litru vody (*)
Látka	Navážka přidaná k 1 litru vody (*)	
Chlorid vápenatý CaCl ₂ , 2H ₂ O	11,76 g	25 ml
Síran hořečnatý MgSO ₄ , 7H ₂ O	4,93 g	25 ml
Hydrouhlíčitan sodný NaHCO ₃	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KCl	0,23 g	25 ml

(*) Voda vhodné čistoty, např. deionizovaná, destilovaná nebo čištěná reverzní osmosou s vodivostí nepřesahující 10 μS/cm.

Elendtovo médium M7 a M4

Aklimatizace na Elendtova média M4 a M7

V některých laboratořích nastaly potíže s přímým vnášením dafnií do médií M4 a M7. Určitý úspěch však byl dosažen postupnou aklimatizací, tj. s předáním z vlastního média do 30 % Elendtova média, poté do 60 % Elendtova média a nakonec do 100 % Elendtova média. Potřebné délky dob aklimatizace mohou být až měsíc.

Příprava

Stopové prvky

Ve vodě vhodné čistoty, např. v deionizované nebo destilované vodě nebo ve vodě přečištěné reverzní osmosou, se nejprve připraví samostatné zásobní roztoky (I) jednotlivých stopových prvků. Z těchto oddělených zásobních roztoků (I) se připraví jeden zásobní roztok (II) obsahující všechny stopové prvky (směsný roztok), tj.:

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ 4H ₂ O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25

▼ B

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
SrCl ₂ 6H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1 230	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ 2H 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	5 000	2 000	—	—
FeSO ₄ 7H ₂ O	1 991	2 000	—	—

Jak roztok Na₂ EDTA, tak roztok FeSO₄ se připraví samostatně, spojí se a ihned se autoklávuji.

Získají se:

2 l Fe-EDTA roztoku		1 000	20,0	5,0
---------------------	--	-------	------	-----

Média M4 a M7

Média M4 a M7 se připraví ze zásobního roztoku II, makroživin a vitaminů tímto způsobem:

	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobní roztok II (obsahující kombinaci stopových prvků)		20	50	50
Zásobní roztok makroživin (jednotlivá látka)				
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 · 9H 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

▼ B

	Množství přidané do vody (mg/l)	Koncentrace (vzhledem k médiu M4)	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média II (ml/l)	
			M4	M7
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok	—	10 000	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním 3 vitaminů do 1 litru vody takto:				
Thiamin-hydrochlorid	750	10 000		
Kyanokobalamin (B ₁₂)	10	10 000		
Biotin	7,5	10 000		

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se uchovává v malých zmrazených podílech. Vitaminy se přidávají do média krátce před použitím.

Poznámka: Vysrážení solí při přípravě kompletního média se zabrání přidáním podílů zásobních roztoků do přibližně 500–800 ml deionizované vody a objem se poté doplní na 1 litr.

Poznámka: Poprvé byly informace o médiu M4 uvedeny v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Proto-plasma*, 154, 25–33.

▼ **M1****C.3 ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU SLADKOVODNÍCH ŘAS A SINIC****1. METODA**

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 201 (2006) (1).

1.1 ÚVOD

Zkušební metody se pravidelně přezkoumávají a aktualizují s ohledem na vědecký pokrok. Zkušební metoda C.3 musela být přepracována tak, aby zahrnovala další druhy a splňovala požadavky na hodnocení nebezpečnosti a klasifikace chemických látek. Přepracování bylo dokončeno na základě rozsáhlých praktických zkušeností, vědeckého pokroku na poli studií toxicity řas a širokého uplatňování příslušných právních předpisů od přijetí původního znění.

1.2 DEFINICE

Pro účely této zkušební metody se používají následující definice a zkratky:

Biomasa: je suchá hmotnost živé hmoty přítomné v populaci vyjádřená ve vztahu k danému objemu; např. mg řas/litr zkušebního roztoku. „Biomasa“ je obvykle definována jako hmota, ale v rámci této zkoušky se toto slovo používá pro hmotu vztahenou na objem. V této zkoušce se obvykle měří náhrady biomasy, například počet buněk, fluorescence atd., a používání termínu „biomasa“ tedy odkazuje na tyto náhradní míry.

Variační koeficient: je bezrozměrná veličina proměnlivosti parametru, definovaná jako poměr směrodatné odchylky a střední hodnoty. Lze jej rovněž vyjádřit jako procentuální údaj. Střední variační koeficient průměrné specifické růstové rychlosti v kontrolních kulturách použitých k opakování se vypočítává následovně:

- 1) Vypočítejte % variační koeficient průměrné specifické růstové rychlosti z denních růstových rychlostí nebo růstových rychlostí po jednotlivých časových úsecích pro příslušné opakování.
- 2) Vypočítejte střední hodnotu ze všech hodnot vypočítaných v bodě 1 pro získání středního variačního koeficientu denní specifické růstové rychlosti nebo specifické růstové rychlosti po jednotlivých časových úsecích v kontrolních kulturách použitých k opakování.

EC_x: je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k x% (např. 50 %) snížení růstu testovacího organismu (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od plné či normální doby trvání zkoušky). Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se v příslušných případech používají symboly „E_rC“ a „E_yC“.

Růstové médium: je úplné syntetické kultivační médium, v němž rostou zkušební řasy při expozici zkoušené látky. Zkoušená látka bude za normálních podmínek ve zkušebním médiu rozpuštěna.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost): je logaritmické zvýšení biomasy během období expozice.

▼ M1

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): je nejnižší zkušební koncentrací, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na snížení růstu (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (No Observed Effect Concentration, NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Proměnná odezvy: je proměnná pro odhad toxicity odvozená z jakýchkoliv naměřených parametrů, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. U této metody jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují přímo z měření biomasy nebo jakékoliv z uvedených náhrad.

Specifická růstová rychlost: je proměnná odezvy definovaná jako kvocient rozdílu přirozených logaritmů sledovaného parametru (v této zkušební metodě je jím biomasa) a příslušného časového období.

Výtěžek: je hodnota proměnné měření na konci expoziční doby minus hodnota proměnné měření na počátku expoziční doby pro vyjádření nárůstu biomasy během zkoušky.

1.3 POUŽITELNOST ZKUŠEBNÍ METODY

Tato zkušební metoda se nejsnadněji používá pro látky rozpustné ve vodě, které za podmínek zkoušky pravděpodobně ve vodě zůstanou. Pro zkoušení látek, které jsou těžké, silně adsorbují, jsou zbarvené, mají nízkou rozpustnost ve vodě, nebo látek, které mohou nepříznivě ovlivňovat dostupnost živin či minerálů ve zkušebním médiu, mohou být potřebné určité úpravy popsaného postupu (např. uzavřený systém, klimatizace zkušebních nádob). Pokyny k některým vhodným úpravám jsou uvedeny v literatuře (2, 3 a 4).

1.4 PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Účelem této zkoušky je stanovit účinek látky na růst sladkovodních mikrořas a/nebo sinic. Exponenciálně rostoucí testovací organismy jsou vystaveny zkoušené látce v dávkových kulturách obvykle po dobu 72 hodin. Navzdory relativně krátké době trvání zkoušky lze posoudit účinky na několik generací.

Systémovou odezvou je snížení růstu v řadě kultur řas (zkušebních jednotek) vystavených různým koncentracím zkoušené látky. Odezva se vyhodnocuje jako funkce expoziční koncentrace v porovnání s průměrným růstem neexponovaných kontrolních kultur použitých k opakování. Pro plné vyjádření systémové odezvy na toxické účinky (optimální citlivost) se kultury ponechají růst exponenciálně bez omezení za dostatečných vyživovacích podmínek a nepřetržitě osvětlení po dostatečnou dobu, aby bylo možné změřit snížení specifické růstové rychlosti.

▼ **M1**

Růst a inhibice růstu se kvantifikují měřeními biomasy řas jakožto funkce času. Biomasa řas se definuje jako suchá hmotnost na objem, např. mg řas/litr zkušební roztoku. Ovšem suchá hmotnost se měří obtížně, proto se používají náhradní parametry. Z těchto náhrad se nejčastěji používají počty buněk. Mezi další náhradní parametry patří buněčný objem, fluorescence, optická hustota atd. Je třeba znát přepočítávací faktor mezi naměřeným náhradním parametrem a biomasou.

Zkoumaným účinkem je inhibice růstu vyjádřená jako logaritmické zvýšení biomasy (průměrná specifická růstová rychlost) během expoziční doby. Z průměrných specifických růstových rychlostí zaznamenaných v řadě zkušebních roztoků se stanoví koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici růstové rychlosti (např. 50 %) a vyjádří se jako E_rC_x (např. E_rC_{50}).

Při použití této metody v rámci práva EU by měl být výpočet výsledků založen na průměrné specifické růstové rychlosti, a to z důvodů uvedených v bodě 2.2. Další proměnnou odezvy použitou v této zkušební metodě je výtěžek, který může být nutný ke splnění specifických právních požadavků v některých zemích. Je definován jako biomasa na konci expoziční doby minus biomasa na počátku expoziční doby. Z výtěžku zaznamenaného v řadě zkušebních roztoků se vypočítá koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici výtěžku (např. 50 %) a vyjádří se jako E_yC_x (např. E_yC_{50}).

Kromě toho se může statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

1.5 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota, stálost na světle, stálost v podmínkách zkoušky, vlastnosti světelné absorpce, pK_a a výsledky studií transformace včetně biologické rozložitelnosti ve vodě.

Měly by být známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě, její rozdělovací koeficient oktanol/voda ($P_{o/v}$) a tlak jejích par a měla by být k dispozici validovaná metoda kvantitativního stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to s doloženou výtěžností a mezi detekce.

1.6 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako prostředek kontroly zkušební postupu lze zkoušet referenční látku (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezinárodní kroužkové zkoušce (4). Dichroman draselný lze rovněž použít jako referenční látku pro zelené řasy. Je žádoucí zkoušet referenční látku nejméně dvakrát ročně.

1.7 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněna tato kritéria reprodukční schopnosti:

▼ **M1**

- Biomasa by se měla v kontrolních kulturách během 72hodinové zkušební doby zvýšit exponenciálně, a to nejméně šestnáctkrát. To odpovídá specifické růstové rychlosti $0,92 \text{ den}^{-1}$. U nejčastěji používaných druhů je obvykle růstová rychlost výrazně vyšší (viz dodatek 1). Může se stát, že se toto kritérium nesplní, pokud se používají druhy, které rostou pomaleji než druhy uvedené na seznamu v dodatku 1. V takovém případě je třeba prodloužit zkušební dobu, aby bylo dosaženo nejméně šestnáctinásobného růstu kontrolních kultur, přičemž růst musí být během zkušební doby exponenciální. Zkušební dobu lze zkrátit až na minimální dobu 48 hodin, aby se během zkoušky udržel neomezený exponenciální růst, pokud bude dosaženo minimálního násobícího koeficientu 16.
- Střední variační koeficient pro specifické růstové rychlosti v jednotlivých obdobích (dny 0–1, 1–2 a 2–3 při 72hodinové zkoušce) v kontrolních kulturách (viz bod 1.2 odstavec „variační koeficient“) nesmí překročit 35 %. Pro výpočet specifické růstové rychlosti v jednotlivých obdobích viz bod 2.2.1 druhý odstavec. Toto kritérium platí pro střední hodnotu variačních koeficientů vypočítaných pro kontrolní kultury použité k opakování.
- Variační koeficient průměrných specifických růstových rychlostí během celého zkušební období u kontrolních kultur použitých k opakování nesmí překročit 7 % u zkoušek s *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*. U jiných méně často zkoušených druhů by hodnota neměla překročit 10 %.

1.8 POPIS METODY

1.8.1 **Přístroje a pomůcky**

Zkušební nádoby a jiné přístroje a pomůcky, které přijdou do styku se zkušebními roztoky, by měly být celoskleněné nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Jednotlivé díly je zapotřebí důkladně vymýt, aby bylo zajištěno, že žádné organické ani anorganické nečistoty nebudou moci narušovat růst řas nebo složení zkušebních roztoků.

Zkušebními nádobami budou za normálních podmínek skleněné baňky takových rozměrů, aby pojaly dostatečný objem kultury pro měření během zkoušky a umožnily dostatečný hmotnostní přenos CO_2 z atmosféry (viz bod 1.8.9 druhý odstavec). Je třeba mít na paměti, že objem kapaliny musí být dostačující pro analytická stanovení (viz bod 1.8.11 pátý odstavec).

Kromě toho bude potřebné veškeré následující vybavení nebo jeho část:

- Kultivační zařízení: doporučuje se místnost nebo komora, v níž lze udržovat zvolenou inkubační teplotu na $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.
- Přístroje na měření světla: je důležité mít na paměti, že metoda měření intenzity světla a zejména typ snímače (kolektoru) ovlivní naměřenou hodnotu. Měření by se mělo nejlépe provádět pomocí kulového (4π) snímače (reaguje na přímé a odražené světlo ze všech úhlů nad a pod rovinou měření), nebo 2π snímače (reaguje na světlo ze všech úhlů nad rovinou měření).

▼ **M1**

— Zařízení pro stanovení biomasy řas. Počet buněk, který je nejčastěji používaným náhradním parametrem pro biomasu řas, lze určit pomocí elektronického počítače částic, mikroskopu s počítačí komůrkou nebo průtokovým cytometrem. Další náhrady biomasy lze měřit průtokovým cytometrem, fluorimetrem, spektrofotometrem nebo kolorimetrem. Je užitečné vypočítat faktor pro konverzi počtu buněk na suchou hmotnost. Aby bylo možné zajistit užitečná měření při nízkých koncentracích biomasy při použití spektrofotometru, může vzniknout nutnost používat květy s dráhou světla nejméně 4 cm.

1.8.2 **Testovací organismy**

Lze použít několik druhů nevázaných mikrořas a sinic. Kmeny uvedené v dodatku 1 se ukázaly jako vhodné na základě zkušební metody postupu uvedeného v této zkušební metodě.

Jestliže se použijí jiné druhy, je třeba uvést ve zprávě kmen a/nebo původ. Musí se potvrdit, že lze udržovat exponenciální růst vybraných zkušebních řas po zkušební dobu za převažujících podmínek.

1.8.3 **Růstové médium**

Doporučují se dvě alternativní růstová média, médium OECD a AAP. Složení těchto médií je uvedeno v dodatku 2. Je třeba mít na paměti, že počáteční hodnota pH a kapacita pufru (regulující zvýšení pH) těchto dvou médií jsou odlišné. Proto mohou být výsledky zkoušek odlišné v závislosti na použitém médiu, zejména při zkoušení ionizujících látek.

Pro určité účely může být nezbytná úprava růstových médií, např. když se zkouší kovy a chelátotvorná činidla nebo se provádí zkoušky při různých hodnotách pH. Použití upraveného média musí být podrobně popsáno a zdůvodněno (3, 4).

1.8.4 **Počáteční koncentrace biomasy**

Počáteční biomasa musí být stejná ve všech zkušebních kulturách a dostatečně nízká, aby umožňovala exponenciální růst po celou inkubační dobu bez rizika vyčerpání živin. Počáteční biomasa by neměla překročit 0,5 mg/l suché hmotnosti. Doporučují se následující počáteční koncentrace buněk:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	5×10^3 – 10^4	buněk/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	2 – 5×10^3	buněk/ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	buněk/ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	buněk/ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	5×10^4 – 10^5	buněk/ml

1.8.5 **Koncentrace zkoušené látky**

Koncentrační rozmezí, ve kterém lze očekávat účinky, lze určit na základě výsledků orientačních zkoušek. Pro závěrečnou definitivní zkoušku je zapotřebí vybrat alespoň pět koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2. U zkušebních látek vykazujících plochou křivku závislosti odezvy na koncentraci může být opodstatněný vyšší faktor. Řady koncentrací by nejlépe měly pokrývat rozmezí způsobující 5–75 % inhibici růstové rychlosti řas.

▼ M1**1.8.6 Opakování a kontroly**

Plán zkoušky by měl zahrnovat tři opakování s každou zkušební koncentrací. Jestliže se stanovení NOEC nepožaduje, plán zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet opakování na příslušnou koncentraci. Počet kontrolních opakování musí být nejméně tři a v ideálním případě by měl být dvojnásobkem počtu opakování používaných pro každou zkušební koncentraci.

Pro analytická stanovení koncentrací zkušební látky lze připravit samostatnou sadu zkušebních roztoků (viz bod 1.8.11 čtvrtý a šestý odstavec).

Pokud se k rozpouštění zkoušené látky používá rozpouštědlo, musí být do plánu zkoušky zahrnuty dodatečné kontroly obsahující rozpouštědlo o stejné koncentraci, jaká se používá ve zkušebních kulturách.

1.8.7 Příprava očkovací kultury

K přizpůsobení zkušebních řas na podmínky zkoušky a zajištění toho, aby řasy byly v exponenciální růstové fázi, když se použijí pro naočkování zkušebních roztoků, se očkovací kultura připravuje ve zkušebním médiu 2 až 4 dny před zahájením zkoušky. Biomasy řas je třeba upravit, aby mohl v očkovací kultuře převážet do zahájení zkoušky exponenciální růst. Očkovací kultura se musí inkubovat za stejných podmínek jako zkušební kultury. Měřte nárůst biomasy v očkovací kultuře, aby bylo zajištěno, že je růst v rámci normálního rozmezí pro zkušební kmen za podmínek kultivace. Příklad postupu pro kultivaci řas je popsán v dodatku 3. Aby se zabránilo synchronnímu dělení buněk během zkoušky, může být potřebné provést druhý krok propagace očkovací kultury.

1.8.8 Příprava zkušebních roztoků

Všechny zkušební roztoky musí obsahovat stejné koncentrace růstového média a počáteční biomasy zkušebních řas. Zkušební roztoky zvolených koncentrací se obvykle připravují smísením zásobního roztoku zkoušené látky s růstovým médiem a očkovací kulturou. Zásobní roztoky se obvykle připravují rozpouštěním látky ve zkušebním médiu.

Jako nosiče pro přidávání látek o nízké rozpustnosti ve vodě do zkušebního média mohou být použita rozpouštědla, např. aceton, *tert*-butylalkohol a dimethylformamid (2, 3). Koncentrace rozpouštědla by neměla překročit 100 µl/l a do všech kultur (včetně kontrol) ve zkušební řadě by měla být přidána stejná koncentrace rozpouštědla.

1.8.9 Inkubace

Zakryjte zkušební nádoby zátkami, které propouští vzduch. Nádoby se protřepou a umístí se do kultivačního zařízení. Během zkoušky je nezbytné udržovat řasy v suspensi a umožnit přenos CO₂. Za tímto účelem je třeba provádět nepřetržité třepání nebo míchání. Kultury se udržují při teplotě 21–24 °C udržované s přesností na ±2 °C. U jiných druhů, než jsou druhy uvedené v seznamu v dodatku 1, např. u tropických druhů, mohou být vhodné vyšší teploty, pokud lze ovšem splnit kritéria validity. Doporučuje se umísťovat baňky náhodně a denně je v inkubátoru přemísťovat.

▼ **M1**

Hodnota pH kontrolního média by neměla během zkoušky vzrůst o více než 1,5. U kovů a sloučenin, které částečně ionizují při pH okolo pH zkoušky může být nezbytné omezit posun pH pro získání reprodukovatelných a dobře definovaných výsledků. Posun o $< 0,5$ pH je technicky proveditelný a lze jej dosáhnout zajištěním adekvátní rychlosti přesunu hmoty CO_2 z okolního vzduchu do zkušebního roztoku, např. zvýšením rychlosti třepání. Další možnosti je snížit potřebu CO_2 snížením počáteční biomasy nebo doby trvání zkoušky.

Povrch, kde jsou kultury inkubovány, by měl být trvale osvětlen jednotným fluorescenčním světlem, např. „chladným bílým“ nebo „denním“ světlem. Jednotlivé kmeny řas a sinic mají různé požadavky na osvětlení. Intenzita světla by měla být zvolena tak, aby vyhovovala použitému testovacímu organismu. Pro doporučené druhy zelených řas se intenzita světla na úrovni zkušebních roztoků zvolí v rozmezí $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, přičemž se měří ve fotosynteticky efektivním rozsahu vlnových délek od 400 do 700 nm pomocí vhodného snímače. Některé druhy, zejména *Anabaena flos-aquae*, dobře rostou při nízkých intenzitách osvětlení a mohou být při vysokých intenzitách poškozeny. U takových druhů by měla být zvolena průměrná intenzita světla $40\text{--}60 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. (Měří-li se intenzita luxmetry, ekvivalentní rozpětí 4 440 až 8 880 luxů pro chladné bílé světlo odpovídá přibližně doporučené světelné intenzitě $60\text{--}120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Intenzita světla se nesmí lišit o více než $\pm 15 \%$ od průměrné intenzity světla nad plochou inkubace.

1.8.10 **Doba trvání zkoušky**

Zkouška obvykle trvá 72 hodin. Lze však použít kratších nebo delších dob trvání zkoušky, pokud lze splnit všechna kritéria validity uvedená v bodě 1.7.

1.8.11 **Měření a analytická stanovení**

Biomasa řas se během doby zkoušky určí v každé baňce nejméně jednou denně. Jestliže se měření provádí na malých objemech vyjmutých ze zkušebního roztoku pipetou, neměly by se nahrazovat.

Měření biomasy se provádí ručním počítáním buněk pod mikroskopem nebo pomocí elektronického počítače částic (počty buněk a/nebo biologický objem). Alternativní techniky, např. průtoková cytometrie, fluorescence chlorofylu *in vitro* nebo *in vivo* (6, 7) nebo optická hustota, lze použít za předpokladu, že je možné prokázat uspokojivou korelaci s biomasou v rozmezí, v němž se biomasa během zkoušky vyskytuje.

pH roztoků se měří na počátku a na konci zkoušky.

Pokud je dostupný analytický postup k určení zkoušené látky v rozmezí použitých koncentrací, zkušební roztoky je třeba analyzovat, aby se ověřily počáteční koncentrace a udržení expozičních koncentrací během zkoušky.

▼ M1

Analýza koncentrace zkoušené látky na počátku a konci zkoušky při nízké a vysoké zkušební koncentraci a koncentrace okolo očekávané EC₅₀ mohou dostačovat, jestliže je pravděpodobné, že se budou během zkoušky expoziční koncentrace lišit o méně než 20 % od nominálních hodnot. Analýza všech zkušebních koncentrací na počátku a konci zkoušky se doporučuje v případech, kdy je nepravděpodobné, že koncentrace zůstanou v rozmezí 80 až 120 % nominální hodnoty. U těkavých, nestabilních nebo silně adsorbujících zkoušených látek se doporučuje provést dodatečný odběr vzorků k analýze v 24hodinových intervalech během expoziční doby s cílem lépe definovat ztrátu zkoušené látky. U těchto látek jsou zapotřebí dodatečná opakování. Ve všech případech je třeba provést určení koncentrací zkoušené látky při každé zkušební koncentraci pouze u jedné nádoby k opakování (nebo u sdruženého obsahu nádob jednoho opakování).

Zkušební média specificky připravená k analýze expozičních koncentrací během zkoušky by měla být exponována stejným způsobem jako zkušební média použitá ke zkoušení, tj. měla by být naočkována řasami a inkubována za identických podmínek. Jestliže se požaduje analýza koncentrace rozpuštěné zkušební látky, může být nezbytné oddělit řasy od média. Oddělení by se mělo nejlépe provádět odstředováním při nízké síle *g* dostatečně pro usazení řas.

Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, analýza výsledků by měla být založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené látky (3, 8).

Zkouška inhibice růstu řas je dynamičtější zkušební systém než většina jiných krátkodobých zkoušek vodní toxicity. V důsledku toho může být obtížné definovat skutečné expoziční koncentrace, zvláště u adsorbujících látek zkoušených při nízkých koncentracích. V takových případech vymizení látky z roztoku adsorpcí do zvyšující se biomasy řas neznámá, že se ztratila ze zkušebního systému. Při analýze výsledku zkoušky je třeba zkontrolovat, zda-li je pokles koncentrace zkoušené látky v průběhu zkoušky doprovázen poklesem inhibice růstu. Pokud tomu tak je, lze zvážit použití vhodného modelu popisujícího pokles koncentrace zkoušené látky (8). Pokud tomu tak není, může být vhodné založit analýzu výsledků na počátečních (nominálních či naměřených) koncentracích.

1.8.12 Další pozorování

Pro ověření normálního a zdravého vzhledu očkovací kultury a sledování jakéhokoliv abnormálního vzhledu řas (které může být způsobeno expozicí zkoušené látky) na konci zkoušky by mělo být provedeno mikroskopické pozorování.

▼ **M1****1.8.13 Limitní zkouška**

Za určitých okolností, např. pokud předběžná zkouška naznačuje, že zkoušená látka nemá žádné toxické účinky při koncentracích až do 100 mg l^{-1} nebo až do meze své rozpustnosti ve zkušebním médiu (podle toho, co je nižší), může být provedena limitní zkouška zahrnující porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy v jedné exponované skupině (100 mg l^{-1} nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti). Důrazně se doporučuje podpořit tuto zkoušku analýzou expozičních koncentrací. Všechny dříve popsané zkušební podmínky a kritéria validity se vztahují i na limitní zkoušku s výjimkou toho, že by mělo být provedeno alespoň šest opakování s exponovanými vzorky. Proměnné odezvy v kontrolní a exponované skupině mohou být analyzovány pomocí statistického testu pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu. Jestliže rozptyly obou skupin nejsou shodné, je třeba provést t-test upravený pro rozdílné rozptyly.

1.8.14 Úprava pro intenzivně zbarvené látky

Ozáření (intenzita světla) by měla dosahovat hodnot na nejvyšším konci rozsahu předepsaného v této zkušební metodě: $120 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ nebo více.

Dráha světla by měla být zkrácena snížením objemu zkušebních roztoků (v rozmezí 5–25 ml).

Je nezbytné dostatečné míchání (například mírným protřepáváním), aby bylo dosaženo vysoké frekvence expozice řas vysoké ozáření na povrchu kultury.

2. DATA**2.1 VYNÁŠENÍ RŮSTOVÝCH KŘIVEK**

Biomasa ve zkušebních nádobách může být vyjádřena v jednotkách náhradního parametru použitého pro měření (např. počet buněk, fluorescence).

Pro vynesení růstových křivek do grafu sestavte tabulku odhadovaných koncentrací biomasy ve zkušebních kulturách a kontrolách společně s koncentracemi zkušebního materiálu a časy měření zaznamenanými v rozlišení nejméně na celé hodiny. V tomto prvním stadiu mohou být užitečné jak logaritmické, tak lineární stupnice, ale logaritmické stupnice jsou povinné a obecně poskytují lepší zobrazení odchylek ve vzorci růstu během zkušebního období. Nezapomeňte, že exponenciální růst má při vynesení na logaritmické stupnici podobu přímky a že sklon (směrnice) přímky ukazuje specifickou růstovou rychlost.

Po vynesení proveďte, zda-li rostou kontrolní kultury exponenciálně očekávanou rychlostí po celou dobu zkoušky. Kriticky zhodnoťte všechny datové body a vzhled grafů a zkontrolujte, zda v hrubých datech a postupech nejsou chyby. Zejména zkontrolujte všechny datové body, u nichž se zdá, že se odchylují na základě systematické chyby. Pokud je zřejmé, že lze rozpoznat procesní chyby a/nebo je lze považovat za vysoce pravděpodobné, specifický datový bod se označí jako odlehlá hodnota a nebude zahrnut do následné statistické analýzy. (Nulová koncentrace řas v jedné ze dvou nebo tří nádob použitých k opakování může ukazovat na to, že nádoba nebyla správně naočkována nebo byla nesprávně vyčištěna.) Důvody k odmítnutí datového bodu jako odlehlé hodnoty musí být jasně uvedeny ve zkušebním protokolu. Přijatelnými důvody jsou pouze (vzácné) procesní chyby a nikoli jen malá preciznost. Statistické postupy pro rozpoznání odlehlé hodnoty mají u tohoto typu problému pouze omezené použití a nemohou nahradit odborné posouzení. Odlehlé hodnoty (takto označené) by nejlépe měly zůstat mezi datovými body zobrazenými v jakémkoliv následné grafickém či tabulárním zobrazení dat.

▼ **M1****2.2 PROMĚNNÉ ODEZVY**

Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené látky na růst řas. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy, protože členské země mají odlišné preference a právní požadavky. Mají-li být výsledky zkoušky přijatelné ve všech členských zemích, účinky je třeba vyhodnotit pomocí obou proměnných odezvy a) a b) popsaných dále.

- a) Průměrná specifická růstová rychlost: tato proměnná odezvy se vypočítává na základě logaritmického zvýšení biomasy během zkušební období a vyjádří se na den.
- b) Výtěžek: tato proměnná odezvy je biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa.

Při použití této metody v rámci práva EU by měl být výpočet výsledků založen na průměrné specifické růstové rychlosti, a to z níže uvedených důvodů. Je třeba uvést, že hodnoty toxicity vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti ($E_r C_x$) budou všeobecně vyšší než výsledky založené na výtěžku ($E_y C_x$), pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody, a to díky matematické základně příslušných přístupů. Tuto skutečnost nelze vykládat jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné. Koncepce průměrné specifické růstové rychlosti je založena na obecném průběhu exponenciálního růstu řas v nelimitovaných kulturách, u nichž se toxicita odhaduje na základě účinků na růstovou rychlost, aniž by závisela na absolutní úrovni specifické růstové rychlosti kontroly, na sklonu křivky závislosti koncentrace-odezva nebo na době trvání zkoušky. Naproti tomu výsledky založené na proměnné odezvy „výtěžek“ jsou závislé na všech těchto ostatních proměnných. $E_y C_x$ závisí na specifické růstové rychlosti druhů řas použitých v každé zkoušce a na maximální specifické růstové rychlosti, která se může u jednotlivých druhů, a dokonce i u různých kmenů řas lišit. Tato proměnná odezvy by se neměla používat pro srovnávání citlivosti na toxické látky mezi druhy řas nebo dokonce různými kmeny. Přestože se z vědeckého hlediska dává přednost použití průměrné specifické růstové rychlosti pro odhad toxicity, odhady toxicity založené na výtěžku jsou rovněž do této zkušební metody zahrnuty, aby uspokojily současné právní požadavky v některých zemích.

2.2.1 Průměrná růstová rychlost

Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení biomasy z rovnice pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (den}^{-1}\text{)}$$

kde:

μ_{i-j} : je průměrná specifická růstová rychlost od doby i do doby j ,

X_i : je biomasa v době i ,

X_j : je biomasa v době j .

▼ **M1**

Pro každou exponovanou skupinu a kontrolní skupinu vypočítejte střední hodnotu růstové rychlosti a odhady rozptylu.

Vypočítejte průměrnou specifickou růstovou rychlost po celou dobu trvání zkoušky (obvykle dny 0 až 3), přičemž namísto naměřené počáteční hodnoty použijte jako počáteční hodnotu spíše nominálně naočkovanou biomasu, protože se tímto způsobem obvykle dosáhne větší preciznosti. Jestliže zařízení použité pro měření biomasy umožňuje dostatečně precizní určení nízké biomasy inokula (např. průtokovým cytometrem), pak lze použít naměřenou počáteční koncentraci biomasy. Rovněž se vyhodnotí růstová rychlost po jednotlivých časových úsecích vypočtená jako specifické růstové rychlosti pro každý den v průběhu zkoušky (dny 0–1, 1–2 a 2–3) a prozkoumá se, zda-li růstová rychlost kontroly zůstává konstantní (viz kritéria validity, bod 1.7). Významně nižší specifická růstová rychlost v den jedna v porovnání s celkovou průměrnou specifickou růstovou rychlostí může poukazovat na fázi iniciace. Zatímco v kontrolních kulturách lze fázi iniciace minimalizovat a prakticky vyloučit správnou kultivací předkultury, fáze iniciace v exponovaných kulturách může být známkou obnovy po počátečním toxickém stresu nebo známkou snížené expozice vyvolané ztrátou zkoušené látky (včetně sorpce na biomasu řas) po počáteční expozici. Odpovídajícím způsobem lze vyhodnocovat růstovou rychlost v jednotlivých časových úsecích s cílem zhodnotit účinky zkoušené látky, které se vyskytly během expoziční doby. Významně rozdíly mezi růstovou rychlostí v jednotlivých časových úsecích a průměrnou růstovou rychlostí jsou známkou odchylky od konstantního exponenciálního růstu a vyžadují důkladné prozkoumání růstových křivek.

Vypočítejte procentuální inhibici růstové rychlosti u jednotlivých opakování s exponovanými vzorky z rovnice:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

kde:

$\%I_r$: procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,

μ_C : střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti (μ) v kontrolní skupině,

μ_T : průměrná specifická růstová rychlost u opakování s exponovaným vzorkem.

Jestliže se k přípravě zkušebních roztoků používají rozpouštědla, pro výpočet procentuální inhibice by se měly namísto kontrol bez rozpouštědel používat kontroly s rozpouštědly.

2.2.2 Výtěžek

Výtěžek se vypočítá jako biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky. Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu vypočítejte střední hodnotu výtěžku a odhady rozptylu. Procentuální inhibici výtěžku ($\%I_y$) lze vypočítat pro každé opakování s exponovanými vzorky následovně:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼ M1

kde:

$% I_y$: procentuální inhibice výtěžku,

Y_C : střední hodnota výtěžku v kontrolní skupině,

Y_T : hodnota výtěžku u opakování s exponovaným vzorkem.

2.3 VYNÁŠENÍ KŘIVKY ZÁVISLOSTI KONCENTRACE-ODEZVA

Vyneste procentuální hodnotu inhibice proti logaritmu koncentrace zkušební látky a vynesené body pečlivě prozkoumejte, přičemž neberte v úvahu žádný takový datový bod, který byl v první fázi vyloučen jako odlehlá hodnota. Podle oka nebo pomocí počítačové interpolace ved'te datovými body tenkou čáru, abyste získali první dojem o vztahu koncentrace a odezvy, poté přistupte k podrobnější metodě, nejlépe počítačové statistické metodě. V závislosti na zamýšleném použití dat, jakosti (preciznosti) a množství dat, jakož i na dostupnosti nástrojů pro analýzu dat může být rozhodnuto (a někdy je to dostatečně odůvodněno) o tom, že se analýza dat v tomto stadiu zastaví a klíčové hodnoty EC_{50} a EC_{10} (a/nebo EC_{20}) se jednoduše odečtou z křivky vytvořené podle oka (rovněž viz následující bod o stimulačních účincích). Platnými důvody pro nepoužití statistické metody mohou být:

- Údaje nejsou vhodné pro počítačové metody, které neposkytnou žádné spolehlivější výsledky než ty, které lze získat odborným posouzením – v takových situacích mohou dokonce některé počítačové programy selhat při získání spolehlivého řešení (iterace nemusí konvergovat atd.).
- Stimulační růstové odezvy nelze odpovídajícím způsobem zpracovat pomocí dostupných počítačových programů (viz níže).

2.4 STATISTICKÉ POSTUPY

Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a odezvou pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy – například do probitových nebo logitových či Weibullových jednotek (9), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (9). Je zapotřebí uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullové transformace jsou určeny k použití s kvantálními daty (např. mortalita nebo přežití) a musí se upravit, aby mohly být použity s daty růstu či biomasy. Speciální postupy pro stanovení hodnoty EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (10, 11 a 12). Použití nelineární regresní analýzy je dále podrobně popsáno v dodatku 4.

▼ **M1**

Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, použijte vztah koncentrace a odezvy pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x . Je-li to možné, je zapotřebí určit 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad. Jakost shodnosti dat odezvy s regresním modelem je zapotřebí vyhodnotit buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin. Pokud však je vynesení nelineární křivky obtížné či neúspěšné kvůli příliš velkému rozptylu dat, problém lze obejít provedením regrese na skupinových středních hodnotách, což je praktický způsob pro snížení vlivu podezřelých odlehklých hodnot. Použití této možnosti je zapotřebí zaznamenat ve zkušebním protokolu jako odchylku od normálního postupu v důsledku skutečnosti, že křivka, která vyhovuje jednotlivých opakováním, nevedla k uspokojivému výsledku.

Odhady EC_{50} a intervaly spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstragem (13), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC a pro účinky zkoušené látky na růstovou rychlost je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání nebo metodou zkoušky trendu. Užitečné mohou být Dunnettův nebo Williamsův test (14, 15, 16, 17, 18). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Toto hodnocení lze provádět graficky nebo formálním testem (18). Mezi vhodné testy patří Levenův nebo Bartlettův test. Nesplnění předpokladu o homogenitě rozptylů lze někdy napravit logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylu extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako jsou testy sestupného trendu Jonckheere. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (12).

Vědecký rozvoj poslední doby vedl k doporučení opustit koncepci NOEC a nahradit ji odhady bodů EC_x na základě regrese. Vhodná hodnota pro x nebyla pro tuto zkoušku pomocí řas stanovena. Zdá se, že vhodné je rozmezí od 10 do 20 % (v závislosti na zvolené proměnné odezvy) a nejlépe by se měly ve zkušebním protokolu uvádět jak EC_{10} , tak EC_{20} .

2.5 STIMULACE RŮSTU

Při nízkých koncentracích bývá někdy pozorována stimulace růstu (negativní inhibice). To může být důsledkem buď hormese („toxická stimulace“), nebo přidání stimulujících růstových faktorů se zkušebním materiálem k minimálnímu použitému médiu. Nezapomeňte, že přidání anorganických živin by neměl mít žádný přímý účinek, protože zkušební médium by mělo po celou dobu zkoušky udržovat přebytek živin. Stimulaci nízkými dávkami lze ve výpočtech EC_{50} obvykle ignorovat, pokud není extrémní. Je-li však extrémní nebo má-li být vypočtena hodnota EC_x pro nízké x , může být zapotřebí speciálních postupů. K vymazání stimulačních odezev z analýzy dat by nemělo pokud možno dojít, a pokud dostupný software pro stanovení křivky nemůže drobnou stimulaci přijmout, lze použít lineární interpolaci s bootstragem. Jestliže je stimulace extrémní, lze zvážit použití modelu předpokládajícího hormesi (19).

▼ M1

2.6 NETOXICKÁ INHIBICE RŮSTU

Zkušební materiály absorbující světlo mohou způsobit snížení růstové rychlosti, protože stínění snižuje množství dostupného světla. Takové účinky fyzikální povahy je zapotřebí oddělit od toxických účinků, a to úpravou zkušebních podmínek, přičemž takové fyzikální účinky je zapotřebí uvádět ve zkušebním protokolu samostatně. Pokyny lze nalézt v literatuře (2 a 3).

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti včetně meze rozpustnosti ve vodě,
- údaje o chemické identifikaci včetně čistoty.

Testovací druhy:

- kmen, dodavatel nebo zdroj a použité podmínky kultivace.

Zkušební podmínky:

- datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,
- popis plánu zkoušky: zkušební nádoby, objemy kultur, hustota biomasy na počátku zkoušky,
- složení média,
- zkušební koncentrace a opakování (například počet opakování, počet zkušebních koncentrací a použitá geometrická progresse),
- popis přípravy zkušebních roztoků včetně použití rozpouštědel atd.,
- kultivační zařízení,
- intenzita a kvalita světla (zdroj, homogenita),
- teplota,
- zkušební koncentrace: nominální zkušební koncentrace a jakékoliv výsledky analýz pro stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách. Ve zkušebním protokolu je třeba uvést výtěžnost metody a mez kvantifikace ve zkušební matici,
- všechny odchylky od této zkušební metody,
- metoda pro stanovení biomasy a důkaz o korelaci mezi naměřeným parametrem a suchou hmotností.

Výsledky:

- hodnoty pH na počátku a konci zkoušky u všech expozičních bodů,
- biomasa pro každou baňku v každém měřicím bodě a metoda pro měření biomasy,

▼ M1

- růstové křivky (vynášení biomasy vůči času),
- vypočítané proměnné odezvy pro všechna opakování s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačním koeficientem pro opakování,
- grafické znázornění vztahu koncentrace a účinku,
- odhady toxicity pro proměnné odezvy, např. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,
- jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),
- jakákoliv stimulace růstu zjištěná v jakémkoli exponovaném vzorku,
- jakékoliv jiné pozorované účinky, např. morfologické změny řas,
- diskuse výsledků včetně jakéhokoli vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

4. LITERATURA

- (1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- (2) ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.
- (3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.
- (4) ISO 1998: Jakost vod – Odběr vzorků – Část 16: Pokyny pro biologické zkoušení vzorků. ISO 5667–16.
- (5) ISO 1993: Jakost vod – Zkouška inhibice růstu sladkovodních zelených řas. ISO 8692.
- (6) Mayer, P., Cuhel, R., Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525–2531.
- (7) Slovencey, R.E., Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplankton chlorophyll, *Limnology & Oceanography* 22,5 (1977), 919–925
- (8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L., Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2073–2079.
- (9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713–718.

▼ M1

- (10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O., Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157–167.
- (11) Bruce, R.D., Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Env. Toxicol. Chem.* 11:1485–1494.
- (12) OECD (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.
- (13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05–88. USEPA, Duluth, MN.
- (14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50: 1096–1121.
- (15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482–491.
- (16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103–117.
- (17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510–531.
- (18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition. Wiley, New York.
- (19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.

▼ M1*Dodatek 1***Kmeny, u nichž byla prokázána vhodnost pro zkoušku****Zelené řasy**

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (dříve známá jako *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

- *Desmodesmus subspicatus* (dříve známá jako *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

Rozsivky

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Sinice

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Zdroje kmenů

Doporučené kmeny jsou k dispozici v jednodruhových kulturách z následujících sbírek (v abecedním pořadí):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110–2209
USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology,
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria
LA22 0LP
SPOJENÉ KRÁLOVSTVÍ

SAG: Sammlung von Algenkulturen
Albrecht-von-Haller-Institut
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Göttingen
NĚMECKO

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
the University of Texas at Austin
Austin, Texas 78712
USA

▼ **M1****Vzhled a charakteristiky doporučených druhů**

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Vzhled	zakřivené, zkroucené jednotlivé buňky	oválné, většinou jednotlivé buňky	tyčinky	řetězce oválných buněk	tyčinky
Velikost (d × š) μm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Buněčný objem (μm ³ /buňka)	40–60 ⁽¹⁾	60–80 ⁽¹⁾	40–50 ⁽¹⁾	30–40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Hmotnost buněčné sušiny (mg/buňka)	2–3 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	1–2 × 10 ⁻⁸	2–3 × 10 ⁻⁹
Růstová rychlost ⁽³⁾ (den ⁻¹)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

⁽¹⁾ Měřeno elektronickým počítačem částic.

⁽²⁾ Vypočítáno z velikosti.

⁽³⁾ Nejčastěji pozorovaná růstová rychlost v médiu OECD při světelné intenzitě přibližně 70 μE•m⁻²•s⁻¹ a teplotě 21 °C.

Specifická doporučení ohledně kultivace doporučených zkušebních druhů a nakládání s nimi*Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*

Tyto zelené řasy se všeobecně snadno udržují v různých kultivačních médiích. Informace o vhodných médiích lze získat od sbírek kultur. Buňky jsou normálně samostatné a měření hustoty buněk lze snadno provádět pomocí elektronického počítače částic nebo mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Pro uchování zásobní kultury lze použít různá růstová média. Zvláště důležité je zabránit tomu, aby vsázková kultura překročila při obnově fázi logaritmického růstu; zpětné získání je v tomto bodě obtížné.

Anabaena flos-aquae vytváří shluky vnořených řetězců buněk. Velikost těchto shluků se může měnit s kultivačními podmínkami. Může vzniknout potřeba tyto shluky rozrušit, pokud se ke stanovení biomasy použije počítání pod mikroskopem nebo elektronický počítač částic.

Pro snížení variability počtu mohou být v dílčích vzorcích použity k rozrušení řetězců ultrazvukové vibrace. Delší ultrazvukové vibrace, než jsou nutné k rozrušení řetězců do kratších délek, mohou buňky zničit. Intenzita ultrazvukových vibrací a doba trvání musí být shodné pro každou expozici.

Spočítejte na hemocytometru dostatek políček (nejméně 400 buněk), což pomůže variabilitu kompenzovat. Tím se zlepší spolehlivost mikroskopického stanovení hustoty.

Pro stanovení celkového buněčného objemu sinic rodu *Anabaena* po rozrušení buněčných řetězců opatrnými ultrazvukovými vibracemi lze použít elektronický počítač částic. Ultrazvuková energie se musí nastavit tak, aby se zabránilo narušení buněk.

Aby se zajistilo dobré promíchání a homogenita suspence řas použitých k naočkování zkušebních nádob, použijte vířivou míchačku nebo podobnou odpovídající metodu.

▼ M1

Zkušební nádoby je nutno umístit na stůl orbitální nebo reciproké třepačky při přibližně 150 otáčkách za minutu. Případně lze použít občasné promíchávání ke snížení sklonu sinic rodu *Anabaena* vytvářet shluky. Jestliže ke shlukování dojde, musí se postupovat pečlivě k získání reprezentativních vzorků pro měření biomasy. Pro rozrušení shluků sinic před odběrem vzorků může být nezbytné intenzivní promíchávání.

Synechococcus leopoliensis

Pro uchování zásobní kultury lze použít různá růstová média. Informace o vhodných médiích lze získat od sbírek kultur.

Synechococcus leopoliensis vyrůstají jako jednotlivé buňky tyčinkového tvaru. Buňky jsou velmi malé, což ztěžuje použití počítání pod mikroskopem pro měření biomasy. Užitečné jsou elektronické počítače částic vybavené pro počítání částic až do velikosti přibližně 1 μm . Rovněž jsou využitelná fluorometrická měření *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Pro uchování zásobní kultury lze použít různá růstová média. Informace o vhodných médiích lze získat od sbírek kultur. Je nutné mít na paměti, že v médiu se vyžaduje přítomnost křemičitanu.

Navicula pelliculosa může za určitých růstových podmínek vytvářet shluky. Buňky mají někdy sklon se shlukovat v povrchovém filmu kvůli produkci lipidů. Za těchto okolností se musí přijmout zvláštní opatření, když se odebírají dílčí vzorky pro stanovení biomasy s cílem získat reprezentativní vzorky. Může být nutné intenzivní protřepávání, např. použití vířivé míchačky.

▼ **M1***Dodatek 2***Růstová média**

Lze použít jedno ze dvou následujících růstových médií:

Médium OECD: původní médium podle Pokynu OECD pro zkoušení 201, rovněž podle normy ISO 8692.

Médium US. EPA AAP, rovněž podle ASTM.

Při přípravě těchto médií je zapotřebí používat chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu.

Složení média AAP (US. EPA) a média podle Pokynu OECD pro zkoušení 201

Složka	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
NaHCO ₃	15,0	0,179	50,0	0,595
NaNO ₃	25,5	0,300		
NH ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ •6H ₂ O	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ •2H ₂ O	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ •7H ₂ O	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ •6H ₂ O	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ •4H ₂ O	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ •6H ₂ O	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ •2H ₂ O	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Molární poměr EDTA k železu mírně překračuje jednu. Tím se zabrání srážení železa a současně se minimalizuje chelatace iontů těžkých kovů.

Při zkoušce s rozsivkou *Navicula pelliculosa* musí být obě média doplněna Na₂SiO₃•9H₂O pro dosažení koncentrace 1,4 mg Si/l.

pH média se získá při rovnováze mezi uhličitánovým systémem média a parciálním tlakem CO₂ v atmosférickém vzduchu. Přibližný vztah mezi pH při 25 °C a molární koncentrací hydrogenuhličitanu je:

$$\text{pH}_{\text{rovan}} = 11,30 + \log [\text{HCO}_3^-]$$

▼ **M1**

S 15 mg/l NaHCO_3 je $\text{pH}_{\text{rovn}} = 7,5$ (médium US. EPA) a s 50 mg/l NaHCO_3 je $\text{pH}_{\text{rovn}} = 8,1$ (médium OECD).

Prvkové složení zkušebních médií

Prvek	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Příprava média OECD

Živina	Koncentrace v zásobním roztoku
Zásobní roztok č. 1: makroživiny	
NH_4Cl	1,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Zásobní roztok č. 2: železo	
$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Zásobní roztok č. 3: stopové prvky	
H_3BO_3	185 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
ZnCl_2	3 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Zásobní roztok 4: hydrogenuhličitan	
NaHCO_3	50 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{SiO}_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Vysterilizujte zásobní roztoky membránovou filtrací (střední průměr pórů 0,2 μm) nebo v autoklávu (120 °C, 15 minut). Roztoky skladujte v temnu při 4 °C.

Zásobní roztoky 2 a 4 neošetřujte v autoklávu, ale sterilizujte je membránovou filtrací.

▼ M1

Připravte růstové médium přidáním odpovídajícího objemu zásobních roztoků 1 až 4 do vody:

Do 500 ml sterilizované vody přidejte:

- 10 ml zásobního roztoku 1,
- 1 ml zásobního roztoku 2,
- 1 ml zásobního roztoku 3,
- 1 ml zásobního roztoku 4.

Doplňte do 1 000 ml sterilizovanou vodou.

Nechte stát dostatečně dlouhou dobu na to, aby se vytvořila rovnováha média s atmosférickým CO₂, v případě potřeby pomocí probublávání sterilním filtrovaným vzduchem po několik hodin.

Příprava média AAP

- A1.1 Přidejte 1 ml každého zásobního roztoku v A1.2.1–A1.2.7 do přibližně 900 ml deionizované nebo destilované vody a poté nařeďte do 1 l.
- A1.2 Zásobní roztoky makroživin se připravují rozpuštěním následujících látek v 500 ml deionizované nebo destilované vody. Činidla A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 a A1.2.4 lze spojit do jednoho zásobního roztoku:
- A1.2.1 NaNO₃—12,750 g.
- A1.2.2 MgCl₂•6H₂O—6,082 g.
- A1.2.3 CaCl₂•2H₂O—2,205 g.
- A1.2.4 Zásobní roztok mikroživin – (viz A1.3).
- A1.2.5 MgSO₄•7H₂O—7,350 g.
- A1.2.6 K₂HPO₄—0,522 g.
- A1.2.7 NaHCO₃—7,500 g.
- A1.2.8 Na₂SiO₃•9H₂O – viz poznámka A1.1.

Poznámka A1.1 – Používejte pouze pro testovací druhy rozsivek. Může být přidán přímo (202,4 mg) nebo prostřednictvím zásobního roztoku, aby bylo dosaženo konečné koncentrace 20 mg/l Si v médiu.

- A1.3 Zásobní roztok mikroživin se připravuje rozpuštěním následujících látek v 500 ml deionizované nebo destilované vody:
- A1.3.1 H₃BO₃—92,760 mg.
- A1.3.2 MnCl₂•4H₂O—207,690 mg.
- A1.3.3 ZnCl₂—1,635 mg.
- A1.3.4 FeCl₃•6H₂O—79,880 mg.
- A1.3.5 CoCl₂•6H₂O—0,714 mg.
- A1.3.6 Na₂MoO₄•2H₂O—3,630 mg.
- A1.3.7 CuCl₂•2H₂O—0,006 mg.
- A1.3.8 Na₂EDTA•2H₂O—150,000 mg.

[dinatrium-ethylendiamintetraacetát dihydrát].

▼ M1

- A1.3.9 $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ —0,005 mg, viz poznámka A1.2.
Poznámka A1.2 – Používejte pouze v médiu pro zásobní kultury druhů rozsivek.
- A1.4 Upravte pH na $7,5 \pm 0,1$ přidáním 0,1 *N* nebo 1,0 *N* NaOH nebo HCl.
- A1.5 Odfiltrujte média do sterilní nádoby prostřednictvím 0,22 μm membránového filtru, pokud se má používat počítáč částic, nebo 0,45 μm filtru, pokud se počítáč částic používat nemá.
- A1.6 Médium skladujte až do použití v temnu při teplotě přibližně 4 °C.

▼ M1*Dodatek 3***Příklad postupu kultivace řas****Obecné poznámky**

Účelem kultivace následujícím postupem je získání kultur řas pro zkoušky toxicity.

Musí být použity vhodné metody k tomu, aby bylo zajištěno, že kultury řas nebudou infikovány bakteriemi. Vhodné mohou být axenické kultury, avšak musí se vytvořit a používat jednodruhové kultury.

Všechny operace se musí provádět za sterilních podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci bakteriemi a jinými řasami.

Zařízení a materiály

Viz zkušební metoda: Přístroje a pomůcky.

Postupy při získávání kultur řas*Příprava živných roztoků (médií):*

Všechny soli živin média se připravují jako koncentrované zásobní roztoky a skladují se v temnu a chladu. Tyto roztoky jsou sterilizovány filtrací nebo autoklávem.

Médium se připraví přidáním správného množství zásobního roztoku do sterilní destilované vody, přičemž se dbá na to, aby nedošlo k žádné infekci. K získání pevného média se přidává 0,8 procent agarů.

Kmenová kultura:

Kmenové kultury jsou malé kultury řas, které se pravidelně přenášejí do čerstvého média, kde slouží jako výchozí zkušební materiál. Nejsou-li kultury pravidelně používány, vyočkovávají se na šikmý agar. Poté se nejméně jednou za dva měsíce přenášejí do čerstvého média.

Kmenové kultury se pěstují v Erlenmeyerových baňkách obsahujících vhodné médium (objem přibližně 100 ml). Jsou-li řasy kultivovány při teplotě 20 °C a stálém osvětlení, musí se přenášet každý týden.

Při přeočkování se přenesou sterilní pipetou do baňky s čerstvým médiem takové množství „staré“ kultury, aby byla počáteční koncentrace u rychle rostoucího druhu řas asi stokrát menší než koncentrace kultury staré.

Růstovou rychlost druhu řas lze odečíst z růstové křivky. Je-li známa, lze z ní odhadnout hustotu, při níž musí být kultura přenesena do čerstvého média. K tomu musí dojít před fází odumírání kultury.

Předkultura:

Účelem předkultur je poskytnout dostatečné množství řas potřebných pro naočkování zkušebních kultur. Předkultura se kultivuje za zkušebních podmínek a použije se ještě během exponenciálního růstu, to znamená obvykle po inkubační lhůtě o délce 2 až 4 dní. Obsahují-li kultury řas deformované nebo abnormální buňky, musí se odstranit.

▼ **M1***Dodatek 4***Datová analýza pomocí nelineární regrese****Obecné poznámky**

Odezva ve zkoušce růstu řas a jiných zkouškách mikrobiálního růstu – růstu biomasy je svojí povahou spojitá nebo metrická proměnná – procesní rychlost, jestliže se používá růstové rychlosti, a její integrál během doby, pokud se zvolí biomasa. Obě jsou popsány příslušnou střední odezvou neexponovaných kontrol použitých k opakování, jež ukazují maximální odezvu při daných podmínkách – přičemž světlo a teplota jsou primární určující faktory ve zkoušce růstu řas. Systém je distribuovaný nebo homogenní a na biomasu lze pohlížet jako na kontinuum při zanedbání jednotlivých buněk. Distribuce rozptylu typu odezvy pro takový systém závisí výlučně na experimentálních faktorech (obvykle popsaných lognormálními nebo normálními distribucemi chyb). To je v kontrastu k typickým odezvám biologických zkoušek s kvantálními daty, u nichž se často předpokládá, že tolerance (obvykle binominálně distribuovaná) jednotlivých organismů je dominantní složkou rozptylu. Zde jsou kontrolní odezvy nula nebo základní úroveň.

V nekomplikované situaci normalizovaná nebo relativní odezva, r , monotónně klesá z 1 (nulová inhibice) na 0 (stoprocentní inhibice). Je třeba mít na paměti, že všechny odezvy mají přidruženou chybu a že očividně negativní inhibice lze vypočítat pouze jako výsledek náhodné chyby.

Regresní analýza*Modely*

Cílem regresní analýzy je kvantitativně popsat křivku závislosti koncentrace a odezvy ve formě matematické regresní funkce $Y = f(C)$ nebo častěji $F(Z)$, kde $Z = \log C$. Použití inverzní funkce $C = f^{-1}(Y)$ dovoluje vypočítat hodnoty EC_x včetně EC_{50} , EC_{10} a EC_{20} a jejich 95 % intervaly spolehlivosti. Prokázalo se, že vztah koncentrace a odezvy získané ve zkouškách inhibice růstu řas úspěšně popisuje několik jednoduchých matematických funkcí. Funkce například obsahují logistickou rovnici, nesymetrickou Weibullovu rovnici a lognormální distribuční funkci, které jsou všechny esovitými křivkami asymptoticky se blížícími jedné pro $C \rightarrow 0$ a nule pro $C \rightarrow$ nekonečno.

Použití modelů spojitě prahové funkce (např. Kooijmanův model „pro inhibici populačního růstu“, Kooijman *et al.* 1996) byl nedávno navržen jako alternativa k modelům asymptotickým. Tento model nepředpokládá žádné účinky při koncentracích pod určitým prahem, $EC0^+$, který se odhaduje extrapolací vztahu koncentrace a odezvy pro průtnutí osy koncentrace pomocí jednoduché spojitě funkce, která není v počátečním bodě diferencovatelná.

Je třeba mít na paměti, že analýza může být prostou minimalizací reziduálních součtů čtverců (za předpokladu konstantního rozptylu) nebo vážených čtverců, pokud se kompenzuje heterogenita rozptylu.

▼ **M1***Postup*

Postup lze nastínit následovně: zvolte příslušnou funkční rovnici, $Y = f(C)$, a uzpůsobte ji podle údajů pomocí nelineární regrese. Je lepší použít měření z každé jednotlivé baňky než střední hodnoty opakování, aby se z dat získalo co nejvíce informací. Jestliže je rozptyl vysoký, praktická zkušenost naopak naznačuje, že střední hodnoty opakování mohou poskytovat spolehlivější matematický odhad, méně ovlivněný náhodnými chybami v datech, než tomu je u každého zachovaného jednotlivého datového bodu.

Vyneste vytvořenou křivku a naměřená data a prozkoumejte, zda-li byla křivka vynesena správně. Analýza reziduálních hodnot může být pro tento účel mimořádně užitečným nástrojem. Jestliže zvolený funkční vztah pro vyjádření odezvy koncentrace nepopisuje celou křivku nebo její některou zásadně důležitou část, například odezvu při propadu nízkých koncentrací, zvolte jinou variantu vložení křivky – např. nesymetrickou křivku, jako je Weibullova funkce, namísto křivky symetrické. Negativní inhibice mohou být problém například u lognormální distribuční funkce, která podobně vyžaduje alternativní regresní funkci. Takovým negativním hodnotám se nedoporučuje přiřazovat nulu nebo malou kladnou hodnotu, protože se tím deformuje distribuce chyb. Může být vhodné nasadit na části křivky samostatnou křivku, například v části s nízkou inhibicí pro odhad hodnot $EC_{\text{nizké } x}$. Vypočítejte ze vsazené rovnice („inverzním odhadem“ $C = f^{-1}(Y)$) odhady charakteristického bodu EC_x a uveďte minimálně EC_{50} a jeden nebo dva odhady $EC_{\text{nizké } x}$. Zkušenost z praktického zkoušení ukázala, že preciznost zkoušky růstu řas obvykle umožňuje přiměřeně přesný odhad na úrovni 10 % inhibice, jsou-li datové body dostačující – pokud se nevyskytne stimulace při nízkých koncentracích jakožto zkreslující faktor. Preciznost odhadu EC_{20} je často značně lepší než přesnost odhadu EC_{10} , protože EC_{20} je obvykle umístěna na přibližně lineární části centrální křivky odezvy koncentrace. Někdy lze EC_{10} interpretovat jen obtížně kvůli růstové stimulaci. Proto zatímco je EC_{10} normálně zjiřitelná s dostatečnou přesností, rovněž se vždy doporučuje uvádět EC_{20} .

Váhové faktory

Experimentální rozptyl není obecně konstantní a typicky zahrnuje proporcionalní složku, proto je výhodné běžně provádět váženou regresi. Váhové faktory pro takovou analýzu se obvykle považují za nepřímo úměrné k rozptylu:

$$w_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Mnoho regresních programů má možnost vážené regresní analýzy s váhovými faktory uvedenými v tabulce. Váhové faktory by se měly pohodlně normalizovat vynásobením $n/\sum w_i$ (n je počet datových bodů) tak, aby se jejich součet rovnal jedné.

Normalizace odezev

Normalizování střední kontrolní odezvou způsobuje určité principiální problémy a vede ke vzniku poněkud komplikované struktury rozptylů. Dělením odezev střední kontrolní odezvou pro získání procentuální hodnoty inhibice se zavádí dodatečná chyba způsobená chybou kontrolní střední hodnoty. Není-li tato chyba zanedbatelně malá, musí se opravit váhové faktory v regresi a intervaly spolehlivosti na kovarianci s kontrolou (17). Je nutné mít na paměti, že je důležitá vysoká preciznost u odhadované střední kontrolní odezvy pro minimalizaci celkového rozptylu u relativní odezvy. Tento rozptyl je následující:

▼ **M1**

(i v dolním indexu znamená úroveň koncentrace i a 0 v dolním indexu odkazuje na kontroly)

$$Y_i = \text{relativní odezva} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

s rozptylem:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) = \delta(Y_i / \delta r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\delta Y_i / \delta r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

a jelikož

$$(\delta Y_i / \delta r_i) = 1/r_0 \text{ a } (\delta Y_i / \delta r_0) = r_i/r_0^2$$

s normálně distribuovanými daty a opakováními m_i a m_0 :

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

se pak celkový rozptyl relativní odezvy Y_i vypočítá:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 m_0$$

Chyba kontrolní střední hodnoty je nepřímo úměrná druhé odmocnině počtu zprůměrovaných kontrolních opakování, přičemž někdy je odůvodněné zanést historická data, čímž se chyba značně sníží. Alternativním postupem je data nenormalizovat a nevynášet absolutní odezvy včetně dat kontrolní odezvy, nýbrž zavést hodnoty kontrolní odezvy jakožto dodatečný parametr, který bude upraven lineární regresí. Zatímco obvyklá regresní rovnice je dvouparametrická, tato metoda vyžaduje vnesení 3 parametrů, a proto potřebuje více datových bodů než nelineární regrese prováděná s daty, která jsou normalizována pomocí předem stanovené kontrolní odezvy.

Inverzní intervaly spolehlivosti

Výpočet nelineárních regresních intervalů spolehlivosti inverzním odhadem je poněkud složitě a není to dostupná standardní možnost v běžných balících statistických počítačových programů. Přibližné intervaly spolehlivosti lze získat pomocí standardních programů nelineární regrese s opakovanou parametrizací (Bruce a Versteeg, 1992), což zahrnuje přepisování matematické rovnice za použití požadovaných odhadů bodů, např. EC_{10} a EC_{50} jakožto parametrů, které se mají odhadnout. Necht' je funkce $I = f(\alpha, \beta, \text{koncentrace})$; definiční vztahy $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ a $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ se použijí k nahrazení $f(\alpha, \beta, \text{koncentrace})$ ekvivalentní funkcí $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{koncentrace})$.

Přímější výpočet (Andersen *et al.*, 1998) se provádí zachováním původní rovnice a použitím Taylorova rozšíření okolo středních hodnot r_i a r_0 .

V poslední době se staly oblíbenými metody „bootstrap“. Takové metody používají naměřených údajů a častého opětovného odběru vzorků určovaného generátorem náhodných čísel pro odhad empirické distribuce rozptylů.

Literatura

Kooijman, S.A.L.M., Hanstveit, A.O., Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625–1632.

Bruce, R.D.; Versteeg, D.J.(1992): A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Env. Toxicol. Chem.*11, 1485–1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A., Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405–420.

▼ B**C.4. STANOVENÍ „SNADNÉ“ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI****ČÁST I. OBECNÉ ÚVAHY****I.1. ÚVOD**

Je popsáno šest metod, které umožňují screeningové posouzení snadné biologické rozložitelnosti chemických látek v aerobním vodním prostředí:

- a) zkouška na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC) (metoda C.4-A);
- b) modifikovaná screeningová zkouška OECD – na úbytek DOC (metoda C.4-B);
- c) zkouška na uvolňování oxidu uhličitého (CO₂) (modifikovaná Sturmova zkouška) (metoda C.4-C);
- d) zkouška manometrickou respirometrií (metoda C.4-D);
- e) zkouška v uzavřených lahvičkách (metoda C.4-E);
- f) zkouška MITI (Ministerstvo zahraničního obchodu a průmyslu – Japonsko) (metoda C.4-F).

Obecné a společné úvahy pro všech šest zkoušek jsou uvedeny v části I metody. Specifické body jednotlivých metod jsou uvedeny v částech II až VII. Dodatky obsahují definice, vzorce a návody.

Mezilaboratorní srovnávací test OECD provedený v roce 1988 ukázal, že metody poskytují shodné výsledky. V závislosti na fyzikálním charakteru látky, která má být zkoušena, se však může dávat přednost určité metodě.

I.2. VÝBĚR VHODNÉ METODY

Pro volbu nejvhodnější metody jsou nezbytné informace o rozpustnosti, tenzi par a o adsorpčních vlastnostech chemické látky. Pro výpočet teoretických hodnot a/nebo ověření naměřených hodnot parametrů, např. TSK, TCO₂, DOC, TOC, CHSK (viz dodatky 1 a 2) je nutné znát chemickou strukturu nebo vzorec.

Zkoušené chemické látky, jejichž rozpustnost ve vodě je alespoň 100 mg/l, lze zkoušet všemi metodami za předpokladu, že netěkají a neadsorbují se. Pro látky špatně rozpustné ve vodě, které těkají nebo se adsorbují, jsou vhodné metody uvedené v tabulce 1. Způsob, jakým je třeba zacházet s látkami špatně rozpustnými ve vodě a s látkami těkavými, je popsán v dodatku 3. Mírně těkavé látky je možno zkoušet metodou úbytku DOC, pokud je ve zkušebních nádobách (které musí být vhodně uzavřeny) dostatečně velký prostor pro plyn. V tomto případě musí být provedena abiotická kontrola pro zohlednění případné fyzikální ztráty.



Tabulka 1

Použitelnost zkušebních metod

Zkouška	Analytická metoda	Vhodnost pro látky		
		špatně rozpustné	těkavé	adsorbující se
na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	-	-	+/-
modif. zkouška OECD – na úbytek DOC	rozpuštěný organický uhlík	-	-	+/-
na uvolňování CO ₂	respirometrie: uvolňování CO ₂	+	-	+
manometrická respirometrie	manometrická respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+/-	+
zkouška v uzavřených lahvičkách	respirometrie: rozpuštěný kyslík	+/-	+	+
MITI	respirometrie: spotřeba kyslíku	+	+/-	+

Pro interpretaci získaných výsledků, zejména pokud jsou výsledky nízké nebo marginální, se vyžadují informace o čistotě nebo relativních podílech hlavních složek zkoušeného materiálu.

Pro volbu vhodných zkušebních koncentrací mohou být velmi užitečné informace o toxicitě zkoušené chemické látky pro bakterie (dodatek 4); tyto informace mohou být důležité pro správnou interpretaci nízkých hodnot biologického rozkladu.

I.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Pro ověření postupu se souběžně se zkouškou a ve vlastní baňce zkoušejí referenční chemické látky, které splňují kritéria snadné biologické rozložitelnosti.

Vhodnými chemickými látkami jsou anilin (čerstvě předestilovaný), natriumacetát, natriumbenzoát. Všechny tyto referenční chemické látky se za podmínek v uvedených metodách rozkládají, i když se záměrně nepřidá žádné inokulum.

Byl podán návrh hledat referenční chemickou látku, která by byla snadno rozložitelná, avšak vyžadovala by přidání inokula. Navržen byl kaliumhydrogenftalát. O této látce je třeba ještě získat více údajů, než ji bude možné přijmout jako referenční látku.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz dodatky 2 a 5).

I.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍCH METOD

Roztok nebo suspence zkoušené látky v minerálním prostředí se inokuluje a kultivuje v aerobních podmínkách v temnu nebo v difuzním světle. Množství DOC ve zkušebním roztoku pocházející z inokula se musí udržovat ve srovnání s DOC pocházejícího ze zkoušené látky co nejnižší. Endogenní aktivita inokula se zohlední na základě souběžné slepé zkoušky s inokulem, avšak bez zkoušené látky, třebaže endogenní aktivita buněk v přítomnosti látky přesně neodpovídá aktivitě v endogenní kontrolní zkoušce. Za účelem kontroly postupu se souběžně provádí zkouška s referenční látkou.

▼ B

Obecně se rozklad sleduje stanovením parametrů jako DOC, tvorba CO₂ nebo spotřeba kyslíku a měření se provádějí v dostatečně krátkých intervalech, aby bylo možné identifikovat začátek a konec biologického rozkladu. Měření automatickými respirometry je kontinuální. Někdy se doplňkově k jinému parametru měří DOC, avšak obvykle pouze na začátku a na konci zkoušky. Lze rovněž použít specifickou chemickou analýzu, kterou se vyhodnotí primární rozklad zkoušené látky nebo kterou se stanoví koncentrace kteréhokoli vzniklého meziprojektu (ve zkoušce MITI povinné).

Zkouška obvykle trvá 28 dnů. Je však možné ukončit měření před uplynutím 28 dní, tj. jakmile vykazuje křivka biologického rozkladu plató po tří po sobě následující měření. Je také možné měření po 28 dnech prodloužit, jestliže z křivky vyplývá, že biologický rozklad začal, avšak 28. dne ještě nebylo ještě dosaženo plató.

I.5. KRITÉRIA JAKOSTI**I.5.1. Reprodukovatelnost**

Vzhledem k charakteru biologického rozkladu a směsných populací bakterií používaných jako inokula se stanovení provádějí nejméně duplicitně.

Je obecně známo, že čím vyšší je koncentrace mikroorganismů přidaných na počátku do zkušebního média, tím menší jsou rozdíly mezi vícenásobnými měřeními. Okružní testy rovněž ukázaly, že mezi výsledky získanými různými laboratořemi mohou být velké rozdíly, avšak u snadno biologicky rozložitelných sloučenin se obvykle dosahuje dobré shody.

I.5.2. Platnost zkoušky

Zkouška se považuje za platnou, je-li na konci zkoušky nebo popřípadě na konci 10denního období rozkladu rozdíl hodnot krajních výsledků vícenásobných měření rozkladu zkoušené chemické látky v oblasti plató křivky menší než 20 % a dosáhl-li stupeň rozkladu referenční látky vyjádřený v procentech úrovně snadné biologické rozložitelnosti do 14 dní. Není-li splněna kterákoli z těchto podmínek, měření se opakuje. Vzhledem k náročnosti metod neznamenají nízké hodnoty nutně skutečnost, že zkoušená látka není v podmínkách životního prostředí biologicky rozložitelná, ale znamenají, že k prokázání biologické rozložitelnosti jsou třeba další studie.

Jestliže ve zkoušce toxicity zahrnující jak zkoušenou látku, tak referenční chemickou látku došlo během 14 dnů k méně než 35 % rozkladu (stanoveného podle DOC) nebo k méně než 25 % rozkladu (stanoveného podle TSK nebo TCO₂), lze zkoušené chemické látky považovat za inhibující (viz také dodatek 4). Série zkoušek by měla být opakována, pokud možno s nižší koncentrací zkoušené chemické látky a/nebo s vyšší koncentrací inokula, avšak ne s koncentrací vyšší než 30 mg pevných látek v litru.

I.6. OBECNÉ POSTUPY A PŘÍPRAVA

Obecné podmínky pro zkoušky jsou shrnuty v tabulce 2. Přístroje a další experimentální podmínky specifické pro jednotlivé metody jsou popsány dále v kapitolách pro tyto příslušné metody.



Tabulka 2

Zkušební podmínky

Zkouška	Zkouška na úbytek DOC	Zkouška na uvolňování CO ₂	Manometrická respirometrie	Modif. screeningová zkouška OECD	Zkouška v uzavřených lahvičkách	Zkouška MITI (l)	
Koncentrace zkoušené látky mg/l mg DOC/l mg TSK/l	10–40	10–20	100 50–100	10–40	2–10 5–10	100	
Koncentrace inokula (buňky/l, přibližně)	≤ 30 mg/l SL nebo ≤ 100 ml odpadní vody/l (10 ⁷ –10 ⁸)			0,5 ml sekundární odpadní vody/l (10 ⁵)	≤ 5 ml odpadní vody/l (10 ⁴ –10 ⁶)	30 mg/l SL (10 ⁷ –10 ⁸)	
Koncentrace prvků v minerálním médiu (v 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						nejlépe 7,0
Teplota	22 ± 2 °C						25 ± 1 °C

DOC = rozpuštěný organický uhlík,

TSK = teoretická spotřeba kyslíku,

SL = suspendované látky

I.6.1. Ředící voda

Používá se deionizovaná nebo destilovaná voda neobsahující inhibující koncentrace toxických látek (např. ionty Cu²⁺). Voda smí obsahovat nejvýše 10 % obsahu organického uhlíku vneseného zkoušeným materiálem. Vysoká čistota vody pro zkoušky je nezbytná proto, aby se nevyskytovaly vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminace může pocházet z vlastních přítomných nečistot, z materiálu měniče iontů, z rozkladných látek z bakterií a řas. Pro každou sérii měření se použije pouze jedna šarže vody, která byla předem překontrolována analýzou DOC. Tato kontrola není nutná u zkoušky v uzavřených lahvičkách, spotřeba kyslíku vodou však musí být nízká.

▼B**I.6.2. Zásobní roztoky minerálních složek**

Pro přípravu zkušebních roztoků se připraví zásobní roztoky o vhodných koncentracích minerálních složek. Níže uvedené zásobní roztoky je možné použít (při různých zředovacích faktorech) pro metodu s úbytkem DOC, modifikovanou screeningovou metodu OECD, metodu s uvolňováním CO₂, pro manometrickou respirometrii a pro metodu s uzavřenými lahvíčkami.

Zředovací faktory a specifická příprava minerálního media pro zkoušku MITI jsou uvedeny v oddílech pro jednotlivé zkoušky.

Zásobní roztoky:

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky:

- | | |
|--|---------|
| a) Dihydrogenfosforečnan draselný, KH ₂ PO ₄ | 8,50 g |
| Hydrogenfosforečnan didraselný, K ₂ HPO ₄ | 21,75 g |
| Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, Na ₂ HPO ₄ .
2 H ₂ O | 33,40 g |
| Chlorid amonný, NH ₄ Cl | 0,50 g |
| Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. pH roztoku musí být 7,4. | |
| b) Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl ₂ | 27,50 g |
| nebo chlorid vápenatý dihydrát, CaCl ₂ , 2 H ₂ O | 36,40 g |
| Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |
| c) Síran hořečnatý heptahydrát, MgSO ₄ . 7H ₂ O | 22,50 g |
| Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |
| d) Chlorid železitý hexahydrát, FeCl ₃ . 6H ₂ O | 0,25 g |
| Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |

Poznámka: Aby nebylo nutné připravovat tento roztok bezprostředně před použitím, přidá se jedna kapka koncentrované kyseliny chlorovodíkové nebo 0,4 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) na 1 litr.

I.6.3. Zásobní roztoky chemických látek

Pokud je rozpustnost vyšší než 1 g/l, rozpustí se například 1–10 g (podle potřeby) zkoušené nebo referenční látky v deionizované vodě a doplní se na 1 litr. Jinak se zásobní roztoky připravují v minerálním médiu, nebo se chemická látka přidá přímo do minerálního média. Pokud jde o postup s méně rozpustnými chemickými látkami, viz dodatek 3; ve zkoušce MITI (metoda C.4-F) se nepoužívají ani rozpouštědla, ani emulgační činidla.

▼ B**I.6.4. Inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod (nechlorovaných), z povrchových vod a půd nebo z jejich směsi. Používá-li se aktivovaný kal ve zkoušce na úbytek DOC, na uvolňování CO₂ a ve zkoušce manometrickou respirometrií, měl by být odebrán z čistírny nebo z laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. U inokulí z jiných zdrojů byl zjištěn větší rozptyl výsledků. V modifikované screeningové zkoušce OECD a ve zkoušce v uzavřených lahvičkách je potřebné zředěnější inokulum bez vloček kalu a nejvhodnějším zdrojem je voda z druhého stupně čistírny domovních odpadních vod nebo z laboratorní jednotky. Pro zkoušku MITI se inokulum získává ze směsi zdrojů a je popsáno v oddílu věnovaném této zkoušce.

I.6.4.1. Inokulum z aktivovaných kalů

Odebere se čerstvý vzorek aktivovaného kalu z aerační nádrže čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky čistící převážně domovní odpadní vody. Podle potřeby se filtrací přes jemné síto odstraní hrubé částice a kal se udržuje v aerobních podmínkách.

Jinou možností je usazení nebo odstředění (např. 10 minut při 1 100 g) po odstranění hrubých částic. Voda nad usazeninou se odstraní. Kal se promyje minerálním médiem. Koncentrovaný kal se suspenduje v minerálním médiu na koncentraci 3–5 g suspendovaných pevných látek na litr a až do použití se provzdušňuje.

Kal by měl být odebrán z dobře fungující konvenční čistírny. Je-li nutné odebrat kal z čistírny s vysokým výkonem nebo předpokládá-li se, že kal obsahuje inhibitory, je třeba jej promýt. Po důkladném promíchání se kal nechá usadit nebo se odstředí, voda nad usazeninou se odstraní a promytý kal se opět suspenduje v nové dávce minerálního média. Tento postup se opakuje, dokud se kal nepovažuje za prostý přebytečného substrátu nebo inhibitoru.

Po opakovaném suspendování nebo z neupravovaného kalu se těsně před použitím odebere vzorek pro stanovení hmotnosti sušiny suspendovaných pevných látek.

Další možností je homogenizace aktivovaného kalu (3–5 g suspendovaných látek v litru). Kal se 2 minuty zpracovává v mechanickém míšiči při střední rychlosti. Promíchaný kal se nechá 30 minut, popřípadě déle, usazovat a kapalina se dekantuje pro použití jako inokulum v koncentraci 10 ml/l minerálního média.

I.6.4.2. Jiné zdroje inokula

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Odebere se čerstvý vzorek a během přepravy se udržuje v aerobních podmínkách. Nechá se 1 hodinu usadit nebo se zfiltruje přes hrubý filtrační papír a dekantovaná kapalina nebo filtrát se až do použití udržuje v aerobních podmínkách. Na litr média lze použít až 100 ml tohoto typu inokula.

▼ B

Dalším zdrojem inokula je povrchová voda. V tomto případě se odebere vzorek vhodné povrchové vody, např. říční nebo jezerní vody, a uchovává se až do použití v aerobních podmínkách. V případě potřeby se inokulum zkoncentruje filtrací nebo odstředěním.

I.6.5. Předběžná úprava inokulí

Inokula je možné předběžně upravit pro experimentální podmínky, ale nikoli předběžně adaptovat na zkušenu látku. Předběžná úprava spočívá v aeraci aktivovaného kalu v minerálním médiu nebo výstupu z druhého stupně čistírny po dobu 5–7 dnů při zkušební teplotě. Předběžná úprava někdy zlepšuje přesnost zkušebních metod snížením hodnot ze slepých pokusů. Předúprava inokula pro zkoušku MITI se nepovažuje za nutnou.

I.6.6. Abiotické kontroly

V případě potřeby se kontroluje možný abiotický rozklad zkoušené látky stanovením úbytku DOC, příjmu kyslíku nebo uvolňování oxidu uhličitého ve sterilních kontrolách bez inokula. Sterilizace se provádí filtrací přes membránu (0,2–0,45 µm) nebo přidáním vhodné toxické látky v odpovídající koncentraci. Používá-li se membránová filtrace, odebírají se vzorky asepticky, aby byla zachována sterilita. Pokud nebyla předem vyloučena adsorpce zkoušené látky, měly by zkoušky, kterými se sleduje biologický rozklad podle úbytku DOC, zejména při použití inokula z aktivovaného kalu, zahrnovat abiotickou kontrolu, která je inokulována a intoxikována.

I.6.7. Počet nasazených baněk

Počet nasazených baněk v typické zkoušce je uveden v oddílech věnovaných jednotlivým zkouškám.

Mohou být použity tyto baňky:

- zkušební suspence: obsahující zkoušenou látku a inokulum,
- slepá zkouška s inokulem: obsahující pouze inokulum,
- kontrolní zkouška postupu: obsahující referenční látku a inokulum,
- abiotická sterilní kontrola: sterilní, obsahující zkoušenou látku (viz I.6.6),
- kontrola adsorpce: obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo,
- kontrola toxicity: obsahující zkoušenou látku, referenční látku a inokulum.

Stanovení ve zkušební suspensi a slepý pokus s inokulem musí být prováděny souběžně. Doporučuje se, aby stanovení v ostatních baňkách bylo prováděno rovněž souběžně.

To však nemusí být vždy možné. Je třeba zajistit, aby se odebíral dostatečný počet vzorků nebo aby se prováděl dostatečný počet odečtů pro vyhodnocení procenta úbytku v 10denním období rozkladu.

▼ B**I.7. DATA A HODNOCENÍ**

Při výpočtu rozkladu v procentech D_t se použijí střední hodnoty z měření parametru provedených duplicitně v obou zkušebních nádobách a ze slepého pokusu s inokulem. Vzorce jsou uvedeny dále v oddílech pro jednotlivé zkoušky. Průběh rozkladu se znázorní graficky a vyznačí se 10denní období rozkladu. Vypočte se a uveďte úbytek v procentech dosažený na konci 10denního období rozkladu a hodnota pro plató křivky nebo popřípadě hodnota odpovídající konci zkoušky.

V respirometrických zkouškách mohou v důsledku nitrifikace ovlivnit spotřebu kyslíku látky obsahující dusík (viz dodatky 2 a 5).

I.7.1. Měření rozkladu prostřednictvím stanovení DOC

Za účelem posouzení platnosti zkoušky (viz I.5.2) by se měla hodnota rozkladu D_t v procentech v každém časovém okamžiku, ve kterém se odebral vzorek, vypočítat odděleně pro každou baňku obsahující zkoušenou látku, a to pomocí středních hodnot měření DOC provedených duplicitně. Vypočte se podle této rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

kde:

D_t = rozklad v procentech v čase t ,

C_o = střední počáteční koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku (v mg DOC na litr),

C_t = střední koncentrace DOC v inokulovaném kultivačním médiu obsahujícím zkoušenou látku v čase t (v mg DOC na litr),

C_{bo} = střední počáteční koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu (v mg DOC na litr),

C_{bt} = střední koncentrace DOC ve slepém inokulovaném minerálním médiu v čase t (v mg DOC na litr).

Všechny koncentrace se stanoví experimentálně.

I.7.2. Rozklad měřený specifickou analýzou

Je-li možné získat specifické analytické údaje, vypočte se primární biologický rozklad z rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde:

D_t = rozklad v procentech v čase t , obvykle po 28 dnech,

S_a = zbylé množství zkoušené látky v médiu s inokulem na konci zkoušky (mg),

S_b = zbylé množství zkoušené látky ve slepém pokusu s vodou/-médiem, do kterých byla přidána pouze zkoušená látka (mg).

▼ B**1.7.3. Abiotický rozklad**

Použije-li se abiotická sterilní kontrola, vypočte se abiotický rozklad v procentech podle rovnice:

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

kde:

$C_{s(0)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den 0,

$C_{s(t)}$ = koncentrace DOC ve sterilní kontrole v den t.

I.8. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- zkoušené a referenční chemické látky a jejich čistota,
- zkušební podmínky,
- inokulum: charakter a místo/místa odběru, koncentrace a jakákoli předúprava,
- podíl a charakter průmyslového odpadu obsaženého v odpadní vodě, jsou-li známy,
- délka zkoušky a teplota,
- v případě špatně rozpustných zkoušených látek použitý způsob zpracování,
- použitá zkušební metoda; měly by být uvedeny vědecké důvody a vysvětlení pro veškeré změny postupu,
- přehled dat,
- veškeré pozorované projevy inhibice,
- jakýkoli pozorovaný abiotický rozklad,
- specifická analytická data o chemické látce, pokud existují,
- analytická data o meziproduktech, pokud existují,
- graf závislosti rozkladu v procentech na čase pro zkoušenou a referenční látku; je třeba zřetelně označit fázi iniciace, fázi rozkladu, 10denní období rozkladu a směrnici (dodatek 1). Vyhovuje-li zkouška kritériím jakosti, je možné v grafu použít střední hodnotu rozkladu v procentech v baňkách obsahujících zkoušenou látku,
- rozklad v procentech po 10denním období rozkladu, v oblasti platé a na konci zkoušky.

ČÁST II. ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC (metoda C.4-A)**II.1. PODSTATA METODY**

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako nominální jediný zdroj organického uhlíku se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C.

▼B

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace.

II.2. POPIS METODY**II.2.1. Aparatura**

- a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;
- b) třepačka upravená pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;
- c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;
- d) analyzátor DOC;
- e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;
- f) odstředivka.

II.2.2. Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

II.2.3. Příprava a předběžná úprava inokula

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsí.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4. Příprava baněk

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují aktivovaným kalem nebo jiným zdrojem inokula (viz I.6.4.), aby se získala výsledná koncentrace nejvýše 30 mg suspendovaných látek na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

▼B

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baňek se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 dodatku 2). Ústí baňek se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

II.2.5. Počet baňek v typické zkoušce

Baňka 1 a 2: Zkušební suspence

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

II.2.6. Provedení zkoušky

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspence.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baňek přidáním potřebného množství ředící vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspence. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz bod 4 dodatku 2). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

II.3. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV**II.3.1. Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1 (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

▼ BII.3.2. **Platnost výsledků**

Viz bod I.5.2.

II.3.3. **Zprávy**

Viz bod I.8.

II.4. **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA ÚBYTEK DOC**1. LABORATOŘ****2. DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY****3. ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: mg/l

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0 : mg/l**4. INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: mg/l

5. STANOVENÍ UHLÍKU

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b(t)}$					

▼ **B**

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Slepá zkouška s inokulem bez zkoušené látky	3	c ₁					
		c ₂					
		c, střední hodnota C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, střední hodnota C _{d(t)}					
			$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$				

6. VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Baňka č.		Rozklad v % po n dnech				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}} \right) \times 100$	0				
Střední hodnota ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

⁽¹⁾ Hodnoty D₁ a D₂ by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (nepovinná)

	Čas (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA (nepovinná)

	Zbýlé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S _b	

▼ B

	Zbylé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Inokulované zkušební médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST III. MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD (metoda C.4-B)

III.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem minerálního média obsahujícího známou koncentraci zkoušené látky (10–40 mg DOC na litr) jako jediný zdroj organického uhlíku se inokuluje 0,5 ml odpadní vody na litr média. Směs se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle při 22 ± 2 °C.

Rozklad se sleduje v krátkých intervalech během 28denního období prostřednictvím analýzy DOC. Stupeň biologického rozkladu se vypočte vyjádřením koncentrace rozloženého DOC (opravené na koncentraci DOC ve slepé zkoušce s inokulem) v procentech koncentrace, která byla přítomna na začátku. Stupeň primárního biologického rozkladu lze rovněž vypočítat z doplňkové chemické analýzy provedené na začátku a na konci inkubace.

III.2. POPIS METODY

III.2.1 Aparatura

- a) Erlenmeyerovy baňky, např. 250 ml až 2 litry, podle objemu potřebného pro analýzu DOC;
- b) třepačka pro umístění Erlenmeyerových baněk, buď s automatickou regulací teploty nebo používaná v místnosti s konstantní teplotou, a s dostatečným výkonem pro udržení aerobních podmínek ve všech baňkách;
- c) filtrační aparatura s vhodnými membránami;
- d) analyzátor DOC;
- e) přístroj pro stanovení rozpuštěného kyslíku;
- f) odstředivka.

III.2.2. Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 80 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

V této metodě se používá jako inokulum pouze 0,5 ml odpadní vody na litr, a proto je nutné do média dodat stopové prvky a růstové faktory. Toho se dosáhne přidáním 1 ml každého z dále uvedených roztoků na jeden litr výsledného média:

▼ B

Roztok stopových prvků:

Síran manganatý tetrahydrát, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinečnatý heptahydrát, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamonný, $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe (FeCl_3 s kyselinou ethylendiamintetraoc- tovou)	100,0 mg

Rozpustí se v ředící vodě a doplní se touto vodou na 1 000 ml.

Vitaminový roztok:

Kvasničný extrakt	15,0 mg
-------------------	---------

Kvasničný extrakt se rozpustí ve 100 ml vody. Sterilizuje se průchodem membránou 0,2 μm , nebo se připraví čerstvě.

III.2.3. Příprava a předběžná úprava inokula

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Viz I.6.4.2 a I.6.5.

Použije se 0,5 ml na litr minerálního média.

III.2.4. Příprava baněk

Do dvoulitrových Erlenmeyerových baněk se například odměří 800 ml minerálního média a do jednotlivých baněk se přidají dostatečná množství zásobních roztoků zkoušené a referenční látky tak, aby se získaly koncentrace látky odpovídající 10–40 mg DOC na litr. Zkontrolují se hodnoty pH a popřípadě se upraví na 7,4. Baňky se inokulují odpadní vodou z druhého stupně čištění odpadních vod (viz I.6.4.2) v objemu 0,5 ml na litr. Připraví se rovněž kontroly s inokulem v minerálním médiu, avšak bez zkoušené nebo referenční látky.

Podle potřeby se použije jedna nádoba ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky inokulací roztoku, který obsahuje srovnatelná množství jak zkoušené, tak referenční chemické látky v minerálním médiu.

Podle potřeby se také použije další, sterilní baňka s roztokem chemické látky bez inokula, a to ke kontrole, zda se zkoušená chemická látka rozkládá abioticky (viz I.6.6).

Existuje-li dále podezření, že se zkoušená látka významně adsorbuje na skle, kalu apod., provede se předběžný odhad pravděpodobného rozsahu adsorpce, a tedy vhodnosti zkoušky pro danou látku (viz tabulka 1). Nasadí se baňka obsahující zkoušenou látku, inokulum a sterilizační činidlo.

Obsah všech baněk se doplní minerálním médiem na 1 litr a po promíchání se z každé baňky odebere vzorek pro stanovení počáteční koncentrace DOC (viz bod 4 dodatku 2). Ústí baněk se zakryjí např. hliníkovou fólií tak, aby byla umožněna volná výměna vzduchu mezi baňkami a okolní atmosférou. Baňky se poté umístí do třepačky a zahájí se zkouška.

▼ B**III.2.5. Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspenze

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola adsorpce

Baňka 8: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

III.2.6. Provedení zkoušky

Během zkoušky se ve známých časových intervalech duplicitně stanovuje koncentrace DOC v každé baňce, a to dostatečně často, aby bylo možné určit začátek 10denního období rozkladu a úbytek v procentech na konci 10denního období rozkladu. Pro každé stanovení se odebere pouze minimální nezbytné množství zkušební suspenze.

Před každým odběrem vzorků se podle potřeby nahradí ztráty odpařováním z baněk přidáním potřebného množství ředící vody (1.6.1). Před odběrem vzorků se kultivační médium dobře promíchá a zajistí se, aby látky ulpělé na stěnách nádob přešly do roztoku nebo suspenze. Vzorky se ihned po odběru zfiltrují přes membránu nebo odstředí (viz bod 4 dodatku 2). Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

III.3. ÚDAJE A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV**III.3.1. Zpracování výsledků**

Rozklad v procentech v čase t se vypočte podle bodu I.7.1 (stanovení DOC) nebo podle bodu I.7.2 (specifická analýza).

Všechny výsledky se uvedou na příslušných formulářích přehledu dat.

III.3.2. Platnost výsledků

Viz bod I.5.2.

III.3.3. Zprávy

Viz bod I.8.

III.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

MODIFIKOVANÁ SCREENINGOVÁ ZKOUŠKA OECD**1. LABORATOŘ****2. DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**

▼ B**3. ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: ... mg/l

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu v čase t_0 : ... mg/l**4. INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: ... mg/l

5. STANOVENÍ UHLÍKU

Analyzátor uhlíku:

	Baňka č.		DOC po n dnech (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Zkoušená látka a inokulturn	1	a_1					
		a_2					
		a, střední hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, střední hodnota $C_{b(t)}$					
Slepá zkouška s inokuletn bez zkoušené látky	3	c_1					
		C_2					
		c, střední hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, střední hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT

Baňka č.		Rozklad po n dnech				
		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				

▼ **B**

Baňka č.		Rozklad po n dnech				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right) \times 100$	0				
Střední hodnota ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

⁽¹⁾ Hodnoty D₁ a D₂ by neměly být průměrovány, pokud je mezi nimi významný rozdíl.

Poznámka: Podobné formuláře lze použít pro referenční chemickou látku a kontrolu toxicity.

7. **ABIOTICKÁ KONTROLA** (nepovinná)

	Cas (dny)	
	0	t
DOC (mg/l) ve sterilní kontrole	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. **SPECIFICKÁ CHEMICKÁ ANALÝZA** (nepovinná)

	Zbýlé množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky (mg/l)	Primární rozklad v procentech
Sterilní kontrola	S _b	
Inokulované zkušební médium	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČÁST IV. ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ CO₂ (metoda C.4-C)

IV.1. PODSTATA METODY

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené látky (10–20 mg DOC nebo TOC na litr), která je jediným zdrojem uhlíku, se provzdušňuje v temnu nebo v difusním světle regulovaným proudem vzduchu bez CO₂. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím vznikajícího CO₂ jímaného v roztoku hydroxidu barnatého nebo sodného, kde se stanoví titrací zbytkového hydroxidu nebo jako anorganický uhlík. Množství CO₂ vzniklého ze zkoušené látky (po korekci na CO₂ pocházející z čistého inokula) se vyjádří v procentech TCO₂. Stupeň biologického rozkladu může být také vypočten z doplňkového stanovení DOC na začátku a na konci inkubace.

▼ B

IV.2. POPIS METODY

IV.2.1. **Přístroje a pomůcky**

- a) baňky na 2–5 l vybavené provzdušňovací trubicí dosahující až ke dnu nádoby a výstupním otvorem;
- b) magnetické míchačky pro zkoušení špatně rozpustných látek;
- c) absorpční lahev;
- d) zařízení pro regulaci a měření průtoku vzduchu;
- e) zařízení pro odstraňování CO₂ při přípravě vzduchu bez CO₂, popřípadě může být použita směs kyslíku bez CO₂ a dusíku bez CO₂ ve správném poměru (20 % O₂ a 80 % N₂) z lahví se stlačenými plyny;
- f) zařízení na stanovení CO₂ buď titračně nebo pomocí analyzátoru anorganického uhlíku;
- g) zařízení pro membránovou filtraci (podle volby);
- h) analyzátor DOC (podle volby).

IV.2.2. **Příprava minerálního média**

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

IV.2.3. **Příprava a předběžná úprava inokula**

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsí.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4. **Příprava baněk**

Jako příklad jsou uvedeny hodnoty pro baňky na 5 litrů obsahující 3 litry suspence. V případě použití menších objemů se hodnoty úměrně upraví, musí být ovšem zajištěno, aby bylo možné přesně měřit vznikající CO₂.

Do každé baňky na 5 litrů se přenese 2 400 ml minerálního média. Přidá se vhodné množství připraveného inokula (viz I.6.4.1 a I.6.5), aby koncentrace suspendovaných látek v konečném objemu 3 litry inokulované směsi byla 30 mg/l. Eventuálně lze nejdříve zředit připravený kal v minerálním médiu na suspensi o koncentraci 500–1 000 mg/l a poté přidat alikvotní části do baňky na 5 litrů, aby byla dosažena koncentrace 30 mg/l; zajistí se tím větší přesnost. Mohou být použity i jiné zdroje inokula (viz I.6.4.2).

Inokulovaná směs se přes noc provzdušňuje vzduchem bez CO₂, aby se ze systému odstranil oxid uhličitý.

▼ B

Odděleně do dvojic baněk se ze zásobních roztoků přidá zkoušená látka a referenční látka tak, aby koncentrace pocházející z chemických látek byla v rozmezí 10 až 20 mg DOC nebo TOC na litr; některé lahve se nasadí jako kontrola inokula bez přidání chemických látek. Špatně rozpustné látky se odváží nebo odměří přímo do baněk, nebo se postupuje podle dodatku 3.

Podle potřeby se jedna baňka použije ke kontrole možného inhibičního účinku zkoušené látky, a to přidáním zkoušené i referenční látky ve stejných koncentracích jako v ostatních baňkách.

Podle potřeby se další baňka použije k ověření, zda se zkoušená látka nerozkládá abioticky, přičemž se použije roztok chemické látky bez inokula (viz I.6.6). Sterilizace se provádí přidáním vhodné koncentrace toxické látky.

Ve všech baňkách se upraví objem na 3 litry přidavkem minerálního média bez CO₂. Podle potřeby lze odebrat vzorky pro stanovení DOC (viz bod 4 dodatku 2) a/nebo pro specifickou analýzu. Poté se na výstup plynů u baněk připojí absorpční lahve.

V případě použití hydroxidu barnatého se za každou baňku na 5 litrů zařadí tři absorpční lahve, každá obsahující 100 ml roztoku Ba(OH)₂ o koncentraci 0,0125 mol/l. Roztok nesmí obsahovat sraženinu síranů a uhličitanu barnatého a jeho koncentrace musí být stanovena bezprostředně před použitím. Je-li použit hydroxid sodný, spojí se dvě absorpční lahve, z nichž druhá slouží jako kontrola, že byl veškerý CO₂ zachycen v první absorpční lahvi. K tomuto účelu se hodí absorpční lahve opatřené sérovými uzávěry. Do každé absorpční lahve se přidá po 200 ml roztoku NaOH o koncentraci 0,05 mol/l, což postačuje k absorpci veškerého oxidu uhličitého, který by se uvolnil při úplném rozkladu látky. Roztok hydroxidu sodného, i když je čerstvě připraven, obsahuje stopy uhličitánů; korekce se provede odečtením množství uhličitánů ve slepém pokusu.

IV.2.5. Počet baněk v typické zkoušce

Baňka 1 a 2: Zkušební suspense

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Abiotická sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

IV.2.6. Provedení zkoušky

Zkouška se zahájí probubláváním vzduchu bez CO₂ suspensí při průtoku 30–100 ml/min. Za účelem analýzy obsahu CO₂ se pravidelně odebírají vzorky absorbentu. Doporučuje se, aby se v průběhu prvních 10 dnů prováděly analýzy každý druhý až třetí den a dále pak každý pátý den až do 28. dne, což umožní rozpoznat období 10denního období rozkladu.

▼ B

28. den se (nepovinně) odebere vzorek pro stanovení DOC a/nebo pro specifickou analýzu, změní se pH suspensí a poté se do každé baňky přidá 1 ml koncentrované HCl; provzdušňuje se přes noc, aby se odstranil CO₂ přítomný v suspensí. Poslední analýza uvolněného CO₂ se provede 29. den.

Ve dnech, kdy se provádí stanovení CO₂, se odpojí absorpční lahev s hydroxidem barnatým bližší zkušební baňce a roztok hydroxidu barnatého se titruje 0,05 M HCl za přítomnosti fenolftaleinu jako indikátoru. Zbývající dvě absorpční lahve se posunou k baňce a na konec řady se zařadí nová absorpční lahev se 100 ml čerstvě připraveného 0,0125 M hydroxidu barnatého. Titrace se provádějí podle potřeby, např. je-li pozorována v první absorpční lahvi zřetelná sraženina a před tím, než vznikne viditelná sraženina ve druhé absorpční lahvi, nebo alespoň jednou týdně. Jinou možností je provést při použití NaOH jako absorbentu odběr malého vzorku hydroxidu sodného pomocí injekční stříkačky (podle použitého analyzátoru uhlíku) z absorpční lahve, která je nejbliž k baňce. Vzorek se nastříkne přímo do IC-části analyzátoru uhlíku pro analýzu anorganického uhlíku.

Obsah druhé absorpční lahve se analyzuje pouze na konci zkoušky s cílem stanovit korekci na možný únik CO₂.

IV.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

IV.3.1. Zpracování výsledků

Množství CO₂ zachyceného v absorpční lahvi je v případě titračního stanovení dáno vztahem:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde:

V = objem HCl spotřebovaný při titraci 100 ml obsahu absorpční lahve (ml),

C_B = koncentrace roztoku hydroxidu barnatého (mol/l),

C_A = koncentrace roztoku kyseliny chlorovodíkové (mol/l).

Je-li C_B 0,0125 mol/l a C_A 0,05 mol/l, je spotřeba pro titraci 100 ml roztoku Ba(OH)₂ 50 ml a hmotnost CO₂ je dána vztahem:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{počet ml HCl spotřebované při titraci} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

V tomto případě se tedy k přepočtu objemu HCl spotřebovaného při titraci na hmotnost vzniklého CO₂ použije faktor 1,1.

S použitím příslušných výsledků titrace se vypočte hmotnost CO₂ vzniklého ze samotného inokula a inokula se zkoušenou látkou a jejich rozdíl je hmotnost CO₂ vzniklého ze samotné zkoušené látky.

Je-li např. výsledkem titrace samotného inokula 48 ml a inokula se zkoušenou látkou 45 ml, je množství

$$\text{CO}_2 \text{ z inokula} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg,}$$

▼ B

CO_2 z inokula a zkoušené látky = $1,1 \times (50 - 45) = 5,5$ mg,

a tedy hmotnost CO_2 vzniklého ze zkoušené látky 3,3 mg.

Biologický rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý CO}_2 \text{ v mg} \times 100}{\text{TCO}_2 \times \text{přidaná zkušební látka v mg}}$$

nebo

$$\text{rozklad v procentech} = \frac{\text{vzniklý CO}_2 \text{ v mg} \times 100}{\text{TCO přidaný ve zkoušce v mg} \times 3,67}$$

přičemž 3,67 je převodní faktor (44/12) pro uhlík a oxid uhličitý.

Rozklad v procentech se po každém období vypočte dosazením hodnoty TCO_2 vypočítané pro každý den až do doby, kdy byl měřen.

Při zachytávání do NaOH se vypočte hmotnost vzniklého CO_2 , vyjádřeného jako anorganický uhlík v mg, vynásobením koncentrace anorganického uhlíku v absorpční lahvi objemem absorpčního roztoku.

Rozklad v procentech se vypočte podle vztahu:

$$\% \text{ThCO}_2 = \frac{\text{anorg. C ze zkušeb. baňky v mg} - \text{anorg. C ze slep. pokusu v mg}}{\text{TOC přidaný jako zkoušená látka v mg}} \times 100$$

Úbytky DOC se (nepovinně) vypočítají podle bodu I.7. Tento výsledek spolu s ostatními výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

IV.3.2. **Platnost výsledků**

Obsah anorganického uhlíku ve zkušební suspensi v minerálním médiu na začátku zkoušky musí být menší než 5 % TC a celkové množství CO_2 vzniklé na konci slepé zkoušky s inokulem nesmí za normálních okolností překročit 40 mg na litr média. Jsou-li hodnoty větší než 70 mg CO_2 na litr, měla by být data i experimentální postup kriticky přehodnoceny.

Viz také I.5.2.

IV.3.3. **Zprávy**

Viz bod I.8.

IV.4. **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA NA UVOLŇOVÁNÍ OXIDU UHLIČITÉHO

1. **LABORATOŘ**
2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**
3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: ... mg/l

▼ B

Počáteční koncentrace chemické látky v médiu: ... mg/l

Celkové množství uhlíku přidaného do baňky: ... mg C

TCO₂: mg CO₂**4. INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace suspendovaných látek v reakční směsi: ... mg/l

Čas (dny)	CO ₂ uvolněný ve zkoušce (mg)		CO ₂ uvolněný ve slepé zkoušce (mg)		Celkové množství CO ₂ (průměr ve zkoušce minus průměr ve slepé zkoušce) (mg)		TCO ₂ kumulativní $\frac{\text{CO}_2}{\text{ThCO}_2} \times 100$		
	1 2	průměr	3 4	průměr	1	2	1	2	průměr
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Poznámka: podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. ANALÝZA UHLÍKU (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepý pokus (mg·l ⁻¹)	Zkoušená látka (mg·l ⁻¹)
0	C _{b(0)}	C ₀
28 ⁽¹⁾	C _{b(t)}	C _t

⁽¹⁾ nebo na konci kultivace.

▼B

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. ABIOTICKÝ ROZKLAD (nepovinné)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{\text{CO}_2 - \text{tvorba CO}_2 \text{ ve steril. podm. po 28 dnech v mg}}{\text{TCO}_2} \times 100$$

ČÁST V. ZKOUŠKA MANOMETRICKOU RESPIROMETRIÍ (metoda C.4-D)**V.1. PODSTATA METODY**

Odměřený objem inokulovaného minerálního média obsahující známou koncentraci zkoušené chemické látky (100 mg zkoušené látky na litr, dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr), která je jediným zdrojem organického uhlíku, se míchá v uzavřené nádobě při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C nebo menší) po dobu 28 dnů. Spotřeba kyslíku se stanoví buď měřením množství kyslíku (elektrolyticky produkovaného), který je potřebný k udržení konstantního objemu plynu v respirační nádobce, nebo ze změny objemu nebo tlaku (nebo obojího) v aparatuře. Uvolněný CO₂ se jímá v roztoku hydroxidu draselného nebo v jiném vhodném absorbentu. Množství kyslíku, které je zkoušenou látkou spotřebováno (korigované na spotřebu kyslíku inokulem ve slepé zkoušce, která se provádí současně), se vyjádří v procentech TSK nebo CHSK. Popřípadě může být z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace vypočten primární biologický rozklad a z analýzy DOC úplný biologický rozklad.

V.2. POPIS METODY**V.2.1. Přístroje**

- a) vhodný respirometr;
- b) regulátor teploty s přesností na ± 1 °C nebo lepší;
- c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);
- d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

V.2.2. Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se 10 ml roztoku a) s 800 ml ředící vody, přidá se po 1 ml roztoků b) až d) a doplní se ředící vodou na 1 litr.

V.2.3. Příprava a předběžná úprava inokula

Inokulum lze získat z řady zdrojů: z aktivovaného kalu, ze splaškových vod, z povrchových vod, z půd nebo z jejich směsí.

Viz I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4. Příprava baněk

S použitím zásobních roztoků se připraví samostatné sady roztoků zkoušené chemické látky a referenční chemické látky v minerálním médiu o koncentraci odpovídající obvykle 100 mg chemické látky na litr (dávající nejméně 50–100 mg TSK na litr).

▼ B

TSK se vypočte z tvorby amoniových solí, pokud lze vyloučit nitrifikaci, v opačném případě by měl být výpočet založen na tvorbě dusičnanů (viz bod 2 dodatku 2).

Změří se pH a v případě potřeby se upraví na $7,4 \pm 0,2$.

Špatně rozpustné látky se přidávají v pozdějším stádiu (viz dále).

Má-li se stanovit toxicita zkoušené látky, připraví se další roztok v minerálním médiu, jenž obsahuje referenční i zkoušenou látku, a to ve stejných koncentracích jako v roztocích obsahujících jen jednu látku.

Požaduje-li se stanovení fyzikálně-chemické spotřeby kyslíku, připraví se roztok zkoušené látky obvykle o koncentraci 100 mg TSK na litr sterilizovaný přídatkem vhodné toxické látky (viz I.6.6).

Připravené objemy roztoků zkoušené a referenční chemické látky se rozdělí alespoň duplicitně do baněk. Do dalších baněk se přidá pouze minerální médium (pro kontrolu inokula) a podle potřeby směs roztoku zkoušené a referenční chemické látky a sterilní roztok.

Je-li zkoušená chemická látka špatně rozpustná, odváží se nebo odměří v tomto stádiu přímo do baněk, nebo se postupuje podle dodatku 3. Do lahví pro absorpci CO₂ se přidá hydroxid draselný, pelety hydroxidu sodného nebo jiný absorbent.

V.2.5. **Počet baněk v typické zkoušce**

Baňka 1 a 2: Zkušební suspence

Baňka 3 a 4: Slepá zkouška s inokulem

Baňka 5: Kontrolní zkouška postupu

Dále se doporučují nebo se podle potřeby použijí:

Baňka 6: Sterilní kontrola

Baňka 7: Kontrola toxicity

Viz také bod I.6.7.

V.2.6. **Provedení zkoušky**

V baňkách se nechá ustavit požadovaná teplota a vybrané baňky se inokulují přidáním aktivovaného kalu nebo jiného zdroje inokula, aby nebyla koncentrace suspendovaných látek větší než 30 mg/l. Zařízení se sestaví, spustí se míchačka, přezkouší se na vzduchotěsnost a zahájí se měření spotřeby kyslíku. Obvykle není třeba věnovat zkoušce žádnou zvláštní pozornost, kromě nezbytných odečtů a denní kontroly teploty a míchání.

Z pravidelných častých odečtů se podle postupu uvedeného výrobcem zařízení vypočte spotřeba kyslíku. Na konci inkubace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách, a to zvláště tehdy, je-li spotřeba kyslíku malá nebo větší než TSK_{NH4} (platí pro látky obsahující dusík).

▼ B

V případě potřeby se na začátku a na konci odebírá vzorek z respiračních nádobek pro stanovení DOC nebo pro specifickou analýzu (viz bod 4 dodatku 2). Při počátečním odběru z baňky se zajistí, aby byl znám objem zkušební suspence, která v baňce zůstala. Je-li kyslík spotřebováván látkami obsahujícími dusík, stanoví se přírůstek koncentrací dusičnanů a dusitanů za 28 dnů a vypočte se korekce na spotřebu kyslíku nitrifikací (dodatek 5).

V.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

V.3.1. Zpracování výsledků

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu kyslíku inokulem za stejnou dobu ve slepé zkoušce) se podělí hmotností zkoušené látky v baňce. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. O}_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. O}_2 \text{ ve slepé zkoušce v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

= mg O₂ na mg zkoušené chemické látky.

Biologický rozklad v procentech se vypočte buď z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \% \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg BSK} (\text{mg O}_2 \text{ na mg chem. látky}))}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg TSK}(\text{mg O}_2 \text{ na mg chem. látky}))} \times 100$$

nebo z rovnice:

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg BSK} (\text{mg O}_2 \text{ na mg chem. látky}))}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg COD} (\text{mg O}_2 \text{ na mg chem. látky}))} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH₄ nebo NO₃) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změny koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

V případě, že se provádí nepovinné stanovení organického uhlíku a/nebo specifické chemické látky, vypočte se stupeň rozkladu podle bodu I.7.

Všechny výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

V.3.2. Platnost výsledků

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O₂ na litr a neměla by být větší než 60 mg/l za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg/l vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6–8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

▼ B

		Čas (dny)											
		0		7		14			21			28	
Rozklad v % $\frac{\text{BOD}}{\text{ThOD}} \times 100$	D ₁ (a1)												
	D ₂ (a2)												
	Průměr ⁽¹⁾												

V = objem média ve zkušební baňce

⁽¹⁾ Hodnoty D₁ a D₂ by neměly být průměrovány, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

Poznámka: Podobný formulát lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. KOREKCE NA NITRIFIKACI (viz příloha V)

Den	0	28	Rozdíl
i) Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)			M
ii) Kyslíkový ekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii) Koncentrace dusitanů (mg N na litr)			(N)
iv) Kyslíkový ekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii+iv) Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. ANALÝZA UHLÍKU (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Čas (dny)	Slepá zkouška (mg l ⁻¹)	Zkoušená látka (mg/l)
0	(C _{blo})	(C _o)
28 ⁽¹⁾	(C _{blt})	(C _t)

⁽¹⁾ nebo na konci inkubace

$$\text{odstraněný DOC v \%} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. SPECIFICKÁ ANALÝZA (nepovinné)

S_b = koncentrace ve fyzikálně-chemické kontrole (sterilní) po 28 dnech,

S_a = koncentrace v inokulované baňce po 28 dnech.

$$\text{biologický rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOTICKÝ ROZKLAD (nepovinné)

a = spotřeba kyslíku ve sterilních baňkách po 28 dnech v mg

$$\text{spotřeba kyslíku na mg zkoušené chemické látky} = \frac{a}{C_o V}$$

▼ B

(viz oddíl 1 a 3)

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times \text{ThOD}}$$

ČÁST VI. ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH (metoda C.4-E)

VI.1. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Roztok zkoušené látky v minerálním médiu, obvykle o koncentraci 2–5 mg/l, se inokuluje malým množstvím mikroorganismů ze směsné kultury a udržuje se ve zcela naplněných uzavřených lahvičkách, v temnu a při konstantní teplotě. Rozklad se sleduje po dobu 28 dnů prostřednictvím analýzy rozpuštěného kyslíku. Množství spotřebovaného kyslíku po korekci na souběžnou slepou zkoušku s inokulem se vyjádří jako TSK nebo CHSK.

VI.2. POPIS METODY

VI.2.1. Přístroje a pomůcky

- a) lahve pro analýzu BSK se skleněnými zátkami, např. na 250 až 300 ml;
- b) vodní lázeň nebo inkubátor pro udržování lahviček při konstantní teplotě (tolerance ± 1 °C nebo menší) v temnu;
- c) velké skleněné lahve na 2–5 litry pro přípravu média a pro naplnění lahviček pro analýzu BSK;
- d) kyslíková elektroda a oxymetr nebo vybavení a činidla pro Winklerovu titrační metodu.

VI.2.2. Příprava minerálního média

Příprava zásobních roztoků je popsána v bodě I.6.2.

Smísí se po 1 ml roztoků a) až d) a doplní se vodou na 1 litr.

VI.2.3. Příprava inokula

Inokulum lze získat z výstupu z druhého stupně čistírny odpadních vod nebo laboratorní jednotky zpracovávající převážně domovní odpadní vody. Alternativním zdrojem inokula může být povrchová voda. Obvykle se použije jedna kapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na litr média; k nalezení optimálního objemu dané odpadní vody může být nezbytné provést pokusy (viz I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4. Příprava baněk

Minerální médium se alespoň 20 minut silně provzdušňuje. Všechny série zkoušek se provedou s minerálním médiem ze stejné dávky. Obecně je médium připraveno k použití po 20 hodinách stání při zkušební teplotě. Pro kontrolu se stanoví obsah kyslíku v médiu; jeho obsah by měl být asi 9 mg/l při 20 °C. Všechny operace přenosu média nasyceného vzduchem a jeho plnění se provedou tak, aby nevznikaly bublinky, např. pomocí nasávaček.

▼B

Připravují se shodné skupiny lahvíček pro analýzu BSK pro stanovení se zkoušenou látkou a referenční látkou v souběžných sériích experimentů. Připraví se dostatečný počet lahvíček, včetně slepých pokusů, tak, aby v každém zvoleném časovém intervalu, např. 0, 7, 14, 21 a 28 dnů, bylo možné provést alespoň dvě měření spotřeby kyslíku. K tomu, aby bylo možné rozpoznat 10denní období rozkladu, může být potřeba více lahvíček.

Velké lahve se přibližně do jedné třetiny naplní provzdušněným médiem. Poté se zvlášť do jednotlivých velkých lahví přidá dostatečný objem zásobního roztoku zkoušené látky a referenční látky, a to obvykle tak, aby nebyla konečná koncentrace chemických látek větší než 10 mg/l. Ke slepému pokusu v další velké lahvi se nepřidávají žádné chemické látky.

S cílem zajistit, aby aktivita inokula nebyla omezená, nesmí koncentrace kyslíku v lahvíčkách pro analýzu BSK klesnout pod 0,5 mg/l. Toto omezuje koncentraci zkoušené látky na 2 mg/l. Pro látky, které se špatně rozkládají, a pro látky s nízkou hodnotou TSK lze použít koncentraci 5–10 mg/l. V některých případech se doporučuje provést souběžně série měření při dvou různých koncentracích zkoušené látky, např. při 2 a 5 mg/l. Obvykle se TSK počítá na základě tvorby amonných solí, ale v případech, kdy se předpokládá nitrifikace nebo kdy dochází k nitrifikaci, se TSK vypočte na základě tvorby dusičnanů (TSK_{NO_3} , viz bod 2 dodatku 2). V případech, kdy nitrifikace není úplná, se provede korekce na změny analytický stanovených koncentrací dusitanů a dusičnanů (viz dodatek 5).

Má-li být vyšetřena toxicita zkoušené látky (např. v případě dříve zjištěné nízké biologické rozložitelnosti), je nezbytné nasadit další sérii lahvíček.

Připraví se další velká láhev s provzdušněným minerálním médiem (naplněná asi do jedné třetiny objemu), do které se přidá zkoušená a referenční chemická látka o konečné koncentraci obvykle stejné jako v případě ostatních velkých lahví.

Roztoky ve velkých lahvích se inokulují výstupem z druhého stupně čistírný odpadních vod (jedna kapka nebo 0,05 až 5 ml/l) nebo z jiného zdroje inokula, jako je např. říční voda (viz I.6.4.2). Nakonec se lahve doplní na objem provzdušněným minerálním médiem za použití hadičky, která sahá na dno, aby se dosáhlo dostatečného promíchání.

VI.2.5. Počet lahvíček v typické zkoušce

V typické zkoušce se použijí tyto lahvíčky:

- nejméně 10 lahvíček se zkoušenou látkou a inokulem (zkušební suspence),
- nejméně 10 lahvíček pouze s inokulem (slepá zkouška s inokulem),
- nejméně 10 lahvíček s referenční látkou a inokulem (kontrolní zkouška postupu),

▼ B

- a podle potřeby 6 lahvíček se zkoušenou látkou, referenční látkou a inokulem (kontrola toxicity). Pro rozpoznání 10denního období rozkladu je však potřebný dvojnásobný počet lahvíček.

VI.2.6 Provedení zkoušky

Všechny připravené roztoky se ihned po přípravě rozdělí do příslušné skupiny lahvíček pro analýzu BSK, a to pomocí hadičky zavedené do spodní čtvrtiny velké lahve (nikoliv ke dnu) tak, aby se všechny lahvíčky pro analýzu BSK zcela naplnily. Jemně se poklepe, aby se odstranily bublinky. V lahvíčkách se Winklerovou metodou nebo pomocí oxymetru ihned stanoví obsah rozpuštěného kyslíku k počátku zkoušky (k času nula). Obsah lahvíček lze konzervovat pro pozdější analýzu přidávkem síranu manganatého a hydroxidu sodného (prvním Winklerovým činidlem). Před provedením zbývajících kroků Winklerovy metody se pečlivě uzavřené lahvíčky obsahující kyslík vázaný ve formě hydratovaného oxidu manganitého skladují v temnu nejdéle 24 hodin při teplotě 10–20 °C. Zbývajících souběžně připravených lahvíček se uzavřou tak, aby v nich nezůstaly bublinky vzduchu, a inkubují se v temnu při 20 °C. Každá série musí být doprovázena úplnou sérií slepého pokusu s inokulovaným médiem. Ve všech sériích se během 28 dnů inkubace v pravidelných intervalech (nejméně jednou týdně) stanoví alespoň ve dvou lahvíčkách obsah rozpuštěného kyslíku.

Týdenní vzorky umožní stanovení rozkladu v procentech ve 14denním období rozkladu, zatímco vzorky odebírané každé 3–4 dny umožní rozpoznat 10denní období rozkladu, což vyžaduje dvojnásobný počet lahvíček.

U látek obsahujících dusík se provede korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci. K tomuto účelu se stanoví koncentrace rozpuštěného kyslíku oxymetrem a poté se z lahvíčky pro analýzu BSK odebere vzorek pro stanovení dusitanů a dusičnanů. Z přírůstku koncentrace dusitanů a dusičnanů se vypočte množství spotřebovaného kyslíku (viz dodatek 5).

VI.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV

VI.3.1. Zpracování výsledků

Nejprve se vypočte BSK, ke které došlo po každé časové periodě, a to odečtením spotřeby kyslíku (v mg O₂/litr) ve slepém pokusu s inokulem od spotřeby zkoušenou chemickou látkou. Takto korigovaná spotřeba se vydělí koncentrací zkoušené látky (mg/l) a získá se specifická BSK v mg kyslíku na mg zkoušené látky. Biologická rozložitelnost v procentech se vypočte jako podíl specifické BSK a specifické TSK (vypočtené podle bodu 2 dodatku 2) nebo CHSK (stanovené analyticky, viz bod 3 dodatku 2), tedy:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. O}_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. O}_2 \text{ ve slep. pokusu v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

▼ B

= mg O₂ na mg zkoušené chemické látky.

$$\text{rozklad v \%} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg BSK (mg O}_2\text{ na mg zkušeb. chem. látky))}}{\text{ThOD(mg O}_2\text{/mg TSK (mg O}_2\text{ na mg zkušeb. chem. látky))}} \times 100$$

nebo

$$\text{Rozklad v \%} = \frac{\text{BOD (mg O}_2\text{/mg BSK (mg O}_2\text{ na mg zkušeb. chem. látky))}}{\text{COD(mg O}_2\text{/mg COD (mg O}_2\text{ na mg zkušeb. chem. látky))}} \times 100$$

Je třeba poznamenat, že tyto dvě metody nemusí poskytovat stejné hodnoty; přednost se dává první metodě.

Pro látky, jež obsahují dusík, se použije vhodná hodnota TSK (pro NH₄ nebo NO₃) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

VI.3.2. **Platnost výsledků**

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu s inokulem by neměla být po 28 dnech vyšší než 1,5 mg/l. Vyšší hodnoty vyžadují přešetření experimentální techniky. Zbytková koncentrace kyslíku ve zkušebních lahvičkách by neměla nikdy klesnout pod 0,5 mg/l. Takto nízké úrovně kyslíku jsou platné pouze tehdy, lze-li použitou metodou stanovení rozpuštěného kyslíku tak nízké úrovně přesně změřit.

Viz také I.5.2.

VI.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

VI.4. PŘEHLED DAT

Dále je uveden příklad přehledu dat.

ZKOUŠKA V UZAVŘENÝCH LAHVIČKÁCH

1. **LABORATOŘ**
2. **DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY**
3. **ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: ... mg/l

Počáteční koncentrace v lahvičce: ... mg/l

TSK nebo CHSK: v mg O₂/mg zkoušené látky

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Provedená úprava:

▼ B

Předběžná úprava, pokud byla provedena:

Koncentrace v reakční směsi: ... mg/l

5. STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU

Metoda: Winklerova metoda/oxymetr

Analýzy lahvíček

Doba kultivace (d)			Rozpuštěný kyslík (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
(bez chemické látky)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Průměr	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Zkoušená chemická látka	1	a ₁				
	2	a ₂				
Průměr	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: Podobný formulář lze použít i pro referenční látku a pro kontroly toxicity.

6. KOREKCE NA NITRIFIKACI (viz příloha V)

Doba kultivace		0	n ₁	n ₂	n ₃
i)	Koncentrace dusičnanů (mg N na litr)				
ii)	Změna koncentrace dusičnanů (mg N na litr)	—			
iii)	Kyslíkový ekvivalent (mg·l ⁻¹)	—			
iv)	Koncentrace dusitanů (mg N na litr)				
v)	Změna koncentrace dusitanů (mg N na litr)	—			
vi)	Kyslíkový ekvivalent (mg·l ⁻¹)	—			
iii + vi)	Celkový kyslíkový ekvivalent (mg·l ⁻¹)	—			

7. ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU: ROZKLAD V PROCENTECH

	Úbytek po n dnech (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
LAHVIČKA 1: (m _{t0} - m _{tx}) - (m _{b0} - m _{bx})				
LAHVIČKA 2: (m _{t0} - m _{tx}) - (m _{b0} - m _{bx})				

▼ B

	Úbytek po n dnech (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
LAHVIČKA 1: $\% D_1 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
LAHVIČKA 2 $\% D_2 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{konc. zkuš. chem} \times \text{ThOD látky}}$				
$\text{průměr } (^1) \% D = \frac{D_1 - D_2}{2}$				
(^1) Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.				

m_{t_0} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase 0

m_{t_x} = hodnota pro zkušební lahvičku v čase x

m_{b_0} = hodnota pro slepý pokus v čase 0

m_{b_x} = hodnota pro slepý pokus v čase x

Použijí se rovněž korekce na nitrifikaci z bodu iii + vi v oddílu 6.

8. ÚBYTEK ROZPUŠTĚNÉHO KYSLÍKU VE SLEPÉM POKUSU

Spotřeba kyslíku ve slepém pokusu je: ($m_{b_0} - m_{b_{28}}$) v mg/l. Tato spotřeba je důležitá pro platnost zkoušky. Měla by být menší než 1,5 mg/l.

ČÁST VII. ZKOUŠKA MITI (Metoda C.4-F)

VII.1. PODSTATA METODY

Měření spotřeby kyslíku v míchaném roztoku nebo suspensi zkoušené chemické látky v minerálním médiu inokulovaném speciální kulturou neadaptovaných mikroorganismů se provádí automaticky po dobu 28 dnů za tmy v uzavřeném respirometru při 25 ± 1 °C. Uvolňovaný oxid uhličitý se jímá v hydroxidu sodném. Biologická rozložitelnost se vyjádří jako spotřeba kyslíku (korigovaná na slepý pokus) vyjádřená v procentech teoretické spotřeby kyslíku (TSK). Primární biologická rozložitelnost vyjádřená v procentech se rovněž vypočte z doplňkové specifické chemické analýzy provedené na začátku a na konci kultivace, popřípadě z analýzy DOC.

VII.2. POPIS METODY

VII.2.1. Přístroje a pomůcky

- a) automatický elektrolytický měřič BSK nebo respirometr standardně vybavený 6 baňkami na 300 ml opatřenými uzávěry obsahujícími absorbent CO_2 ;

▼ B

- b) místnost s konstantní teplotou nebo vodní lázeň nastavená na 25 ± 1 °C;
- c) zařízení pro membránovou filtraci (nepovinné);
- d) analyzátor uhlíku (nepovinné).

VII.2.2. Příprava minerálního média

Za použití reakčních činidel čistoty p.a. se připraví tyto zásobní roztoky (I.6.1):

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Hydrogenfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
| | Chlorid amonný, NH_4Cl | 1,70 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |
| | pH roztoku musí být 7,2. | |
| b) | Síran hořečnatý heptahydrát, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |
| c) | Chlorid vápenatý bezvodý, CaCl_2 | 27,50 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |
| d) | Chlorid železitý hexahydrát, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Rozpustí se ve vodě a doplní na 1 litr. | |

Spojí se po 3 ml roztoků a), b), c), a d) a doplní se na 1 litr.

VII.2.3. Příprava inokula

Odeberou se čerstvé vzorky nejméně z deseti lokalit, kde se používají a vypouštějí různé chemické látky. Z míst, jako jsou čistírny městských a průmyslových odpadních vod, řeky, jezera a moře, se odeberou litrové vzorky kalu, povrchových půd, vody atd., které se pečlivě smíchají. Po odstranění vyplavených látek a ustálení se pH supernatantu upraví na 7 ± 1 hydroxidem sodným nebo kyselinou fosforečnou.

Vhodným objemem filtrovaného supernatantu se naplní nádoba na aktivaci kalu a kapalina se 23,5 hodiny provzdušňuje. Třicet minut po ukončení provzdušňování se odlije přibližně jedna třetina celkového objemu supernatantu a k usazenému materiálu se přidá stejný objem roztoku (pH 7), který obsahuje vždy po 0,1 % glukosy, peptonu a dihydrogenfosforečnanu draselného, a obnoví se provzdušňování. Tento postup se opakuje jednou denně. Kalová jednotka musí být provozovaná podle zásad správné laboratorní praxe: odtok má být čirý, teplota má být udržována při 25 ± 2 °C, pH má být 7 ± 1 , kal se má dobře usazovat, provzdušňování musí být za všech okolností dostatečné, mají být přítomni prvoci a aktivita kalu se má kontrolovat pomocí referenční látky nejméně každé tři měsíce. Inokulum se nepoužívá dříve než po 1 měsíci kultivace, ale ne později než po čtyřech měsících. Proto se v pravidelných intervalech jednou za tři měsíce odebírají vzorky z 10 míst.

▼ B

K udržení stejné aktivity čerstvého a starého kalu se filtrovaný supernatant aktivovaného použitého kalu mísí se stejným objemem filtrovaného supernatantu čerstvě odebraného kalu pocházejícího z deseti zdrojů a směs se kultivuje podle výše uvedeného postupu. Kal se použije jako inokulum až 18–24 hodin po uvedeném zpracování.

VII.2.4. Příprava baněk

Připraví se těchto 6 baněk:

Baňka č. 1: zkoušená chemická látka v ředící vodě, 100 mg/l

Baňka č. 2, 3 a 4: zkoušená chemická látka v minerálním médiu, 100 mg/l

Baňka č. 5: referenční látka (např. anilin) v minerálním médiu, 100 mg/l

Baňka č. 6: pouze minerální médium

Špatně rozpustné chemické látky se odváží nebo odměří, nebo se zpracují podle dodatku 3, s výjimkou těch, u nichž nesmějí být použita rozpouštědla ani emulgátory. Do speciálních uzávěrů všech lahví se přidá absorbent oxidu uhličitého. pH v baňkách č. 2, 3 a 4 se upraví na 7,0.

VII.2.5. Provedení zkoušky

Baňky č. 2, 3 a 4 (zkušební suspence), č. 5 (kontrola aktivity), č. 6 (slepý pokus s inokulem) se inokulují malým množstvím inokula tak, aby byla výsledná koncentrace kalu 30 mg/l. Do lahve č. 1 se inokulum nepřidává, slouží jako abiotická kontrola. Zařízení se sestaví, přezkouší se na vzduchotěsnost, spustí se míchačka a v temnu se zahájí měření spotřeby kyslíku. Denně se kontroluje teplota, míchání, coulometrický zapisovač spotřeby kyslíku a zaznamenají se všechny změny barvy obsahu baněk. Spotřeba kyslíku pro 6 baněk se odečítá přímo, např. šestikanálovým zapisovačem, čímž se získá křivka BSK. Na konci kultivace, obvykle po 28 dnech, se změří pH v baňkách a stanoví se zbytková koncentrace zkoušené chemické látky a jejích produktů rozkladu a v případě zkoušení látek rozpustných ve vodě také koncentrace DOC (postup podle bodu 4 dodatku 2). Zvláštní pozornost je třeba věnovat těkavým látkám. Pokud se předpokládá nitrifikace, stanoví se podle možnosti koncentrace dusičnanů a dusitanů.

VII.3. DATA A PŘEDKLÁDÁNÍ ZPRÁV**VII.3.1. Zpracování výsledků**

Spotřeba kyslíku (mg) zkoušenou látkou za danou dobu (korigovaná na spotřebu inokulem za stejnou dobu ve slepém pokusu) se podělí hmotností použité zkoušené látky. Získá se tak hodnota BSK vyjádřená v mg kyslíku na mg zkoušené látky:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{spotř. O}_2 \text{ zk. chem. látkou v mg} - \text{spotř. O}_2 \text{ ve slepé zkoušce v mg})}{(\text{hmotnost zkoušené chem. látky v baňce v mg})}$$

= mg O₂ na mg zkoušené chemické látky.

▼ B

Biologický rozklad v procentech se potom vypočte z rovnice:

$$\text{biolog. rozklad v \%} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BOD (mg O}_2 \text{ BSK (mg O}_2 \text{ na mg chem. látky))}}{\text{ThOD(mg O}_2 \text{ TSK(mg O}_2 \text{ na mg chem. látky))}} \times 100$$

Pro směsi se TSK vypočte z elementární analýzy, tak jako pro jednoduché sloučeniny. Použije se odpovídající hodnota TSK (TSK_{NH4} nebo TSK_{NO3}) podle toho, zda se očekává nitrifikace, či nikoli (bod 2 dodatku 2). Jestliže k nitrifikaci dochází, avšak není úplná, vypočte se korekce na spotřebu kyslíku při nitrifikaci ze změn koncentrace dusitanů a dusičnanů (dodatek 5).

Vypočte se primární biologický rozklad v procentech z úbytku specifické (výchozí) chemické látky (viz I.7.2):

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta zkoušené chemické látky v baňce č. 1, zaznamenaná se to a jako koncentrace zkoušené látky (S_b) po 28 dnech se pro výpočet biologické rozložitelnosti dosadí tato koncentrace.

Stanovuje-li se koncentrace DOC (nepovinné), vypočte se konečná hodnota biologického rozkladu v procentech podle vztahu:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

jak je uvedeno v bodě I.7.1. Zjistí-li se při měření fyzikálně-chemického úbytku ztráta DOC v baňce č. 1, použije se při výpočtu biologického rozkladu v procentech tato koncentrace DOC.

Všechny výsledky se zaznamenají do příslušného formuláře přehledu dat.

VII.3.2. **Platnost výsledků**

Obvyklá spotřeba kyslíku inokulem je 20–30 mg O₂ na litr a neměla by být větší než 60 mg/l za 28 dnů. Hodnoty větší než 60 mg/l vyžadují kritické přehodnocení výsledků a experimentální techniky. Je-li pH mimo rozpětí 6–8,5 a spotřeba kyslíku zkoušenou látkou je menší než 60 %, měla by být zkouška opakována s nižší koncentrací zkoušené látky.

Viz také I.5.2.

Pokud procenta rozkladu anilinu vypočítaná ze spotřeby kyslíku nepřekročí 40 % po 7 dnech a 65 % po 14 dnech, test je považován za neplatný.

VII.3.3. **Zprávy**

Viz I.8.

VII.4. **PŘEHLED DAT**

Dále je uveden příklad přehledu dat:

ZKOUŠKA MITI (I)

1. LABORATOŘ

2. DATUM POČÁTKU ZKOUŠKY

▼ B**3. ZKOUŠENÁ LÁTKA**

Název:

Koncentrace chemické látky v zásobním roztoku: ... mg/l

Počáteční koncentrace v médiu, C_0 : ... mg/lObjem reakční směsi, V : ... mlTSK: mg O_2 /litr**4. INOKULUM**

Místa odběru kalu:

- | | |
|--------|---------|
| 1. ... | 6. ... |
| 2. ... | 7. ... |
| 3. ... | 8. ... |
| 4. ... | 9. ... |
| 5. ... | 10. ... |

Koncentrace suspendovaných látek v aktivovaném kalu po aklimatizaci se syntetickými splašky = ... mg/l.

Objem aktivovaného kalu v litru konečného média = ... ml

Koncentrace kalu v konečném médiu = ... mg/l

5. SPOTŘEBA KYSLÍKU BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST

Typ použitého respirometru:

		Čas {dny}				
		0	7	14	il	2S
Spotřeba O_2 (mg) zkoušenou látkou	a_1					
	a_2					
	a_3					
Spotřeba O_2 (mg) ve slepé zkoušce	b					
Korigovaná spotřeba O_2 (mg)	$(a_1 - b)$ $(a_1 - b)$ $(a_1 - b)$					
BSK na mg zkoušené látky	$\frac{(a - b)}{C_0 V}$	Baňka 1				
		Baňka 2				
		Baňka 3				
Rozklad v % BOD $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1				
		2				
		3				
		Průměr ⁽¹⁾				

⁽¹⁾ Hodnoty nelze průměrovat, je-li mezi nimi výrazný rozdíl.

▼B

Poznámka: podobný formulár lze použít i pro referenční látku.

6. **ANALÝZA UHLÍKU** (podle volby)

Analyzátor uhlíku:

Baňka	DOC			úbytek DOC v %	Průměr
	Naměřená hodnota	Korigovaná hodnota			
Voda + zkoušená látka	a			—	—
Kal + zkoušená látka	b ₁		b ₁ - c		
Kal + zkoušená látka	b ₂		b ₂ - c		
Kal + zkoušená látka	b ₃		b ₃ - c		
Kontrolní slepá zkouška	c		—	—	—

$$\text{odstraněný DOC v\%} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATA ZE SPECIFICKÉ CHEMICKÉ ANALÝZY**

	Zbytkové množství zkoušené chemické látky na konci zkoušky	Rozklad v %
Slepá zkouška s vodou	S _b	
Inokulované médium	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\text{rozklad v \%} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Rozklad v % se vypočte pro baňky a1, a2, a3.

8. **POZNÁMKY**

Připojí se křivka závislosti BSK na čase, je-li k dispozici.

▼ B

DODATEK 1

ZKRATKY A DEFINICE

- DO: Rozpuštěný kyslík (dissolved oxygen) (mg/l) je koncentrace kyslíku, který je rozpuštěn ve vodném vzorku.
- BSK: Biochemická spotřeba kyslíku (biochemical oxygen demand, BOD) (g) je množství kyslíku, jež je v průběhu metabolizace zkoušené látky spotřebováno mikroorganismy; vyjadřuje se také jako spotřeba kyslíku v gramech na gram zkoušené látky (viz metoda C.5).
- CHSK: Chemická spotřeba kyslíku (chemical oxygen demand, COD) (g) je množství kyslíku, jež je spotřebováno v průběhu oxidace zkoušené látky horkým kyselým dichromanem; je měřítkem množství přítomných oxidovatelných látek; vyjadřuje se také v gramech kyslíku spotřebovaného na gram zkoušené látky (viz metoda C.6).
- DOC: Rozpuštěný organický uhlík (dissolved organic carbon) je celkový organický uhlík, který je přítomný v roztoku nebo projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 µm nebo zůstane v supernatantu po odstředování po dobu 15 minut při zrychlení 40 000 m/s² (asi 4 000 g).
- TSK: Teoretická spotřeba kyslíku (theoretical oxygen demand, ThOD) (mg) je celkové množství kyslíku nezbytné pro úplnou oxidaci chemické látky; vypočte se z molekulového vzorce látky (viz bod 2 dodatku 2) a vyjadřuje se také jako množství kyslíku v mg nezbytné na mg zkoušené látky.
- TCO₂: Teoretický oxid uhličitý (theoretical carbon dioxide, ThCO₂) je množství oxidu uhličitého, které by mělo vzniknout ze známého nebo změřeného obsahu uhlíku ve zkoušené látce za předpokladu její úplné mineralizace; vyjadřuje se v mg oxidu uhličitého uvolněného z 1 mg zkoušené látky.
- TOC: Celkový organický uhlík (total organic carbon) ve vzorku je součtem organického uhlíku v roztoku a v suspensi.
- IC: Anorganický uhlík (inorganic carbon).
- TC: Celkový uhlík (total carbon) je součtem organického a anorganického uhlíku ve vzorku.

Primární biologický rozklad:

jsou změny chemické struktury látky způsobené biologickým působením, vedoucí ke ztrátě specifických vlastností látky.

Úplný biologický rozklad (aerobní):

je stupeň rozkladu látky dosažený po jejím úplném zužitkování mikroorganismy, vedoucí k produkci oxiduuhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální buněčné hmoty (biomasy).

Snadno biologicky rozložitelná:

je dohodnutá klasifikace chemických látek, které prošly screeningovými zkouškami úplné biologické rozložitelnosti; tyto zkoušky jsou tak přísné, že lze předpokládat, že se látky budou ve vodném prostředí za aerobních podmínek rychle a úplně biologicky rozkládat.

▼ B*Biologicky rozložitelná:*

je klasifikace chemických látek, pro něž existuje nepochybný důkaz o jejich biologické rozložitelnosti (primární nebo konečné) v kterékoli uznávané zkoušce biologické rozložitelnosti.

Odstranitelnost:

je náklonnost látek k jejich odstranění při biologickém čištění odpadních vod, aniž by byl nepříznivě ovlivněn normální průběh čistících pochodů. Látky snadno biologicky rozložitelné jsou obecně odstranitelné, avšak ne všechny rozložitelné látky jsou odstranitelné. Mohou zde působit také abiotické procesy.

Fáze iniciace:

je doba, ve zkoušce na úbytek rozpuštěného organického uhlíku, od inokulace do dosažení alespoň 10 % biologického rozkladu. Fáze iniciace je často různě dlouhá a špatně reprodukovatelná.

Doba rozkladu:

je doba od konce fáze zdržení do dosažení 90 % maximální dosažitelné úrovně rozkladu.

10denní období rozkladu:

je 10 dnů, které následují bezprostředně po dosažení 10 % rozkladu.

▼ B

DODATEK 2

VÝPOČET A STANOVENÍ NĚKTERÝCH SOUHRNNÝCH PARAMETRŮ

V závislosti na zvolené zkušební metodě se vyžaduje určení některých souhrnných parametrů. V následujícím oddíle je popsán výpočet těchto hodnot. Využití těchto parametrů je popsáno u jednotlivých metod.

1. Obsah uhlíku

Obsah uhlíku se počítá ze známého elementárního složení nebo se stanoví analýzou prvků ve zkoušené látce.

2. Teoretická spotřeba kyslíku (TSK)

Teoretickou spotřebu kyslíku (TSK) lze vypočítat ze znalosti elementárního složení nebo z výsledků analýzy prvků. Pro látku



bez nitrifikace

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

nebo s nitrifikací

$$ThOD_{NO3} = \frac{16[2c + 1/2(h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Chemická spotřeba kyslíku (CHSK)

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) se stanoví metodou C.6.

4. Rozpuštěný organický uhlík (DOC)

Rozpuštěným organickým uhlíkem je podle definice organický uhlík přítomný ve vodném roztoku chemické látky nebo směsi, který projde přes filtr o velikosti pórů 0,45 µm.

Odeberou se vzorky ze zkušebních nádob a ihned se filtrují pomocí filtračního zařízení s vhodným membránovým filtrem. Prvních 20 ml (toto množství může být při použití malých filtrů zmenšeno) se odstraní. 10–20 ml, nebo v případě nástřiku menší objem (objem závisí na množství potřebném pro analýzu), se uschová pro analýzu uhlíku. Koncentrace DOC se stanoví pomocí analyzátoru organického uhlíku, který umožňuje přesné stanovení koncentrace uhlíku, která je menší nebo rovna 10 % počáteční koncentrace DOC použité ve zkoušce.

Zfiltrované nebo odstředěné vzorky se analyzují týž den, v opačném případě se uchovávají nejdéle 48 hodin při 2–4 °C nebo delší dobu při teplotě nižší než –18 °C.

Poznámky:

Membránové filtry jsou často impregnovány povrchově aktivními látkami za účelem jejich hydrofilizace. Filtr tedy může obsahovat až několik mg rozpustného organického uhlíku, který může ovlivnit stanovení biologické rozložitelnosti. Povrchově aktivní látky a jiné rozpustné organické látky se z filtrů odstraňují vyvařením třikrát jednu hodinu v deionizované vodě. Filtry lze poté skladovat 1 týden ve vodě. Při použití filtračních patron pro jedno použití se musí u každé šarže ověřit, zda neobsahuje rozpustný organický uhlík.

▼B

V závislosti na typu membránového filtru může docházet k adsorpci zkoušené látky na filtru. Doporučuje se ověřit, zda k adsorpci zkoušené chemické látky na filtru nedochází.

Místo filtrace lze použít k rozlišení TOC od DOC odstředování při 40 000 m² s⁻² (4 000 g) po dobu 15 minut. Tato metoda však není spolehlivá při počáteční koncentraci DOC < 10 mg/l, protože buď nelze odstranit všechny bakterie, nebo se zpětně rozpouští uhlík, který je součástí bakteriální plasmy.

LITERATURA

- 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.

▼B*DODATEK 3***VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ŠPATNĚ ROZPUSTNÝCH LÁTEK**

Při zkouškách biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek si zaslouží zvláštní pozornost následující aspekty.

Zatímco odběr vzorků homogenních kapalin je problémem jen zřídka, u pevných látek se doporučuje provést homogenizaci vhodnými prostředky, aby v důsledku nehomogenity nedošlo k chybám. Zvláštní pozornost musí být věnována odběrům reprezentativních vzorků o několika miligramech ze směsi látek, které obsahují velké množství nečistot.

V průběhu zkoušek lze použít různé způsoby míchání. Je třeba věnovat pozornost tomu, aby míchání bylo přiměřené právě pro udržení látky v disperzi a nedocházelo k přehřívání, nadměrnému pění a nadměrným třecím silám.

Může se použít emulgátor vytvářející stálé disperzi chemické látky. Nesmí být toxický pro bakterie a nesmí se biologicky rozkládat nebo pěnit za zkušebních podmínek.

Stejná kritéria jako pro emulgátory platí i pro rozpouštědla.

U pevných zkoušených látek se nedoporučuje používat pevné nosiče, mohou však být vhodné v případě olejovitých látek.

Použiji-li se pomocné látky, jako jsou emulgátory, rozpouštědla a nosiče, musí být proveden slepý pokus s pomocnou látkou.

Pro studium biologické rozložitelnosti špatně rozpustných látek lze použít kteroukoli ze tří respirometrických zkoušek (zkouška na úbytek CO₂, na BSK, zkouška MITI).

LITERATURA

- de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
- Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B*DODATEK 4***VYHODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI LÁTEK
POTENCIÁLNĚ TOXICKÝCH PRO INOKULUM**

Je-li chemická látka podrobena zkoušení snadné biologické rozložitelnosti a jeví se jako biologicky nerozložitelná, doporučuje se postupovat při požadavku rozlišit inhibiční působení od odolnosti látky vůči rozkladu následujícím způsobem (Reynolds et al., 1987).

Ve zkouškách toxicity i ve zkouškách biologické rozložitelnosti se použijí podobná nebo stejná inokula.

K posouzení toxicity chemických látek zkoušených ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti se doporučuje použít zkoušku inhibice dýchání aktivovaného kalu (směrnice 88/302/EHS), stanovení BSK nebo metodu inhibice růstu nebo kombinaci těchto metod.

Nemá-li dojít k inhibici z důvodu toxicity, měla by být koncentrace zkoušené látky použita ve zkouškách snadné biologické rozložitelnosti menší než 1/10 hodnoty EC_{50} (nebo menší než EC_{20}) zjištěné zkouškou toxicity. Látky s $EC_{50} > 300$ mg/l pravděpodobně nemají při zkouškách snadné biologické rozložitelnosti toxické účinky.

Hodnoty $EC_{50} < 20$ mg/l mohou při následném zkoušení působit potíže. Měly by být použity nízké koncentrace, což vyžaduje použít přísné a citlivé zkoušky v uzavřených lahvičkách nebo materiál značený ^{14}C . Použití vyšších koncentrací zkoušené látky může být popřípadě umožněno nasazením aklimatizovaného inokula. V tomto případě se však ztrácí specifické kritérium zkoušky snadné biologické rozložitelnosti.

LITERATURA

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

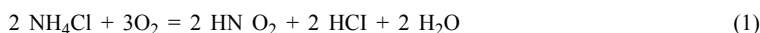


DODATEK 5

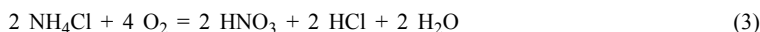
KOREKCE NA SPOTŘEBU KYSLÍKU PŘI NITRIFIKACI

Chyby způsobené tím, že při stanovení spotřeby kyslíku ve zkouškách látek, které neobsahují dusík, není vzata v úvahu nitrifikace, nejsou významné (nejsou větší než 5 %), i když je oxidace amoniakálního dusíku ve zkušebních nádobách a ve slepém pokusu nepravdělná. U zkoušených látek obsahujících dusík může dojít ke značným chybám.

Dochází-li k nitrifikaci, avšak nikoli úplně, musí být spotřeba kyslíku reakční směsi korigována na množství kyslíku spotřebovaného na oxidaci amoniaku a amonných iontů na dusitany a dusičnany, jsou-li změny koncentrace dusitanů a dusičnanů během kultivace stanoveny pomocí těchto rovnic:



Celkově:



Podle rovnice 1 je spotřeba kyslíku při oxidaci 28 g dusíku obsaženého v NH_4Cl na dusitan 96 g, tzn., že přepočítávací faktor je 3,43 (96/28). Stejně tak je podle rovnice 3 spotřeba kyslíku při oxidaci na dusičnan 128 g, tzn. přepočítávací faktor je 4,57 (128/28).

Protože popsané reakce následují po sobě, přičemž jsou realizovány odlišnými druhy bakterií, může koncentrace dusitanů stoupat i klesat; při poklesu roste odpovídajícím způsobem koncentrace dusičnanů. Spotřeba kyslíku při tvorbě dusičnanů se tedy vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusičnanů faktorem 4,57, zatímco spotřeba kyslíku při tvorbě dusitanů se vypočte vynásobením přírůstku koncentrace dusitanů faktorem 3,43, nebo při poklesu obsahu dusitanů se ztráty kyslíku vypočtou vynásobením poklesu koncentrace faktorem - 3,43.

To znamená:

$$\text{O}_2 \text{ spotřebovaný při tvorbě dusičnanů} = 4,57 \times \text{přírůstek koncentrace dusičnanů} \quad (4)$$

a

$$\text{O}_2 \text{ spotřebovaný při tvorbě dusitanů} = 3,43 \times \text{přírůstek koncentrace dusitanů} \quad (5)$$

a

$$\text{O}_2 \text{ při úbytku dusitanů} = - 3,43 \times \text{pokles koncentrace dusitanů} \quad (6)$$

Tedy

$$\text{spotřeba O}_2 \text{ při nitrifikaci} = \pm 3,43 \times \text{změna koncentrace dusitanů} + 4,57 \times \text{změna koncentrace dusičnanů} \quad (7)$$

a tedy

$$\text{spotřeba O}_2 \text{ při oxidaci uhlíku} = \text{celková zjištěná spotřeba} - \text{spotřeba při nitrifikaci} \quad (8)$$

Jestliže se stanoví pouze celkový oxidovaný dusík, bude se v prvním přiblížení rovnat spotřeba kyslíku při nitrifikaci hodnotě $4,57 \times$ přírůstek koncentrace oxidovaného dusíku.

Korigovaná hodnota spotřeby kyslíku při oxidaci uhlíku se poté porovná s TSK NH_3 vypočtenou podle dodatku 2.

▼ B**C.5. ROZKLAD – BIOCHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU****1. METODA****1.1. ÚVOD**

Metoda je určena pro měření biochemické spotřeby kyslíku (BSK) pevných nebo kapalných organických látek.

Data získaná při této zkoušce platí pro látky rozpustné ve vodě; těkavé látky a látky s nízkou rozpustností ve vodě lze touto metodou alespoň v zásadě rovněž zkoušet.

Metodu lze použít pouze pro organické látky, které nemají v koncentracích používaných při zkoušce inhibiční účinek na bakterie. Není-li daná látka při koncentracích používaných ve zkoušce rozpustná, může být nezbytné použít pro dosažení dobré dispergace zkoušeného materiálu zvláštní postupy, např. dispergaci ultrazvukem.

Informace o toxicitě chemické látky mohou být užitečné při interpretaci nízkých hodnot výsledku zkoušky a při volbě vhodných zkoušených koncentrací.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Biochemická spotřeba kyslíku (BSK) je definována jako množství rozpuštěného kyslíku, které je nutné k biochemické oxidaci určitého objemu roztoku látky za předepsaných podmínek.

Výsledky se vyjadřují v gramech spotřeby kyslíku (BSK) na 1 g zkoušené látky.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Je žádoucí použít vhodnou referenční látku pro kontrolu aktivity inokula.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vhodném, dobře provzdušněném médiu se inokuluje mikroorganismy a kultivuje se v temnu za stálé, definované teploty.

BSK se stanoví z rozdílu mezi obsahem rozpuštěného kyslíku na začátku a na konci zkoušky. Zkouška musí trvat nejméně pět dní a nejdéle 28 dní.

Souběžně musí být provedena slepá zkouška bez obsahu zkoušené látky.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Stanovení BSK nelze považovat za ověřené stanovení biologické rozložitelnosti látky. Tuto zkoušku lze považovat pouze za screenigovou zkoušku.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se předběžný roztok nebo disperse zkoušené látky o koncentraci vhodné pro použitou metodu. Poté se stanoví BSK některou vhodnou národní nebo mezinárodní standardizovanou metodou.

▼ B**2. DATA A HODNOCENÍ**

BSK předběžného roztoku se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přečte se na BSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

3. ZPRÁVY

Uvede se použitá metoda.

Biochemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří platných měření.

Musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav, toxické účinky a vlastní složení zkoušené látky.

Použití přísad pro inhibici biologické nitrifikace musí být uvedeno.

4. LITERATURA

Seznam příkladů standardizovaných metod:

NF T 90-103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B**C.6. ROZKLAD – CHEMICKÁ SPOTŘEBA KYSLÍKU****1. METODA****1.1. ÚVOD**

Metoda je určena pro měření chemické spotřeby kyslíku (CHSK) pevných nebo kapalných organických látek prováděné standardním dohodnutým způsobem za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Pro provedení této zkoušky a pro interpretaci výsledků jsou užitečné informace o chemickém vzorci látky (např. zda jde o soli halogenů, železnaté soli organických sloučenin, organické sloučeniny chloru).

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Chemická spotřeba kyslíku (CHSK) je mírou oxidovatelnosti látky, která se vyjadřuje jako ekvivalentní množství kyslíku oxidačního činidla spotřebovaného látkou za pevně stanovených laboratorních podmínek.

Výsledek se vyjadřuje jako množství spotřebovaného kyslíku (COD) v gramech na 1 g zkoušené látky.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Při vyšetřování nové látky není nutné vždy používat referenční látky. Měly by v první řadě sloužit k občasné kontrole provedení metody a ke vzájemnému porovnávání výsledků získaných jinými metodami.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Předem stanovené množství látky rozpuštěné nebo dispergované ve vodě se za přítomnosti síranu stříbrného jako katalyzátoru oxiduje dichromanem draselným v prostředí koncentrované kyseliny sírové pod zpětným chladičem. Přebytečný dichroman se stanoví titrací odměrným roztokem síranu amonnoželeznatého.

U látek obsahujících chlór se pro omezení rušení chloridy přidává síran rtuťnatý ⁽¹⁾.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Vzhledem k dohodnutým podmínkám stanovení je CHSK „ukazatelem oxidovatelnosti“ a jako takový se používá pro hodnocení organických látek.

Ve zkoušce mohou rušit chloridy; na stanovení CHSK mohou mít rovněž vliv anorganické redukční a oxidační látky.

U některých cyklických sloučenin a u řady těkavých sloučenin (např. u nižších mastných kyselin) nedochází v této zkoušce k úplné oxidaci.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

Připraví se počáteční roztok nebo disperze látky tak, aby bylo dosaženo CHSK od 250 do 600 mg/l.

⁽¹⁾ S roztoky obsahujícími rtuť se po použití nakládá tak, aby nedošlo k průniku rtuti do životního prostředí.

▼B*Poznámky:*

U špatně rozpustných nebo nedispergovatelných látek lze jemně rozmělněnou látku nebo kapalinu v množství odpovídajícím 5 mg CHSK odvážit a vpravit přímo do experimentální aparatury s vodou.

Často je výhodné, zejména v případě špatně rozpustných látek, stanovit CHSK upravenou metodou, tj. v uzavřeném systému s vyrovnávačem tlaku (H. Kelkenberg, 1975). Touto upravenou metodou lze často úspěšně kvantifikovat i látky, u nichž je stanovení konvenční metodou obtížné – např. kyselinu octovou. Metoda však také selhává v případě pyridinu. Zvýší-li se koncentrace dichromanu draselného předepsaná v (1) na 0,25 N (0,0416 M), usnadní se přímé navažování 5–10 mg látky, což je důležité pro stanovení CHSK látek obtížně rozpustných ve vodě (2).

Jinak se CHSK stanoví vhodnou národní nebo mezinárodní metodou.

2. DATA A HODNOCENÍ

CHSK obsahu experimentální baňky se vypočte vybranou normalizovanou metodou a přepočte se na CHSK vyjádřenou v gramech na 1 g zkoušené látky.

3. ZPRÁVY

Uvede se odkaz na použitou metodu.

Chemická spotřeba kyslíku se vypočte jako průměr výsledků alespoň tří měření. Jsou-li známy, musí být uvedeny všechny informace a poznámky, které jsou důležité pro interpretaci výsledků a které by mohly ovlivnit výsledek, zejména pokud jde o nečistoty, fyzikální stav a základní vlastnosti zkoušené látky.

Uvede se použití síranu rtuťnatého za účelem omezení rušení chlořidy.

4. LITERATURA

- 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.

Seznam příkladů normovaných metod:

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 per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B**C.7. ABIOTICKÝ ROZKLAD – HYDROLÝZA JAKO FUNKCE PH****1. METODA**

Tato zkušební metoda odpovídá pokynům OECD TG 111 (2004).

1.1. ÚVOD

Chemikálie mohou vstupovat do povrchových vod cestami, jako je přímá aplikace, rozprášený postřik, odplavení, odvodňování, zneškodňování odpadu, průmyslové odpadní vody, odpadní vody z domácností a ze zemědělství a atmosférické depozice, a v těchto vodách se mohou chemickými (např. hydrolyza, oxidace), fotochemickými a/nebo mikrobiálními procesy měnit. Tyto pokyny popisují laboratorní zkušební metody pro hodnocení abiotických hydrolytických přeměn chemikálií ve vodních systémech při hodnotách pH běžně se nacházejících v životním prostředí (pH 4–9), přičemž vycházejí ze stávajících pokynů (1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7).

Pokusy se provádějí pro stanovení i) rychlosti hydrolyzy zkoušené látky jako funkce pH a ii) identity nebo povahy a rychlosti tvorby a rozkladu produktů hydrolyzy, kterým mohou být organismy vystaveny. Tyto studie lze požadovat pro chemikálie, které se aplikují přímo do vody, nebo u nichž existuje pravděpodobnost, že vniknou do životního prostředí jinými než výše popsány cestami.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Viz příloha 2.

1.3. VHODNOST ZKUŠEBNÍ METODY

Tato metoda je obecně použitelná na chemické látky (radioizotopově neznačené nebo značené), pro které je k dispozici analytická metoda s dostatečnou přesností a citlivostí. Je použitelná na slabě těkavé a netěkavé směsi dostatečné rozpustnosti ve vodě. Zkouška by se neměla používat na chemikálie, které jsou vysoce těkavé z vody (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy udržovat v roztoku za experimentálních podmínek této zkoušky. Zkouška může být obtížně proveditelná v případě látek s minimální rozpustností ve vodě (8).

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Sterilní vodní pufrální roztoky různých hodnot pH (pH 4, 7 a 9) se podrobují chemickému působení zkušební látkou a inkubují v temnu za regulovaných laboratorních podmínek (při konstantních teplotách). Po příslušném časovém intervalu se pufrální roztoky analyzují pro přítomnost zkoušené látky a produktů hydrolyzy. Látkovou bilanci lze snadněji stanovit u radioizotopově značených zkoušených látek (např. ¹⁴C).

Tato zkušební metoda je navržena jako stupňovitý přístup, dále uvedený a vysvětlený v příloze 1. Každý stupeň závisí na výsledcích předchozího stupně.

▼B

1.5. ÚDAJE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro měření rychlosti hydrolyzy lze použít radioizotopově neznačených nebo značených zkoušených látek. Pro studium způsobu hydrolyzy a pro stanovení hmotnostní bilance se obvykle dává přednost radioizotopově značené látce. Ve zvláštních případech však nemusí být radioizotopové značení nezbytně nutné. Doporučuje se radioizotopové značení ^{14}C , ale použití jiných izotopů jako ^{13}C , ^{15}N , ^3H může být také vhodné. Pokud je to možné, mělo by se značení nacházet v nejstabilnější části molekuly. Pokud například zkoušená látka obsahuje jedno jádro, vyžaduje se značení na tomto řetězci. Jestliže zkoušená látka obsahuje dvě nebo více jader, bude potřeba provést oddělené studie pro zhodnocení rozpadu každého značeného jádra a získání odpovídajících informací o vzniku produktů hydrolyzy. Čistota zkoušené látky by měla být alespoň 95 %.

Před prováděním hydrolytických zkoušek by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

- a) rozpustnost ve vodě (zkušební metoda A.6);
- b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;
- c) tlak par (zkušební metoda A.4) a/nebo Henryho konstanta;
- d) rozdělovací koeficient oktanol/voda (zkušební metoda A.8);
- e) disociační konstanta (pK_a) (pokyny OECD 112) (9);
- f) rychlost případné přímé a nepřímé fototransformace ve vodě.

Měly by být k dispozici analytické metody pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a případně pro identifikaci a kvantitativní stanovení produktů hydrolyzy ve vodných roztocích (viz také oddíl 1.7.2).

1.6. REFERENČNÍ LÁTKY

Kde je to možné, měly by být pro identifikaci a kvantitativní stanovení produktů hydrolyzy pomocí spektroskopické a chromatografické metody nebo jiné dostatečně citlivé metody použity referenční látky.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. Výtěžek metody

Analýza alespoň dvou pufrčních roztoků nebo jejich extraktů okamžitě po přidání zkoušené látky poskytuje první údaje o opakovatelnosti analytické metody a o shodnosti postupu použití zkoušené látky. Výtěžky v posledních fázích pokusů závisí na příslušných hmotnostních bilancích (při použití radioizotopově značené látky). Výtěžky by se měly pohybovat od 90 % do 110 % u radioizotopově značených a radioizotopově neznačených chemikálií (7). V případě, že je technicky obtížné dosáhnout tohoto rozpětí, je pro radioizotopově neznačené chemikálie přípustný výtěžek 70 %. V tomto případě však musí být poskytnuto zdůvodnění.

▼ B**1.7.2. Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody použité pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a produktů hydrolyzy v pozdějších stádiích lze zkontrolovat dvojitou analýzou stejných pufrálních roztoků (nebo jejich extraktů) poté, co vznikne dostatečné množství produktů hydrolyzy pro jejich kvantitativní stanovení.

Analytická metoda by měla být dostatečně citlivá na to, aby bylo možno kvantitativně stanovit zkoušenou látku v koncentraci až do 10 % počáteční koncentrace nebo nižší. Je-li to potřeba, měly by být analytické metody také dostatečně citlivé, aby bylo možno kvantitativně stanovit všechny produkty hydrolyzy představující 10 % nebo více aplikované zkoušené látky (a to aplikované kdykoli během studie) a 25 % nebo méně její maximální koncentrace.

1.7.3. Intervaly spolehlivosti hydrolytických kinetických dat

Intervaly spolehlivosti by měly být vypočítány a uvedeny pro všechny regresní koeficienty, rychlostní konstanty, poločasy a další kinetické parametry (např. DT50).

1.8. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.8.1. Přístroje a pomůcky**

Studie by se měla provádět ve skleněných nádobách (např. zkumavky, malé baňky) v temnu a ve sterilních podmínkách, pokud ovšem předběžná informace (jako rozdělovací koeficient oktanol/voda) nenaznačuje, že by zkoušená látka mohla lnout ke sklu. V těchto případech je potřeba zvážit alternativní materiály (jako teflon). Problém lnutí ke sklu by mohlo také být možné zmírnit použitím jedné nebo více z následujících metod:

- stanovení hmotnosti zkoušené látky a produktů hydrolyzy sorbovaných ke zkušební nádobě,
- použití ultrazvukové lázně,
- zajištění omytí skla rozpouštědlem mezi každým intervalem odběru vzorku,
- použití upravených přípravků,
- použití zvýšeného množství kosolventu pro přidávání zkoušené látky do systému; v případě použití kosolventu by se měl použít kosolvent, který nezpůsobuje hydrolyzu zkoušené látky.

Pro inkubaci různých zkušebních roztoků je obvykle potřeba použít třepací vodní lázně s regulací teploty nebo inkubátory s termostatickou regulací.

Vyžaduje se standardní laboratorní vybavení, zejména:

- pH-metr,

▼ B

- analytické přístroje jako zařízení pro GC, HPLC, TLC, včetně odpovídajících detekčních systémů pro analýzu radioizotopově značených a neznačených látek nebo inverzní zředovací metodu pro izotopy,
- přístroje pro účely identifikace (např. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atd.),
- tekutý scintilační počítač,
- dělicí nálevky na extrakci kapalina-kapalina,
- přístroje pro zvyšování koncentrace roztoků a extraktů (např. rotační odpařovací zařízení),
- zařízení pro regulaci teploty (např. vodní lázeň).

Chemická činidla zahrnují například:

- organická rozpouštědla, činidla analytické kvality jako hexan, dichlormetan atd.,
- scintilační kapalinu,
- pufrční roztoky (podrobnosti viz v oddíle 1.8.3).

Veškeré sklo, voda čistoty p.a. a pufrční roztoky používané v hydrolytických zkouškách by měly být sterilizované.

1.8.2. Aplikace zkoušené látky

Zkoušená látka by se měla aplikovat jako vodný roztok do různých pufrčních roztoků (viz dodatek 3). Je-li to nutné pro dosažení řádného rozpuštění, je dovoleno pro aplikaci a distribuci zkoušené látky použít malé množství rozpouštědel mísitelných s vodou (jako acetonitril, aceton, etanol), neměly by však překročit 1 % obj. Uvažuje-li se o vyšší koncentraci rozpouštědel (např. v případě málo rozpustných zkoušených látek), je to možné pouze tehdy, lze-li dokázat, že rozpouštědlo nemá žádný vliv na hydrolyzu zkoušené látky.

Použití upraveného přípravku se běžně nedoporučuje, protože nelze vyloučit, že by složky formulace neměly vliv na hydrolytický proces. U zkoušených látek špatně rozpustných ve vodě nebo u látek, které lnou ke sklu (viz oddíl 1.8.1), však může být použití upraveného materiálu vhodnou alternativou.

Použit by se měla jen jedna koncentrace zkoušené látky. Neměla by překročit 0,01 M nebo polovinu koncentrace nasyceného roztoku (viz dodatek 1).

▼ B**1.8.3. Pufrační roztoky**

Hydrolytická zkouška by se měla provádět při hodnotách pH 4, 7 a 9. K tomuto účelu se za použití chemikálií a vody čistoty p.a. připraví pufrační roztoky. Některé vhodné pufrační roztoky jsou uvedeny v příloze 3. Je třeba poznamenat, že použitý pufrační roztok může mít vliv na rychlost hydrolyzy. Je-li tomu tak, je třeba zvolit jiný pufrační roztok ⁽¹⁾.

Hodnota pH každého pufračního roztoku by se měla ověřit kalibrovaným pH-metrem s přesností alespoň 0,1 při požadované teplotě.

1.8.4. Zkušební podmínky**1.8.4.1. Zkušební teplota**

Hydrolytické pokusy by se měly provádět za konstantních teplot. Pro účely extrapolace je důležité udržovat teplotu alespoň na $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Není-li hydrolytické chování zkoušené látky známé, měla by se předběžná zkouška (stupeň 1) provést při teplotě 50°C . Pokud zkouška stupně 1 neprokáže, že je zkoušená látka stálá vůči hydrolyze, měly by se kinetické zkoušky vyšších stupňů provést minimálně při třech různých teplotách (včetně zkoušky při 50°C). Doporučovaný rozsah teplot je $10\text{--}70^\circ\text{C}$ (nejlépe s alespoň jednou teplotou pod 25°C), což bude zahrnovat vykazovanou teplotu 25°C a většinu teplot vyskytujících se v poli.

1.8.4.2. Světlo a kyslík

Všechny hydrolytické zkoušky by měly být provedeny s využitím vhodné metody, která umožní zabránit fotolytickým vlivům. Měla by se přijmout veškerá vhodná opatření proti vlivu kyslíku (např. pěti-minutovým probubláváním roztoku heliem, dusíkem nebo argonem před přípravou roztoku).

1.8.4.3. Trvání zkoušky

Předběžná zkouška by se měla provádět 5 dní, zatímco zkoušky vyššího stupně by se měly provádět až do 90 % hydrolyzy zkoušené látky nebo po dobu 30 dní podle toho, co nastane dříve.

1.8.5. Provedení zkoušky**1.8.5.1. Předběžná zkouška (stupeň 1)**

Předběžná zkouška se provede při teplotě $50 \pm 0,5^\circ\text{C}$ a při hodnotách pH 4,0; 7,0 a 9,0. Pokud se po 5 dnech pozoruje stupeň hydrolyzy nižší než 10 % ($t_{0,525^\circ\text{C}} > 1$ rok), považuje se zkoušená látka za hydrolyticky stálou a obvykle nejsou žádné zkoušky potřeba. Je-li o látce známo, že je za teplot běžných v životním prostředí ⁽²⁾ nestálá, není předběžná zkouška nutná. Analytická metoda musí být dostatečně přesná a citlivá pro zjištění úbytku počáteční koncentrace o 10 %.

⁽¹⁾ Mabey a Mill doporučují použít namísto fosforečnanových pufračních roztoků boritanové a acetátové pufrační roztoky (11).

⁽²⁾ Tato informace může pocházet z jiných zdrojů, jako jsou hydrolytické údaje o strukturně podobných směsích z literatury, nebo z jiných předběžných, semikvantitativních hydrolytických zkoušek se zkoušenou látkou v ranější fázi vývoje.

▼ B1.8.5.2. *Hydrolyzy nestabilních látek (stupeň 2)*

Zkoušky vyššího stupně by se měly provádět při hodnotách pH, při kterých bylo na základě předběžné zkoušky zjištěno, že je zkoušená látka nestálá. Pufrační roztoky zkoušených látek by se měly přechovávat v termostatech při zvolených teplotách. Pro zkoušku reakce prvního řádu by se měl každý reakční roztok analyzovat v časových intervalech, které dávají minimálně šest bodů obvykle mezi 10 % a 90 % hydrolyzy zkoušené látky. Měly by se odebrat jednotlivé paralelní zkušební vzorky (minimálně dva vzorky obsažené v oddělených reakčních nádobách) a jejich obsah by se měl při každém z minimálně šesti odběrů vzorků analyzovat (pro získání minimálně dvanácti paralelních bodů). Použití jednoho souhrnného vzorku, ze kterého se odeberou jednotlivé podíly zkoušeného roztoku v každém intervalu odběru vzorku, se považuje za nevhodné, protože tento způsob neumožňuje analýzu proměnnosti dat a může vést k problémům s kontaminací zkušební roztoku. Na konci zkoušky vyššího stupně (tj. buď při dosažení 90 % hydrolyzy nebo po 30 dnech) by se měly provést zkoušky potvrzení sterility. Pokud však není pozorován žádný rozklad (tj. přeměna), nepovažují se zkoušky sterility za nutné.

1.8.5.3. *Určení produktů hydrolyzy (stupeň 3)*

Všechny důležité produkty hydrolyzy, alespoň ty, které představují více než 10 % aplikované dávky, by se měly identifikovat pomocí příslušných analytických metod.

1.8.5.4. *Nepovinné zkoušky*

U hydrolyticky nestálých zkoušených látek se mohou požadovat další zkoušky při jiných hodnotách pH než 4, 7 a 9. Například pro fyziologické účely lze požadovat zkoušku provedenou za kyselějších podmínek (např. pH 1,2) s využitím jediné fyziologicky významné teploty (37 °C).

2. ÚDAJE

Množství zkoušené látky a případně produktů hydrolyzy by mělo být vyjádřeno jako % počáteční aplikované koncentrace a tam, kde to je vhodné, jako množství vyjádřené v mg/l pro každý interval odběru vzorku a každou hodnotu pH a zkušební teplotu. Kromě toho v případě použití radioizotopově značené zkoušené látky by měla být hmotnostní bilance vyjádřena jako procento aplikované počáteční koncentrace.

Ve zprávě by mělo být uvedeno grafické znázornění logaritmicky převedených údajů o koncentracích zkoušené látky v závislosti na čase. Určeny by měly být všechny důležité produkty hydrolyzy, alespoň ty, které představují 10 % anebo více, a stejným způsobem jako u původní látky by měly být zakresleny také jejich logaritmicky převedené koncentrace, aby byla zřejmá rychlost tvorby a rozkladu těchto produktů hydrolyzy.

▼ B

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Použitím vhodných výpočtů podle kinetických modelů by mělo být možno přesněji stanovit poločasy nebo hodnoty DT_{50} . Pro každé pH a teplotu by měly být vykázány hodnoty poločasu a/nebo DT_{50} (včetně intervalů spolehlivosti), a to společně s popisem použitého modelu, řádem kinetiky a koeficientem určení (r^2). Je-li to vhodné, měly by být výpočty použity také na produkty hydrolyzy.

V případě studia rychlosti provedeného při různých teplotách by měly být rychlostní konstanty hydrolytických reakcí pseudoprvního řádu (k_{pozorov}) popsány jako funkce teploty. Výpočet by měl vycházet jak z rozdělení k_{pozorov} do rychlostních konstant pro hydrolyzu s kyselým katalyzátorem, neutrální hydrolyzu a hydrolyzu se zásaditým katalyzátorem (k_H , k_{neutral} a k_{OH}) tak z Arrheniovy rovnice:

$$k_{\text{pozorov}} = k_H[H^+] + k_{\text{neutral}} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,\text{neutral},OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kde A_i a B_i jsou regresní konstanty z úseku a směrnice nejlépe proložených křivek získaných lineární regresí $\ln k_i$ proti převrácené hodnotě absolutní teploty v kelvinech (T). Pomocí využití Arrheniovy rovnice pro kyselou, neutrální a zásaditou hydrolyzu lze vypočítat rychlostní konstanty reakcí pseudoprvního řádu, a tudíž poločasy pro ostatní teploty, pro které nelze stanovit rychlostní konstantu přímým experimentálním stanovením (10).

2.2. VYHODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Většina hydrolytických reakcí sleduje zřejmě rychlosti reakcí prvního řádu, proto jsou poločasy nezávislé na koncentraci (viz rovnici 4 v příloze 2). To obvykle umožňuje použití laboratorních výsledků stanovených při látkovém množství 10^{-2} až 10^{-3} M na podmínky životního prostředí ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey a Mill (11) publikovali několik příkladů dobré shody mezi rychlostmi hydrolyzy naměřenými v čisté vodě i v přírodních vodách u různých chemikálií za předpokladu, že byly měřeny jak pH, tak teplota.

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat alespoň tyto informace:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturální vzorec (uvádějící místo značení v případě použití radioizotopově značeného materiálu) a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (viz oddíl 1.5),

— čistota (znečištění) zkoušené látky,

— izotopová čistota radioizotopově značené chemikálie a molární aktivita (kde to je možné).

▼ B

— Pufrační roztoky:

- data přípravy a podrobnosti o přípravě,
- použité pufrы a vody,
- molarita a pH pufráčních roztoků.

Zkušební podmínky:

- data provedení studií,
- množství aplikované zkoušené látky,
- metoda a rozpouštědla (druh a množství) použitá pro aplikaci zkoušené látky,
- objem inkubovaných pufráčních roztoků zkoušené látky,
- objem inkubovaných pufráčních roztoků zkoušené látky,
- pH a teplota během studie,
- časy odběrů vzorků,
- metody extrakce,
- metody pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a produktů její hydrolyzy v pufráčních roztocích,
- počet paralelních vzorků.

Výsledky:

- opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,
- výtěžky (procentuální hodnoty pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),
- paralelní údaje a prostředky ve formě tabulky,
- hmotnostní bilance během studií a na jejich konci (v případě použití radioizotopově značené zkoušené látky),
- výsledky předběžné zkoušky,
- rozbor a interpretace výsledků,
- všechny původní údaje a čísla.

Následující informace jsou potřeba, pouze je-li stanovena rychlost hydrolyzy:

- grafy závislosti koncentrací na čase pro zkoušenou látku a popřípadě produkt hydrolyzy při každé hodnotě pH a teplotě,
- tabulky výsledků Arrheniovy rovnice pro teploty 20 °C/25 °C, s hodnotami pH, rychlostní konstantou (h^{-1} nebo den^{-1}), poločasem nebo DT_{50} , teplotami (°C) včetně intervalů spolehlivosti a korelačních koeficientů (r^2) nebo srovnatelných informací,
- navrhovaný způsob hydrolyzy.

▼B

4.

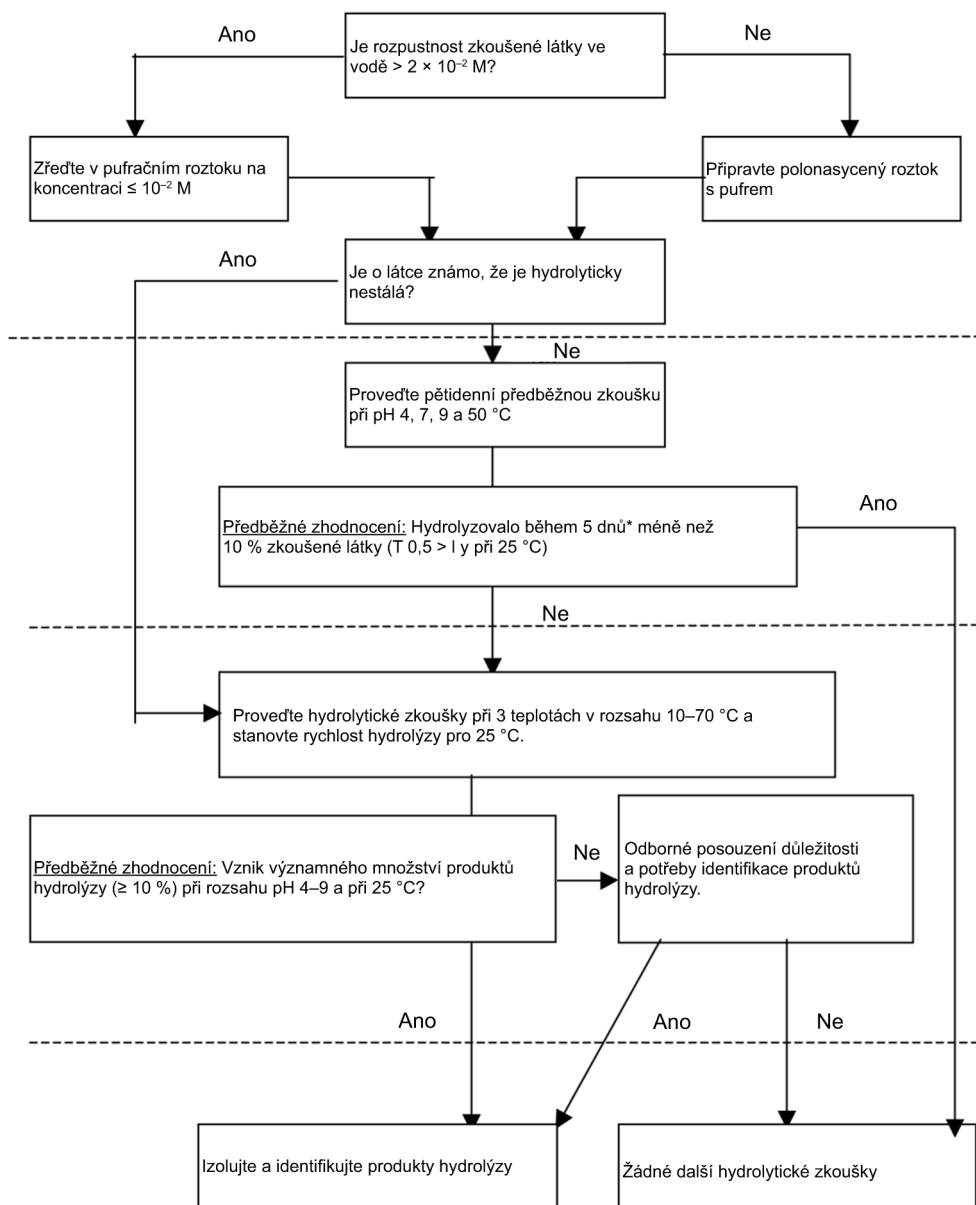
LITERATURA

- 1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.
- 2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.
- 5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).
- 7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.
- 9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).
- 11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-41

▼ **B**

DODATEK 1

Schéma stupňovité hydrolytické zkoušky



* 10% hydrolyza zkoušené látky při teplotě 50 °C odpovídá poločasů přibližně 30 dní, což odpovídá přibližné délce 1 roku při 25 °C.

▼ B*DODATEK 2***Definice a jednotky**

V každém případě by se měly používat **standardní mezinárodní jednotky (SI)**.

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať už původní látka, nebo příslušné produkty přeměny.

Produkty přeměny: veškeré látky vzniklé reakcemi biotické nebo abiotické přeměny zkoušené látky.

Produkty hydrolýzy: veškeré látky vzniklé reakcemi hydrolytické přeměny zkoušené látky.

Hydrolýza je reakce zkoušené látky RX s vodou s prostou výměnou skupiny X za skupinu OH v reakčním centru:



Rychlost, kterou klesá koncentrace látky RX v tomto zjednodušeném procesu, je dána vztahem:

$$\text{rychlost} = k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}] \quad \text{reakce druhého řádu}$$

nebo

$$\text{rychlost} = k [\text{RX}] \quad \text{reakce prvního řádu}$$

v závislosti na kroku určujícím rychlost. Protože je voda přítomna vůči zkoušené látce ve velkém přebytku, označuje se obvykle tento typ reakce jako reakce pseudoprvního řádu, ve které je pozorovaná rychlostní konstanta dána vztahem

$$k_{\text{pozorov.}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

a lze ji určit z výrazu (*)

$$k_{\text{pozorov.}} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

kde:

kde t = čas

a C_0 , C_t = koncentrace látky RX v časech 0 a t.

Jednotky této konstanty mají rozměr (čas)⁻¹ a poločas reakce (čas pro zreagování 50 % látky RX) je dán vztahem

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{pozorov.}}} \quad [4]$$

Poločas ($t_{0,5}$) je čas pro dosažení 50 % hydrolýzy zkoušené látky, kdy lze reakci popsat pomocí kinetiky prvního řádu; je závislý na koncentraci.

(*) Jestliže vynesene logaritmičticky převedených údajů proti času nemá lineární funkci (rovnající se rychlosti reakce prvního řádu), potom není použití rovnice [3] vhodné pro stanovení rychlostní konstanty hydrolýzy zkoušené látky.

▼ B

DT₅₀ (čas úbytku 50): je čas, během kterého dojde k 50 % snížení koncentrace zkoušené látky; liší se od poločasu $t_{0,5}$, kdy reakce nesleduje kinetiku prvního stupně.

Odhad k při odlišné teplotě

Jsou-li rychlostní konstanty známy pro dvě teploty, lze vypočítat rychlostní konstantu při jiných teplotách pomocí Arrheniovy rovnice:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ nebo } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Vynesením $\ln k$ proti $1/T$ do grafu vzniká rovná čára se směrnici $-E/R$

kde:

k = rychlostní konstanta naměřená při různých teplotách

E = aktivační energie [kJ/mol]

T = absolutní teplota [K]

R = plynová konstanta [8,314 J/mol.K]

Aktivační energie byla vypočtena pomocí regresní analýzy nebo následující rovnice:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kde: $T_2 > T_1$.

▼B

DODATEK 3

Pufrační roztoky

A. CLARK A LUBS:

Pufrační směsi CLARKA a LUBSE (*)

Složení	pH
0,2 N HCl A 0,2 N KCl PŘI 20°C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl doplnit do 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl doplnit do 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl doplnit do 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl doplnit do 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl doplnit do 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl doplnit do 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl doplnit do 100 ml	2,2
0,1 M hydrogenftalát draselný + 0,1 N HCl při 20°C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	3,8
0,1 M hydrogenftalát draselný + 0,1 N NaOH při 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	4,8

(*) Hodnoty pH uvedené v těchto tabulkách byly vypočteny na základě potenciálních měření pomocí Sørensenových standardních rovinic (1909). Odpovídající hodnoty pH jsou o 0,04 jednotek vyšší než hodnoty uvedené v tabulkách.

▼B

Složení	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogenftalátu do 100 ml	6,0

Pufrační směsi CLARKA a LUBSE (pokračování)

0,1 M dihydrogenfosforečnan draselný + 0,1 N NaOH při 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosforečnanu do 100 ml	8,0
0,1 M H₃B₃ v 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH při 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny borité do 100 ml	10,0

B. KOLTHOFF A VLEESCHHOUWER:**Citrátové pufrý KOLTHOFFA a VLEESCHHOUWERA**

Složení	pH
0,1 M citrát monodraselný a 0,1 N HCl při 18°C (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,6
0,1 M citrát monodraselný a 0,1 N NaOH při 18 °C (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citrátu doplnit do 100 ml	6,0

(*) Přidejte malý krystálek thymolu nebo podobné látky pro zabránění vzniku plísní.

▼B

C. SÖRENSEN:

SÖRENSENOVY boritanové směsi

Složení		Sörensen 18 °C	Walbum, pH při		
ml boraxu	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M boraxu + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86

0,05 M boraxu + 0,1 N NaOH

10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

SÖRENSENOVY fosfátové směsi

Složení	pH
0,0667M dihydrogenfosforečnanu draselného + 0,0667 M hydrogenfosforečnanu disodného při 20 °C	
99,2 ml KH ₂ PO ₄ + 0,8 ml Na ₂ HPO ₄	5,0
98,4 ml KH ₂ PO ₄ + 1,6 ml Na ₂ HPO ₄	5,2
97,3 ml KH ₂ PO ₄ + 2,7 ml Na ₂ HPO ₄	5,4
95,5 ml KH ₂ PO ₄ + 4,5 ml Na ₂ HPO ₄	5,6
92,8 ml KH ₂ PO ₄ + 7,2 ml Na ₂ HPO ₄	5,8
88,9 ml KH ₂ PO ₄ + 11,1 ml Na ₂ HPO ₄	6,0
83,0 ml KH ₂ PO ₄ + 17,0 ml Na ₂ HPO ₄	6,2
75,4 ml KH ₂ PO ₄ + 24,6 ml Na ₂ HPO ₄	6,4
65,3 ml KH ₂ PO ₄ + 34,7 ml Na ₂ HPO ₄	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B**C.8. TOXICITA PRO ŽÍŽALY****ZKOUŠKA NA UMĚLÉ PŮDĚ****1. METODA****1.1. ÚVOD**

V této laboratorní zkoušce se zkoušená látka přidá do umělé půdy, do které se na 14 dní umístí žížaly. Po této době (a popřípadě po sedmi dnech) se vyšetří letální účinek látky na žížaly. Zkouška je metodou pro relativně krátkodobý orientační screening účinku chemických látek na žížaly při dermálním a dietárním příjmu.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

LC₅₀: Koncentrace látky, u níž lze očekávat, že způsobí během zkoušky uhynutí 50 % testovacích zvířat.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKA

Referenční látka se použije k pravidelnému ověřování toho, že se citlivost zkušebního systému podstatně nezměnila.

Jako referenční látka se doporučuje chloracetamid analytické čistoty.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Půda je proměnlivé prostředí, takže se pro tuto zkoušku používá pečlivě definovaná umělá hlinitá půda. V definované umělé půdě se chovají dospělé žížaly druhu *Eisenia foetida* (viz poznámka v příloze) a exponují se různým koncentracím zkoušené látky. Obsah nádob se po 14 dnech (a popřípadě i po sedmi dnech) po začátku zkoušky rozprostře na podložku a spočítají se žížaly, které při jednotlivých koncentracích přežily.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Zkouška je navržena tak, aby byla z hlediska zkušebního substrátu a organismů co nejreprodukovatelnější. Úhyn v kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %, jinak je zkouška neplatná.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.6.1. *Materials*****1.6.1.1. Zkušební substrát**

Jako základní substrát pro zkoušku se používá definovaná umělá půda.

a) Základní substrát (procenta jsou vztažena k hmotnosti sušiny):

— 10 % sfagnové rašeliny (o pH co nejbliže 5,5 až 6,0, bez viditelných zbytků rostlin a jemně mleté),

▼B

- 20 % kaolinitického jílu, pokud možno s více než 50 % kaolinitu,
- asi 69 % průmyslového křemenného písku (převažuje jemný písek s více než 50 % částic velikosti 0,05 až 0,2 mm). Pokud zkoušená látka není dostatečně dispergovatelná ve vodě, je třeba ponechat k dispozici pro pozdější míšení se zkoušenou látkou 10 g na každou zkušební nádobu,
- asi 1 % práškového chemicky čistého uhličitanu vápenatého (CaCO_3), přidaného pro úpravu pH na $\text{pH } 6,0 \pm 0,5$.

b) Zkušební substrát:

Zkušební substrát obsahuje základní substrát, zkoušenou látku a deionizovanou vodu.

Obsah vody činí asi 25 až 42 % suché hmotnosti základního substrátu. Obsah vody v substrátu se stanoví vysušením vzorku do konstantní hmotnosti při 105 °C. Klíčovým kritériem je, aby byla umělá půda zvlhčena tak, aby neobsahovala stojící vodu. Míšení musí být prováděno pečlivě, aby bylo dosaženo rovnoměrného rozdělení zkoušené látky a substrátu. Způsob vpravení zkoušené látky do substrátu je třeba uvést ve zprávě. The way of introducing the test substance to the substrate has to be reported.

c) Kontrolní substrát:

Kontrolní substrát obsahuje základní substrát a vodu. Přidává-li se přísada, musí další kontrola obsahovat stejné množství přísady

1.6.1.2. Zkušební nádoby

Skleněné nádoby asi na jeden litr (řádně přikryté víky z plastu, miskami nebo fólií z plastu s větracími otvory) naplněné takovým množstvím vlhkého zkušební nebo kontrolního substrátu, které odpovídá 500 g suchého substrátu.

1.6.2. Zkušební podmínky

Nádoby se uchovávají v klimatizovaných komorách při teplotě 20 ± 2 °C se stálým světlem. Intenzita světla by měla být 400 až 800 lx.

Doba trvání zkoušky je 14 dní, avšak úhyn lze popřípadě vyhodnotit po sedmi dnech od začátku zkoušky.

1.6.3. Zkušební postup

Zkoušené koncentrace

Koncentrace zkoušené látky se vyjádří v hmotnosti látky vztažené na jednotku suché hmotnosti základního substrátu (mg/kg).

Orientační zkouška

Rozsah koncentrací, které způsobují úhyn od 0 do 100 %, lze stanovit v orientační zkoušce, která poskytne informace o vhodném rozmezí koncentrací pro hlavní zkoušku.

▼B

Látka se zkouší při těchto koncentracích: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg látky na kg (suché hmotnosti) zkušebního substrátu.

Je-li třeba provést úplnou hlavní zkoušku, stačí pro orientační zkoušku jedna zkušební skupina o 10 žížalách na každou koncentraci a jedna pro neexponovanou kontrolu.

Hlavní zkouška

Výsledky orientační zkoušky se použijí pro volbu nejméně pěti koncentrací tvořících geometrickou řadu, lišících se faktorem nepřekračujícím 1,8 a přesně pokrývajících rozsah 0 až 100 % mortality.

Zkoušky s těmito řadami koncentrací by měly umožnit co nejpřesnější odhad hodnoty LC_{50} a jejího intervalu spolehlivosti.

V hlavní zkoušce se použijí nejméně čtyři zkušební skupiny na každou koncentraci a čtyři neexponované kontrolní skupiny, každá o 10 žížalách. Jako výsledek pro tyto replikované skupiny se uvede průměr a standardní směrodatná odchylka.

Vyvolají-li dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 1,8 úhyn 0 a 100 %, jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci oblasti, ve které se nachází hodnota LC_{50} .

Mísení základního zkušebního substrátu a zkoušené látky

Zkušební substrát musí být pokud možno připraven bez jakýchkoli jiných přísad, než je voda. Těsně před začátkem zkoušky se emulze nebo disperze zkoušené látky v deionizované vodě nebo v jiném rozpouštědle smísí se základním zkušebním substrátem nebo se na něj rovnoměrně rozstříká jemným rozprašovačem pro chromatografii nebo podobným rozprašovačem.

Je-li zkoušená látka nerozpustná ve vodě, může být rozpuštěna v co nejmenším objemu vhodného organického rozpouštědla (např. hexanu, acetonu nebo chloroformu).

K rozpuštění, dispergaci nebo emulgaci zkoušené látky mohou být použita pouze činidla, která snadno vytěkají. Zkušební substrát musí být před použitím odvětrán. Množství odpařené vody musí být nahrazeno. Kontroly musí obsahovat stejné množství všech přísad.

Není-li zkoušená látka rozpustná, dispergovatelná ani emulgovatelná v organických rozpouštědlech, připraví se směs 10 g křemenného písku a takového množství zkoušené látky, které je potřebné pro zapracování do 500 g zkušebního substrátu (suchá hmotnost), a ta se smísí s 490 g základního substrátu (suchá hmotnost).

Pro každou zkušební skupinu se do skleněné nádoby vpraví množství vlhkého zkušebního substrátu, která odpovídá 500 g suchého substrátu, a na povrch substrátu se umístí 10 žížal, které byly před použitím 24 hodin aklimatizovány v podobném vlhkém základním substrátu, poté rychle omyty a zbaveny přebytečné vody osušením na filtračním papíru.

▼ B

Nádoby se přikryjí víky z plastu s otvory, miskami nebo fólií, aby se zabránilo vysychání substrátu, a udržují se ve zkušebních podmínkách 14 dní.

Vyhodnocení se provede 14 dní (popřípadě i sedm dní) po zahájení zkoušky. Substrát se rozprostře na podnos ze skla nebo korozivzdorné oceli. Žížaly se vyšetří a stanoví se počet přežívajících jedinců. Žížaly se považují za mrtvé, jestliže nereagují na jemné mechanické podráždění na předním konci.

Provádí-li se vyšetření po sedmi dnech, nádoba se opět naplní substrátem a přežívající žížaly se opět vloží na povrch téhož zkušebního substrátu.

1.6.4. Zkušební organismy

Ve zkoušce se použijí dospělé žížaly druhu *Eisenia foetida* (viz poznámku v doplňku) (alespoň dva měsíce staré s klitellem) o hmotnosti (ve vlhkém stavu) 300 až 600 mg. (Metody množení viz doplněk.)

2. ÚDAJE

2.1. ZPRACOVÁNÍ A VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

Uvedou se koncentrace zkoušené látky a odpovídající podíl mrtvých žížal v procentech.

Jsou-li údaje dostačující, stanoví se standardními metodami (Litchfield a Wilcoxon, 1949, nebo rovnocenná metoda) hodnota LC_{50} a interval spolehlivosti ($p = 0,05$). LC_{50} se udává v mg zkoušené látky na kg (suché hmotnosti) zkušebního substrátu.

V případech, kdy je sklon koncentrační křivky pro výpočet LC_{50} , příliš strmý, stačí grafický odhad této hodnoty.

Vyvolají-li dvě po sobě jdoucí koncentrace lišící se faktorem 1,8 úhyn 0 a 100 %, jsou tyto dvě hodnoty dostatečné pro identifikaci oblasti, ve které se nachází hodnota LC_{50} .

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- prohlášení, že zkouška byla provedena v souladu s výše uvedenými kritérii jakosti,
- provedené zkoušky (orientační zkouška a/nebo hlavní zkouška),
- přesný popis zkušebních podmínek nebo prohlášení, že zkouška byla provedena podle této metody; musí být uvedeny všechny odchylky,
- přesný popis způsobu smísení zkoušené látky se základním substrátem,
- informace o zkušebních organismech (druhy, stáří, průměrná hmotnost a rozpětí hmotností, podmínky množení, původ),

▼B

- metoda použitá pro stanovení LC₅₀,
- výsledky zkoušky včetně všech použitých údajů,
- popis pozorovaných symptomů nebo změn v chování zkušebních organismů,
- úhyn v kontrolách,
- hodnota LC₅₀ nebo nejvyšší zkoušená koncentrace nevyvolávající úhyn a nejnižší zkoušená koncentrace vyvolávající 100 % úhyn 14 dní (popřípadě i sedm dní) od začátku zkoušky,
- graf závislosti koncentrace/odezva,
- výsledky získané s referenční látkou, ať v souvislosti s touto zkouškou, nebo z dřívějších zkoušek kontroly jakosti.

4. LITERATURA

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, rozhodnutí Rady C(81) 30 v konečném znění.
- 2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, str. 331.
- 3) Bouche. M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, str. 671.
- 4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. I. Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, str. 99.
- 5) Komise Evropských společenství, 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 künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼ B*Doplněk***Množení a chov žízal před zkouškou**

Pro účely množení se 30 až 50 dospělých žízal umístí do chovné schránky s čerstvým substrátem a vyjmou se po 14 dnech. Tyto jedince je možné použít pro další chovné vsázky. Žízaly vylíhlé ze zátoček se použijí ke zkoušení poté, co dospějí (v uvedených podmínkách po dvou až třech měsících).

Podmínky chovu a množení

Klimatizovaná komora: teplota 20 ± 2 °C, nejlépe s nepřetržitým osvětlením (intenzita 400–800 lx).

Chovné nádoby: vhodné mělké nádoby o objemu 10 až 20 l.

Substrát: druh *Eisenia foetida* je možné chovat v různých zvířecích exkrementech. Jako chovné médium se doporučuje používat směs 50 % (obj.) rašeliny a 50 % (obj.) hovězího nebo koňského hnoje. Médium musí mít pH asi 6 až 7 (upraví se uhličitánem vápenatým) a nízkou iontovou vodivost (méně než 6 mmhos nebo s 0,5 % koncentrací solí).

Substrát musí být vlhký, ale ne příliš mokrá.

Kromě výše uvedené metody je možné používat i jiné úspěšné postupy.

Poznámka: Druh *Eisenia foetida* existuje ve dvou formách, které někteří taxonomové rozlišili na druhy (Bouche, 1972). Jsou si morfologicky podobné, avšak jeden, *Eisenia foetida foetida*, má na člancích typické příčné pruhování nebo páskování a druhý, *Eisenia foetida andrei*, toto pruhování postrádá a je různě červeně zbarven. Pokud je to možné, použijte se *Eisenia foetida andrei*. Jiné druhy je možné použít, pokud je k dispozici potřebná metodika.

▼ B**C.9. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST****ZAHN-WELLENISOVA ZKOUŠKA****1. METODA****1.1. ÚVOD**

Účelem metody je posoudit statickou zkouškou možnost úplné biologické rozložitelnosti netěkavých organických látek rozpustných ve vodě, jsouli vystaveny účinku poměrně vysokých koncentrací mikroorganismů.

Může docházet k fyzikálně-chemické adsorpci na suspendovaných pevných částicích; tato skutečnost musí být zohledněna při interpretaci výsledků (viz bod 3.2).

Zkoušené látky jsou používány v koncentracích odpovídajících hodnotám DOC od 50 do 400 mg/l nebo hodnotám CHSK od 100 do 1 000 mg/l (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku). Tyto poměrně vysoké koncentrace umožňují spolehlivou analýzu. Sloučeniny s toxickými vlastnostmi mohou však proces rozkladu zpomalit nebo zastavit.

V této metodě se úplná biologická rozložitelnost zkoušené látky posuzuje podle míry rozpuštěného organického uhlíku nebo chemické spotřeby kyslíku.

Současným použitím specifické analytické metody může být stanovena také primární biologická rozložitelnost látek (úbytek výchozí chemické látky).

Touto metodou mohou být zkoušeny pouze organické látky, které mají při koncentracích použitých ve zkoušce tyto vlastnosti:

- jsou za zkušebních podmínek rozpustné ve vodě,
- mají za zkušebních podmínek zanedbatelný tlak par,
- neinhibují bakterie,
- jsou ve zkušebním systému pouze omezeně adsorbovány,
- pěněním nedochází ve zkoušeném roztoku ke ztrátám.

Při interpretaci získaných výsledků budou užitečné informace o relativním podílu hlavních složek zkušebního materiálu, zejména pokud jsou stanovené hodnoty biologické rozložitelnosti nízké nebo marginální.

Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou důležité rovněž pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky.

▼ B

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Po ukončení zkoušky se míra rozkladu označí za „biologickou rozložitelnost stanovenou ZahnWellensovou zkouškou“:

$$D_t = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})} \right] \times 100$$

kde:

D_t = rozklad (%) v čase t ,

C_A = hodnoty DOC (nebo CHSK) zkušební směsi měřené tři hodiny po zahájení zkoušky (mg/l) (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku),

C_T = hodnoty DOC nebo CHSK zkušební směsi v době odběru vzorku (mg/l),

C_B = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu v době odběru vzorku (mg/l),

C_{BA} = hodnoty DOC nebo CHSK slepého pokusu tři hodiny po zahájení zkoušky (mg/l).

Stupeň rozložitelnosti se zaokrouhlí na celá procenta.

Jako procentuální rozložitelnost se uvede procentuální snížení hodnot DOC (nebo CHSK) zkoušené látky.

Rozdíl mezi hodnotou naměřenou po třech hodinách a vypočítanou nebo přednostně naměřenou počáteční hodnotou poskytuje užitečnou informaci o rozložitelnosti zkoušené látky (viz bod 3.2 Interpretace výsledků).

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech mohou být při posuzování nových látek využity referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Aktivovaný kal, minerální živné médium a zkoušená látka jako zdroj uhlíku ve vodném roztoku se smíchají ve skleněné nádobě na jeden až čtyři litry s míchadlem a provzdušňovacím zařízením. Suspense se míchá a provzdušňuje až 28 dní při teplotě 20–25 °C při rozptýleném světle nebo v temnu. Rozklad se sleduje denně nebo v jiných vhodně stanovených pravidelných časových intervalech prostřednictvím měření hodnot DOC (nebo CHSK) v odebraném vzorku po jeho filtraci. Procentuální hodnota biologického rozkladu v čase se vyjádří jako poměr hodnot DOC (nebo CHSK) v době odběru vzorku a hodnoty po třech hodinách od zahájení zkoušky a slouží jako míra rozkladu v daném čase. Výsledky se vynesou do grafu proti času a vytvoří křivku biologického rozkladu.

Při použití specifické analytické metody se měří změny koncentrací původní molekuly látky způsobené biologickým rozkladem (míra primární biologické rozložitelnosti).

▼B

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Reprodukovatelnost této zkoušky byla ověřena mezilaboratorními okružními testy.

Citlivost metody je značně závislá na variabilitě slepého vzorku, v menší míře na přesnosti stanovení množství rozpuštěného organického uhlíku a na koncentraci zkoušené látky v suspenzi.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

1.6.1. *Příprava*

1.6.1.1. Reakční činidla

Zkušební voda: pitná voda s obsahem organického uhlíku menším než 5 mg/l. Koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů nesmí překročit 2,7 mmol/l; v opačném případě je nutné jako rozpouštědlo použít deionizovanou nebo destilovanou vodu.

Kyselina sírová p.a	50 g/l
Hydroxid sodný p.a	40 g/l
Minerální živné médium: v jednom litru deionizované vody se rozpustí:	
Chlorid amonný NH ₄ Cl p.a.	38,5 g
Dihydrogenfosforečnan sodný, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O p.a.	33,4 g
Dihydrogenfosforečnan draselný, KH ₂ PO ₄ p.a.	8,5 g
Hydrogenfosforečnan draselný, KH ₂ PO ₄ p.a.	21,75 g

Tento roztok slouží jako živný roztok a jako pufr pH.

1.6.1.2. Přístroje a pomůcky

Skleněné nádoby na jeden až čtyři litry (např. válcové nádoby).

Míchačka se skleněným nebo kovovým míchadlem na vhodné stopce (míchadlo by mělo být umístěno 5–10 cm nad dnem nádoby). Namísto toho lze použít magnetické míchadlo dlouhé 7–10 cm.

Skleněná provzdušňovací trubice o vnitřním průměru 2–4 mm. Vyústění trubice by mělo být umístěno asi 1 cm nad dnem nádoby.

Odstředivka (cca 3 550g).

pH-metr.

Oxymetr.

Papírové filtry.

▼B

Zařízení pro membránovou filtraci.

Membránové filtry o velikosti pórů 0,45 µm. Vhodné membránové filtry nesmí během filtrace uvolňovat ani absorbovat uhlík.

Analyzátor ke stanovení obsahu organického uhlíku a vybavení ke stanovení CHSK.

1.6.1.3. Příprava inokula

Aktivovaný kal z biologické čistírny se promyje zkušební vodou (viz výše), a to buď (opakovanou) centrifugací, nebo sedimentací.

Aktivovaný kal musí mít vhodné složení. Takový kal se vyskytuje v řádně fungujících čistírnách odpadních vod. Má-li být získáno co nejvíce různých druhů nebo kmenů bakterií, může být vhodné namíchat inokulum z různých zdrojů (např. z různých čistíren, z půdního extraktu, z říčních vod atd.). Směs se zpracuje výše uvedeným způsobem.

Kontrola aktivity aktivovaného kalu je popsána níže v bodu 1.6.2 v odstavci Funkční kontrola aktivovaného kalu.

1.6.1.4. Příprava zkušebních roztoků

Do zkušební nádoby se odměří 500 ml zkušební vody, 2,5 ml minerálního živného roztoku na litr a přidá se aktivovaný kal v množství odpovídajícím 0,2 až 1,0 g sušiny v litru konečné směsi. Přidá se takový objem základního roztoku zkoušené látky, aby byla dosažena koncentrace rozpuštěného organického uhlíku 50 až 400 mg na litr suspence. Odpovídající hodnoty CHSK jsou 100 až 1 000 mg/l. Směs se doplní vodou do celkového objemu jeden až čtyři litry. Celkový zvolený objem je závislý na počtu odebíraných vzorků nutných ke stanovení hodnot DOC nebo CHSK a na tom, jaký objem budou mít odběry požadované pro analytický postup.

Zpravidla se za dostatečný objem považují dva litry. Současně se s každou zkušební sérií nasadí alespoň jeden kontrolní slepý vzorek; obsahuje pouze aktivovaný kal a minerální živné médium doplněné vodou na stejný objem jako zkoušená směs.

1.6.2. Postup zkoušky

Zkušební nádoby se promíchávají magnetickými míchadly nebo šroubovitými míchadly při rozptýleném světle nebo v temnu při teplotě 20–25 °C. Nádoba se provzdušňuje tlakovým vzduchem, který je podle potřeby čištěn vatovým filtrem a přes promývačku. Musí být zajištěno, aby nedošlo k usazení kalu a aby koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 2 mg/l.

V pravidelných intervalech (např. denně) se měří pH a podle potřeby se upraví na pH 7–8.

▼ B

Ztráty vypařováním se před každým odběrem vzorku vyrovnají potřebným množstvím destilované nebo deionizované vody. Je účelné vyznačit na nádobě hladinu kapaliny před začátkem zkoušky. Nové vyznačení se provede vždy po odebrání vzorku (při vypnutém provzdušňování a míchání). První vzorky se odebírají vždy tři hodiny po zahájení zkoušky s cílem zjistit míru adsorpce zkoušeného materiálu na aktivovaném kalu.

Rozklad zkoušené látky se sleduje stanovením hodnoty DOC a CHSK prováděným denně nebo v jiných pravidelných intervalech. Vzorky ze zkušební nádoby a ze slepého pokusu se zfiltrují přes pečlivě promytý papírový filtr. Prvních 5 ml filtrátu se odstraní. Kaly, které se špatně filtrují, mohou být odděleny desetiminutovým odstředováním. Provádí se nejméně dvě souběžná stanovení DOC a CHSK. Směs se nechá inkubovat až 28 dní.

Poznámka: Vzorky, které zůstávají zakalené, se zfiltrují přes membránový filtr. Membránový filtr nesmí uvolňovat ani adsorbovat žádné organické látky.

Funkční kontrola aktivovaného kalu

Souběžně s každou sérií pokusů se nasadí nádoba se známou látkou, která slouží ke kontrole funkční kapacity aktivovaného kalu. Jako vhodná látka pro tento účel se ukázal diethylenglykol.

Adaptace

Jsou-li v poměrně krátkých časových intervalech (např. denně) prováděny analýzy, lze na křivce rozložitelnosti rozlišit adaptační fázi (viz obrázek 2). Proto by zkouška neměla být nasazována na konci pracovního týdne.

Jestliže k adaptaci dochází na konci normální délky zkoušky, může být zkouška prodloužena až do konečného rozložení zkoušené látky.

Poznámka: Je-li třeba důkladně poznat chování aktivovaného kalu, exponuje se tentýž aktivovaný kal ještě jednou zkoušené látce takto:

Míchadlo a provzdušňovací zařízení se vypnou, aby se mohl aktivovaný kal usadit. Supernatant se odlije, dekantovaný kal v nádobě se doplní vodou na objem dvou litrů, 15 minut se míchá a opět se nechá sedimentovat. Po dekantaci supernatantu se zkouška opakuje se sedimentovaným kalem a stejnou zkoušenou látkou postupem podle výše uvedených bodů 1.6.1.4 a 1.6.2. Aktivovaný kal může být namísto usazováním oddělen centrifugací.

Adaptovaný kal může být smíchán s čerstvým aktivovaným kalem tak, aby bylo dosaženo koncentrace 0,2–1 g sušiny na litr suspence.

▼B**Příprava pro analýzu**

Vzorky se obvykle zfiltrují přes pečlivě promytý papírový filtr (k promývání se použije deionizovaná voda).

Vzorky, které zůstanou zakalené, se zfiltrují přes membránové filtry (0,45 µm).

Ve filtrátech vzorku (prvních 5 ml filtrátu se odstraní) se přístrojem pro měření TOC provedou dvě stanovení koncentrace rozpuštěného uhlíku (DOC). Nemůže-li být filtrát analyzován v den odběru vzorku, musí být do příštího dne uchován v ledničce. Delší skladování se nedoporučuje.

CHSK se ve filtrátu vzorku stanoví analytickým postupem pro stanovení CHSK popsaným níže v literatuře (2).

2. ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Koncentrace DOC a/nebo CHSK se stanoví alespoň ve dvou duplikátních vzorcích postupem uvedeným výše v bodu 1.6.2. Rozklad v čase t se vypočte podle vzorce (s definicemi) uvedeného výše v bodu 1.2.

Hodnota stupně rozkladu se zaokrouhlí na celá procenta. Dosažená rozložitelnost na konci zkoušky se označí za „biologickou rozložitelnost stanovenou Zahn-Wellensovou zkouškou“.

Poznámka: Je-li dosaženo úplného rozkladu zkoušené látky před řádným termínem ukončení zkoušky a výsledek je potvrzen druhý den další analýzou, může být zkouška ukončena.

3. ZPRÁVY**3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- počáteční koncentrace látky,
- všechny informace a experimentální výsledky týkající se zkoušené látky, popřípadě referenční látky a kontrolního vzorku,
- koncentrace látky po třech hodinách,
- křivka biologického rozkladu s popisem,
- datum a místo odběru zkušebních organismů, stav adaptace, použitá koncentrace atd.,
- vědecké odůvodnění všech změn ve zkušebnímu postupu.

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Postupné ubývání DOC nebo snižování CHSK, ke kterému dochází během dnů až týdnů, naznačuje, že zkoušená látka je biologicky rozkládána.

▼ B

V mnoha případech však může ovlivňovat výsledky zkoušky fyzikálně-chemická adsorpce; to lze prokázat tím, že se zjistí úplné nebo částečné ubývání DOC nebo snižování CHSK během prvních tří hodin zkoušky a že rozdíl mezi supernatantem ze slepého vzorku a ze zkoušeného vzorku je nečekaně malý.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky.

To lze provést několika způsoby, nejsprávnější je však použít supernatant nebo kal jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respiometrii).

Zkoušené látky, které vykazují velký úbytek DOC nebo pokles CHSK, který není ovlivněn adsorpcí, lze pokládat za biologicky rozložitelné. Částečný, neadsorpční úbytek znamená, že látka je alespoň částečně biologicky rozložitelná. Nízký nebo nulový úbytek DOC nebo pokles CHSK může být způsoben inhibicí mikroorganismů zkoušenou látkou, která se může projevovat rozpuštěním nebo úbytkem kalu nebo zákalem supernatantu. V takových případech se zkouška opakuje s nižšími koncentracemi zkoušené látky.

Vyšší citlivosti může být dosaženo specifickými analytickými metodami nebo použitím zkoušených látek značených ^{14}C . Při použití zkoušené látky značené ^{14}C bude probíhající rozklad zkoušené látky potvrzen vývinem $^{14}\text{CO}_2$.

Pokud se výsledek udává jako primární biologická rozložitelnost, měly by být podle možnosti uvedeny změny v chemické struktuře, které způsobily, že se snížil signál výchozí zkoušené látky.

Musi být popsána vhodnost analytické metody a výsledky stanovení ve slepém živném médiu.

4. LITERATURA

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 B, rozhodnutí Rady C (81) 30 v konečném znění.
- 2) Příloha V směrnice Komise 84/449/EHS (Úř. věst. L 251, 19.9.1984, s. 1), metoda C.9 Rozložitelnost: Chemická spotřeba kyslíku.



Doplňk

PŘÍKLAD VYHODNOCENÍ

Organická látka	4-ethoxybenzoová kyselina
Teoretická koncentrace ve zkoušce	600 mg/l
Teoretický DOC:	390 mg/l
Inokulum	čistírna odpadních vod v ...
Koncentrace:	1 g sušiny na litr
Adaptace:	bez adaptace
Analýza:	stanovení DOC
Množství vzorku:	3 ml
Referenční látka:	diethylenglykoll
Toxicita zkoušené látky:	žádné toxické účinky při koncentraci menší než 1 000 mg/l
	Použitá zkouška: zkouška ve fermentačních trubicích

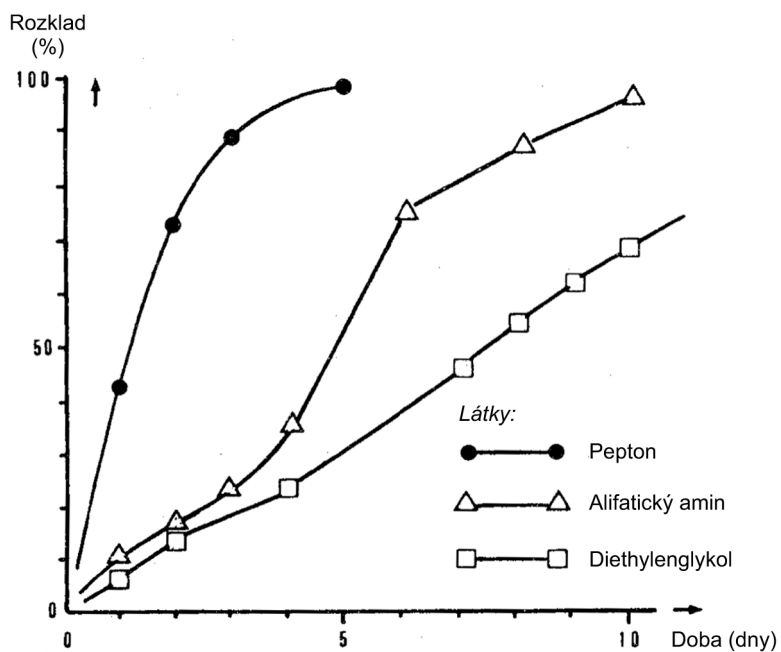
Čas v průběhu zkoušky	Referenční látka				Zkoušená látka		
	Slepý vzorek DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	DOC (netto) mg/l	Rozklad %	DOC (1) mg/l	DOC (netto) mg/l	Rozklad %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 hodiny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 den	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dny	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dnů	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dnů	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dnů	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dnů	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dnů	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dnů	18,0	37,0	19,0	94	20,2	2,0	99

(1) Střední hodnota ze tří stanovení.

▼B

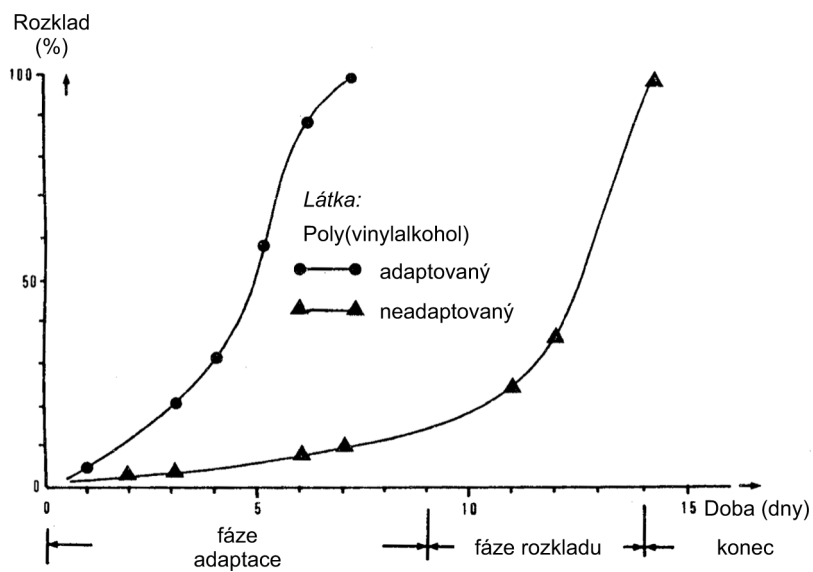
Obrázek 1

Příklad křivek biologického rozkladu



Obrázek 2

Příklady adaptace kalu



▼ B**C.10. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST**

SIMULAČNÍ ZKOUŠKA s AKTIVOVANÝM KALEM

1. METODA**1.1. ÚVOD****1.1.1. Obecné poznámky**

Metoda je vhodná pouze pro ty organické látky, které v koncentracích používaných ve zkoušce:

— jsou natolik rozpustné ve vodě, aby bylo možné připravit zkušební roztoky,

— mají za zkušebních podmínek zanedbatelnou tenzi par,

— neinhibují bakterie.

Při interpretaci získaných výsledků budou užitečné informace o relativním podílu hlavních složek zkušebního materiálu, zejména pokud jsou stanovené hodnoty biologické rozložitelnosti nízké nebo marginální.

Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou důležité rovněž pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky.

1.1.2. Stanovení úplné biologické rozložitelnosti (analýza DOC/CHSK)

Účelem metody je stanovení úplné biologické rozložitelnosti na základě měření úbytku zkoušené látky a vzniklých metabolitů v modelovém zařízení s aktivovaným kalem při koncentraci odpovídající DOC více než 12 mg/l (nebo CHSK přibližně 40 mg/l); optimální je koncentrace DOC 20 mg/l. (DOC = rozpuštěný organický uhlík, CHSK = chemická spotřeba kyslíku.)

Je nutné znát obsah organického uhlíku (nebo chemickou spotřebu kyslíku) zkoušené látky.

1.1.3. Stanovení primární biologické rozložitelnosti (specifická analýza)

Účelem metody je stanovení primární biologické rozložitelnosti látky specifickou metodou v modelovém zařízení s aktivovaným kalem při koncentraci přibližně 20 mg/l (pokud to umožňuje analytická metoda nebo toxicita zkoušené látky, může být použita nižší nebo vyšší koncentrace zkoušené látky). To umožní odhadnout primární biologickou rozložitelnost látky (vymizení původní výchozí chemické struktury).

Účelem metody není stanovení stupně mineralizace zkoušené látky.

Ke kvantitativní analýze musí být k dispozici vhodná metoda.

▼ B

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

1.2.1. *Analýza DOC/CHSK*

Úbytek látky je vyjádřen vztahem:

$$TD = \frac{T - (E - E_0)}{T} \times 100 \% \quad [1(a)]$$

kde:

DR = úbytek DOC nebo snížení CHSK v %, vztaženo na zkoušenou látku při dané střední době zdržení,

T = koncentrace zkoušené látky na přítoku do zkušební jednotky v mg DOC na litr (nebo v mg CHSK na litr),

E = koncentrace DOC nebo CHSK na odtoku ze zkušební jednotky v mg DOC na litr (nebo v mg CHSK na litr),

E₀ = koncentrace DOC nebo CHSK na odtoku z jednotky slepého pokusu v mg DOC na litr (nebo v mg CHSK na litr).

Rozklad je definován jako procentuální úbytek DOC nebo snížení CHSK při dané době zdržení, vztažený na zkoušenou látku.

1.2.2. *Specifická analýza*

Procentuální úbytek zkoušené látky ve vodné fázi (R_v) během dané doby zdržení je vyjádřen vztahem:

$$R_w = \frac{C_1 - C_0}{C_1} \times 100 \% \quad [1(b)]$$

kde:

C₁ = koncentrace látky v přítoku do zkušebního zařízení (v mg/l, stanovená specifickou analýzou)

C₀ = koncentrace látky na odtoku ze zkušebního zařízení (v mg/l, stanovená specifickou analýzou),

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech může být při posuzování nových látek užitečné použít referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

1.4. PRINCIP ZKUŠEBNÍCH METOD

Ke stanovení úplné biologické rozložitelnosti se používají dvě paralelně pracující modelová zařízení s aktivovaným kalem (potvrzující zkouška OECD nebo zařízení s porézní nádobou). Zkoušená látka se přidává na přítoku do jedné z jednotek (se syntetickou odpadní vodou nebo s odpadní vodou z domácností), zatímco ve druhé je obsažena pouze odpadní voda. Ke stanovení primární biologické rozložitelnosti pomocí specifické analýzy zkoušené látky na přítoku a odtoku se používá pouze jedna jednotka.

▼B

Na odtoku se měří koncentrace DOC nebo CHSK nebo se stanoví koncentrace zkoušené látky specifickou analýzou.

Obsah DOC z materiálu obsaženého ve zkoušce se nestanovuje, pouze se uvede.

Při měření DOC (nebo CHSK) se vychází z toho, že rozdíl mezi průměrnými koncentracemi na odtoku ze zkušební a z kontrolní jednotky je způsoben nerozloženým podílem zkoušené látky.

Jestliže jsou prováděny specifické analýzy, lze stanovovat změny koncentrace původní chemické látky (primární biologická rozložitelnost).

Obě zařízení mohou být provozována jako „spřažená“ pomocí postupu vzájemné inokulace.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Výchozí koncentrace zkoušené látky se volí s ohledem na druh analytické metody a její mez stanovitelnosti.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. Příprava

1.6.1.1. Přístroje a pomůcky

Pokud se neprovádí specifická analýza, používají se dvě modelové zkušební jednotky stejného typu. Mohou být používány dva typy zařízení:

Potvrzující zkouška OECD

Zařízení (doplněk 1) se skládá ze zásobní nádoby (A) na syntetickou odpadní vodu, dávkovacího čerpadla (B), provzdušňovací nádoby (C), sedimentační nádoby (D), mamutky (E) k recirkulaci aktivovaného kalu a sběrné nádoby na vyčištěnou vodu (F).

Nádoby (A a F) musí být ze skla nebo z vhodného plastu a musí mít objem nejméně 24 litrů. Čerpadlo (B) musí zajišťovat konstantní přítok syntetické odpadní vody do provzdušňovací nádoby; může být použit jakýkoliv vhodný systém zjišťující stanovený přítok a koncentraci. Za normálních podmínek je výška separátoru (D) nastavena tak, aby objem kultivační suspence v provzdušňovací nádobě byl tři litry. V dolní části kónické části provzdušňovací nádoby (C) je ponořena porézní provzdušňovací krychlička (G). Množství dodávaného vzduchu může být kontrolováno průtokoměrem.

Mamutka (E) je osazena tak, aby byl aktivovaný kal ze separátoru do provzdušňovací nádoby dopravován nepřetržitě a stejnoměrně.

Zařízení s porézní nádobou

Porézní nádoba je vyrobena z porézní polyethylenové fólie (tloušťka 2 mm, maximální velikost pórů 95 µm) stočené do válce o průměru 14 cm s kónickým dnem 45° (obrázky 1 a 2 v doplňku 2). Porézní nádoba je umístěna v nepropustné nádobě o průměru 15 cm zhotovené z vhodného plastu, která má nad kónickou částí odtok ve výšce 17,2 cm, čímž je vymezen objem nádoba (3 litry). Na horním konci vnitřní nádoby je upevněn kruhový držák z vhodného plastu tak, že mezi vnější a vnitřní nádobou je 0,5 cm odtoková mezera.

▼ B

Porézní nádoba může být umístěna do vodní lázně regulované termostatem. Na dno vnitřní nádoby je vhodným rozvaděčem přiváděn vzduch.

Nádoby (A a E) musí být ze skla nebo z vhodného plastu a musí mít objem nejméně 24 litrů. Čerpadlo (B) musí zajišťovat konstantní přítok syntetické odpadní vody do provzdušňovací nádoby; může být použit jakýkoliv vhodný systém zjišťující stanovený přítok a koncentraci.

K dispozici musí být náhradní porézní nádoby jako náhrada za zanesené nádoby; zanesené nádoby se čistí ponořením do roztoku chlomanu na 24 hodin a promytím tekoucí vodou.

1.6.1.2. Filtrace

Používají se zařízení pro membránovou filtraci a membránové filtry o velikost pórů 0,45 µm. Vhodný membránový filtr nesmí uvolňovat uhlík a při filtraci nesmí adsorbovat zkoušenou látku.

1.6.1.3. Odpadní voda

Může být použito buď vhodné syntetické živné médium nebo odpadní voda z domácností.

Příklad syntetického živného média

V 1 litru vodovodní vody se rozpustí:

pepton:	160 mg
masový extrakt:	10 mg
močovina:	30 mg
NaCl:	7 mg,
CaCl ₂ · 2H ₂ O:	4 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O:	2 mg
K ₂ HPO ₄ :	28 mg

Odpadní vody z domácností

Odebírají se čerstvé každý den z přepadu mechanického stupně čistírny, která čistí převážně odpadní vody z domácností.

1.6.1.4. Zásobní roztok zkoušené látky

Připraví se např. 1 % roztok zkoušené látky, který se bude přidávat do zkušební jednotky. Stanoví se koncentrace zkoušené látky, aby mohl být určen příslušný objem zásobního roztoku, který se přidá k odpadní vodě nebo přímo dalším čerpadlem do zkušební jednotky, aby byla dosažena požadovaná zkušební koncentrace.

1.6.1.5. Inokulum

Poznámka: Je-li používána odpadní voda z domácností, není důvod používat inokulum s malou koncentrací bakterií, ale může se použít aktivovaný kal.

Mohou být použita inokula z různých zdrojů.

Tři příklady vhodného inokula:

a) Inokulum z odtoku biologické čistírny odpadních vod

▼ B

Inokulum se získá z odtoku dobře fungující čistírny zpracovávající převážně odpadní vody z domácností. Vzorek odtoku musí být v době mezi odběrem a použitím uchován v aerobních podmínkách. Inokulum se připraví filtrací vzorku vody přes hrubý filtr, přičemž prvních 200 ml filtrátu se odstraní. Až do okamžiku použití se filtrát uchovává v aerobních podmínkách. Inokulum musí být použito v týž den, kdy bylo odebráno. K inokulaci se použijí nejméně 3 ml.

b) Směsné inokulum

Inokulum z odtoku biologické čistírny odpadních vod:

Viz předchozí popis

Inokulum z půdy:

100 g zahradní zeminy (úrodná, nesterilní zemina) se suspenduje v 1 000 ml nechlorované pitné vody. (Zeminy s extrémně vysokým obsahem jílu, písku nebo humusu nejsou vhodné.) Po zamíchání se nechá suspence 30 minut usazovat. Supernatant se zfiltruje přes hrubý filtrační papír, přičemž prvních 200 ml filtrátu se odstraní. Filtrát se ihned provzdušňuje až do okamžiku použití. Inokulum musí být použito v týž den, kdy bylo odebráno.

Inokulum z povrchové vody:

Další díl směsného inokula se získá z mesosaprobních povrchových vod. Odebraný vzorek se zfiltruje přes hrubý filtrační papír, přičemž prvních 200 ml filtrátu se odstraní. Až do okamžiku použití se filtrát uchovává v aerobních podmínkách. Inokulum musí být použito v týž den, kdy bylo odebráno.

Stejně objemové díly tří dílčích inokul se smísí, dobře promíchají a z této směsi se odebere konečné inokulum. K inokulaci se použijí nejméně 3 ml.

c) Inokulum z aktivovaného kalu

Jako inokulum se použije aktivovaný kal (ne více než 3 litry) (s obsahem suspendovaných pevných částic do 2,5 g/l) odebraný z provzdušňovací nádrže čistírny zpracovávající převážně odpadní vody z domácností.

1.6.2. *Postup*

Zkouška se provádí při laboratorní teplotě udržované mezi 18 a 25 °C.

Zkouška může být podle potřeby prováděna při nižších teplotách (do 10 °C); pokud se zkoušená látka za těchto podmínek rozkládá, nejsou zapotřebí žádná další měření. Jestliže se však látka při nižší teplotě nerozkládá, musí být zkouška opakována při teplotě 18 až 25 °C.

1.6.2.1. Fáze zapracování: tvorba kalu/stabilizace zařízení

Fází růstu/stabilizace kalu je období, během kterého dochází za provozních podmínek k ustálení koncentrace suspendovaných částic aktivovaného kalu a funkce zkušební jednotky.

▼B

Rozběhová fáze začíná první vsádkou zkoušené látky a končí dobou, kdy naměřený úbytek zkoušené látky dosáhne plató (poměrně konstantní hodnoty). Tato fáze nesmí trvat déle než 6 týdnů.

Hodnotící fáze je doba trvající tři týdny, která se počítá od okamžiku, kdy úbytek zkoušené látky dosáhl poměrně konstantní, zpravidla vysoké hodnoty. U látek, které se během šesti týdnů rozložily málo nebo se nerozložily vůbec, se za vyhodnocovací fázi považuje období dalších tří následujících týdnů.

Na začátku zkoušky se zkušební jednotka (jednotky) naplní zkušební kapalinou s inokulem.

Spustí se provzdušňování (a mamutka (E) v případě použití zkušebního zařízení podle OECD) a zapne se dávkovací zařízení (B).

Přítok odpadních vod bez zkoušené látky do provzdušňovací nádoby (C) se udržuje na hodnotě jeden litr nebo půl litru za hodinu; doba zdržení tak dosáhne tří nebo šesti hodin.

Intenzita provzdušňování musí být regulována tak, aby se obsah provzdušňovací nádoby (C) udržoval ve vztahu a obsah rozpuštěného kyslíku neklesl pod hodnotu 2 mg/l.

Pěnění směsi musí být zabráněno vhodnými prostředky. Nesmí být použity odpeňovače, které inhibují aktivovaný kal.

Kal, který se shromažďuje v horní části provzdušňovací nádoby (C) (a u potvrzující zkoušky OECD na dně sedimentační nádoby (D) a v cirkulačním okruhu), musí být alespoň jednou za den vrácen do matečné suspence setřením nebo jiným vhodným způsobem.

Jestliže kal nesedimentuje, lze zvýšit jeho hustotu přidávkou 2 ml 5 % roztoku chloridu železitého a přidávek podle potřeby opakovat.

Odtok ze sedimentační nádrže se shromažďuje v nádobách (E nebo F) po dobu 20–24 hodin; před odebráním vzorku se směs důkladně promíchá. Nádoby (E nebo F) se musí pečlivě čistit.

Pro potřeby sledování a řízení účinnosti procesu se stanoví nejméně dvakrát týdně CHSK nebo DOC zfiltrovaného průměrného vzorku výtoku ze zařízení a zfiltrované směsi dávkované do zařízení (k filtraci se používá membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm a prvních (přibližně) 20 ml filtrátu se odstraní).

Když se rozkladné procesy ustálí, vyrovnají se i poklesy CHSK nebo DOC.

Sušina kalu v provzdušňovací nádobě se stanovuje dvakrát týdně (v g/l). Zařízení mohou být provozována dvěma způsoby: buď se sušina kalu v provzdušňovací nádobě stanovuje dvakrát týdně, a pokud je sušina kalu vyšší než 2,5 g/l, přebytečný kal se vypustí, nebo se denně odebere z každé nádoby 500 ml suspence, takže střední doba zdržení kalu v zařízení je šest dní.

▼B

Jestliže jsou naměřené a hodnocené parametry (účinnost procesu stanovená na základě úbytku CHSK nebo DOC, koncentrace kalu, schopnost sedimentace kalu, zákal kapalné fáze atd.) obou jednotek dostatečně stabilní, může být zahájeno přidávání zkoušené látky podle bodu 1.6.2.2 do přítoku do jedné z jednotek.

Jinou možností je přidat zkoušenou látku na začátku fáze růstu kalu (1.6.2.1), a to zejména tehdy, je-li jako inokulum používán aktivovaný kal.

1.6.2.2. Zkušební postup

Při dodržování podmínek pro rozběhovou fázi se do přítoku do zkušebního zařízení přidává zásobní (asi 1 %) roztok zkoušené látky, aby bylo dosaženo požadované koncentrace materiálu v suspensi (DOC v rozmezí 10–20 mg/l nebo CHSK 40 mg/l). To lze provádět denním přimícháváním zásobního roztoku do odpadní vody nebo jeho přiváděním pomocí samostatného čerpadla. Těto koncentrace může být dosaženo postupně. Nemá-li zkoušená látka toxické účinky pro aktivovaný kal, mohou být zkoušeny i vyšší koncentrace.

Do jednotky se slepým vzorkem se dávkuje pouze odpadní voda bez zkoušené látky. Z odtoku se odebírají vzorky pro analýzu a filtrují se přes membránový filtr (0,45 µm), přičemž se prvních přibližně 20 ml filtrátu odstraní.

Filtráty vzorků musí být analyzovány v den odběru nebo musí být vhodně konzervovány, např. přidávkem 0,05 ml 1 % chloridu rtuťnatého (HgCl₂) na každých 10 ml filtrátu nebo uložení na 24 hodin při teplotě 2–4 °C nebo při teplotě 18 °C na delší dobu.

Rozběhová fáze od okamžiku přidání zkoušené látky by neměla překročit šest týdnů a vyhodnocovací fáze by neměla být kratší než tři týdny, tak aby bylo k dispozici 14–20 stanovení pro výpočet konečného výsledku.

Spřažená zařízení

Spřažení se dosáhne tak, že se mezi zařízeními jednou denně vymění 1,5 l suspence (včetně kalu) z aeračních nádob. Dochází-li k silné adsorpci zkoušené látky, odebere se 1,5 l kapalné fáze ze sedimentační nádoby a přidá se do nádoby s aktivovaným kalem druhého zařízení.

1.6.2.3. Analýza

Ke sledování chování zkoušené látky mohou být použity dvě metody:

Stanovení DOC a stanovení CHSK.

▼ B

Hodnoty DOC se stanoví duplicitně pomocí analyzátoru uhlíku a hodnoty CHSK se stanoví podle literatury (2).

Specifická analýza

Koncentrace zkoušené látky se stanoví vhodnou analytickou metodou. Je-li to možné, stanoví se také množství látky adsorbované na aktivovaný kal.

2. ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

2.1. SPŘAŽENÁ ZAŘÍZENÍ

Jsou-li použita spřažená zařízení, vypočte se denně stupeň odstranění DR, a to postupem podle bodu 1.2.1.

Tyto denní hodnoty stupně odstranění DR se opraví na hodnotu DR_c zohledňující přenos materiálu při očkování; tento výpočet se provádí podle rovnice [2] pro střední dobu prodlení tři hodiny nebo podle rovnice [3] pro střední dobu prodlení šest hodin.

$$DR_c = \frac{8}{7}DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DR_c = \frac{4}{3}DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Ze získaných hodnot se vypočte jejich průměr a dále směrodatná odchylka podle rovnice [4]:

$$S_{DR_c} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR}_c - DR_{c_i})^2}{n - 1}} \quad [4]$$

kde:

S_{DR_c} = směrodatná odchylka hodnot DR_c,

\overline{DR}_c = průměr hodnot DR_c,

n = počet stanovení.

Odlehlé hodnoty DR_c se vyloučí vhodnou statistickou metodou, např. Nalimovovou metodou (6) na hladině významnosti 95 %, průměr a směrodatná odchylka se poté opět vypočtou bez odlehlých hodnot DR_c.

Výsledná hodnota se poté vypočte podle rovnice [5]:

$$DR_c = \overline{DR}_c \pm \frac{t_{n-1; \alpha^S}}{\sqrt{n}} DR_c \quad [5]$$

▼ B

kde:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabulková hodnota t pro n dvojic hodnot E a E₀
a hladinu významnosti P (P = 1 - α), kde P = 95 % (1).

Výsledkem je střední hodnota na hladině významnosti 95 %, příslušná směrodatná odchylka, počet hodnot DR_c bez odlehlých hodnot a počet odlehlých hodnot, například

DR_c = 98,6 ± 2,3 % úbytku DOC,

s = 4,65 % úbytku DOC,

n = 18,

x = počet odlehlých hodnot.

2.2. NESPŘAŽENÁ ZAŘÍZENÍ

Provozní výkon zařízení může být ověřen následovně:

$$\% \text{ odstranění CHSK nebo DOC} = \frac{\text{CHSK nebo DOC odp. vody} - \text{CHSK nebo DOC výtoku}}{\text{CHSK nebo DOC odp. vody}} \times 100$$

Denním vynášením naměřených hodnot úbytků do grafu se projeví všechny tendence, např. adaptace.

2.2.1. Využití stanovení CHSK/DOC

Denní hodnota stupně odstranění DR se vypočte podle bodu 1.2.1.

Vypočte se průměr z denních hodnot; kromě toho se podle rovnice [6] vypočte směrodatná odchylka:

$$S_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\overline{DR} - DR_i)^2}{n - 1}} \quad [6]$$

kde:

S_{DR} = směrodatná odchylka hodnot DR_i,

\overline{DR} = průměr hodnot DR_i,

n = počet stanovení.

Odlehlé hodnoty DR se vyloučí vhodnou statistickou metodou, např. Nalimovovou metodou (6) na hladině významnosti 95 %, a průměr a směrodatná odchylka se poté opět vypočtou bez odlehlých hodnot DR.

Výsledná hodnota se poté vypočte podle rovnice [7]:

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha} S}{\sqrt{n}} \quad [7]$$

kde:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabulková hodnota t pro n dvojic hodnot E a E₀
a hladinu významnosti P (P = 1 - α) kde P = 95 % (1).

▼ B

Výsledkem je střední hodnota na hladině významnosti 95 %, příslušná směrodatná odchylka, počet hodnot DRc bez odlehlých hodnot a počet odlehlých hodnot, například

DR = $(98,6 \pm 2,3)$ % úbytku DOC,

s = 4,65 % úbytku DOC,

n = 18,

x = počet odlehlých hodnot.

2.2.2. *Postup při specifické analýze*

Odstranění zkoušené látky z vodné fáze (R_w) v % se vypočte podle bodu 1.2.2.

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto informace:

- formulář uvedený v doplňku 3 s pracovními podmínkami zkoušky,
- druh použitého zkušebního zařízení (zařízení potvrzující zkoušku OECD nebo zařízení s porézní nádobou),
- způsob provozování zařízení: spřažená nebo nespřažená zařízení,
- druh odpadních vod: syntetické nebo odpadní vody z domácností, u odpadních vod z domácností datum a místo odběru,
- druh inokula, datum a místo odběru,
- popis použitých analytických metod, pokud byly prováděny specifické analýzy,
- grafické vyjádření závislosti úbytku CHSK nebo DOC na čase během rozběhové a vyhodnocovací fáze,
- analytický výtěžek stanovení obsahu zkoušené látky prostřednictvím CHSK nebo DOC v zásobním roztoku,
- při provádění specifické analýzy grafické vyjádření závislosti procentuálního úbytku zkoušené látky z kapalně fáze na čase (během rozběhové a vyhodnocovací fáze),
- střední úbytek DOC nebo CHSK zkoušené látky a směrodatná odchylka vypočtené z výsledků získaných během vyhodnocovací fáze, tj. kdy je úbytek zkoušené látky konstantní nebo kdy se poměr ustálil,
- grafické vyjádření závislosti koncentrace aktivovaného kalu na čase,
- jakékoli poznámky týkající se aktivovaného kalu (odstraňování přebytečného kalu ze zařízení, tvorba shluků, použití FeCl_3 atd.),

▼B

- koncentrace zkoušené látky použité ve zkoušce,
- všechny výsledky analýz kalu,
- všechny informace a experimentální výsledky týkající se zkoušené látky a referenční látky, pokud byla použita,
- vědecké zdůvodnění všech odchylek a změn metody.

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Příčinou nízké hodnoty úbytku zkoušené látky z vodné fáze může být inhibice mikroorganismů způsobená zkoušenou látkou. Projevuje se to především rozpouštěním a ztrátou kalu, zakalováním kapalně fáze a snížením účinnosti odstraňování CHSK nebo DOC v zařízení.

Někdy hraje roli fyzikálně-chemická adsorpce. Mezi biologickým působením na molekuly látky a její fyzikálně-chemickou adsorpcí je možné rozlišit pomocí analýzy kalu po odpovídající desorpci.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky.

To lze provést několika způsoby, nejsprávnější je však použít supernatant jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrii).

Vysoké hodnoty úbytku DOC nebo CHSK jsou zpravidla způsobeny biologickým rozkladem, při nízkých hodnotách úbytku nelze odlišit biologický rozklad od jiných mechanismů odstranění látky. Pokud např. rozpustná sloučenina vykazuje vysoký stupeň adsorpce (98 %) a denně je odstraňováno 10 % kalu, dochází až ke 40 % odstranění látky z tohoto kalu; je-li denně odstraňováno 30 % kalu, může eliminace na základě adsorpce a odstranění kalu vzrůst na 65 % (4).

Při použití specifických analýz je třeba věnovat pozornost vlivu struktury látky na specifickou analýzu. Úbytek látky stanovený specifickou analýzou nemůže být interpretován jako mineralizace látky.

4. LITERATURA

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 303 A, rozhodnutí Rady C (81) 30 v konečném znění.
- 2) Příloha V směrnice Komise 84/449/EHS (Úř. věst. L 251, 19.9.1984, s. 1), metoda C.9 Rozložitelnost: Chemická spotřeba kyslíku.
- 3) Painter, H. A., King, E. F., WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.
- 4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, str. 161–171.

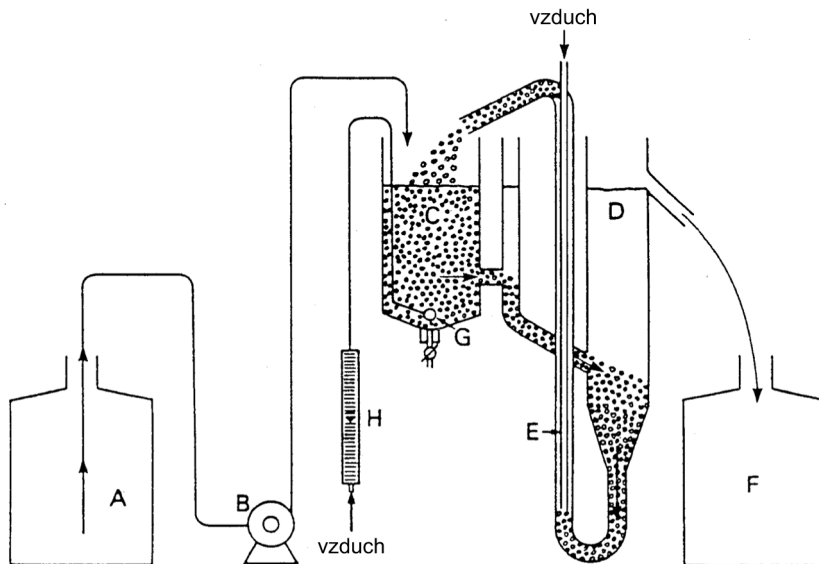
▼B

- 5) Směrnice Rady 82/242/EHS a 82/243/EHS (Úř. věst. L 109, 22.4.1982, s. 1), kterými se mění směrnice Rady 73/404/EHS a 73/405/EHS o biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek (Úř. věst. L 347, 17.12.1973, s. 51).
- 6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Oberprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie, 303 (1980), str. 406–408.

▼ B

Dodatek 1

Obrázek 1



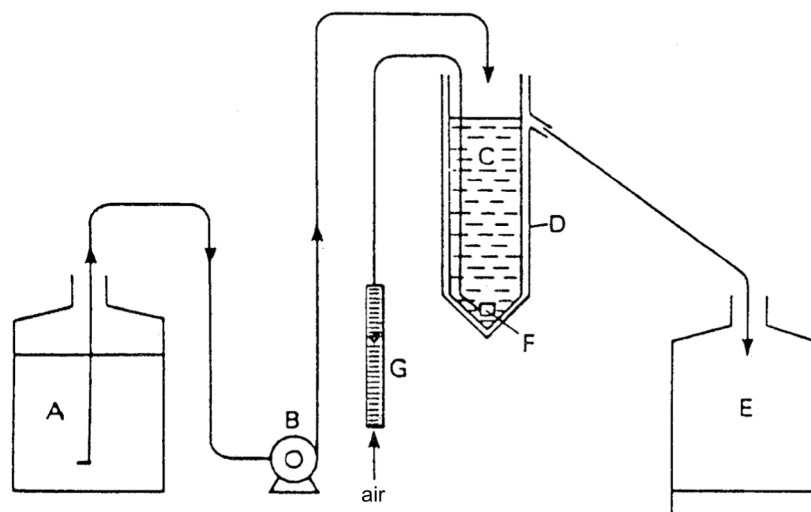
Legenda: A = zásobník
 B = dávkovací zařízení
 C = provzdušňovací nádoba
 (kapacita 3 l)
 D = sedimentační nádoba
 E = mamutka
 F = zásobník na výtok
 G = provzdušňovací krychlička
 H = průtokoměr (nepovinné)

▼ B

Dodatek 2

Obrázek 1

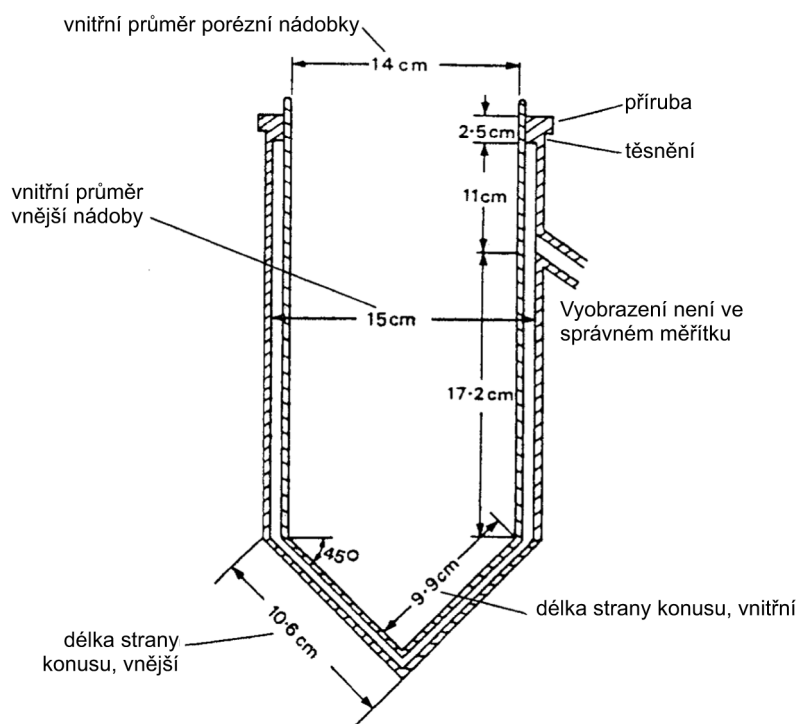
Zařízení používané pro stanovení biologické rozložitelnosti



Legenda: A = zásobník
 B = dávkovací čerpadlo
 C = porézní provzdušňovací nádoba
 D = vnější nepropustná nádoba
 E = zásobník na výtok
 F = provzdušňovací krychlička
 G = rotametr (nepovinné)

Obrázek 2

Detaily třílitrové porézní provzdušňovací nádoby





Dodatek 3

Pracovní podmínky simulační zkoušky s aktivovaných kalem

Zaškrtně se pro každou skupinu

Zařízení

Průkazná zkouška OECD
Zařízení s porézni nádobou

Způsob provozu

samostatná jednotka
spřažená zařízení
nespřažená zařízení

Přeočkování

žádné
aktivované kalem
kapalnou fází vzniklou po sedimentaci

Střední doba zdržení

3 hodiny
6 hodin

Živné médium

odpadní voda z domácností
syntetická odpadní voda

Inokulum

z čistírnou odpadních vod
směsné inokulum
aktivovaný kal

Přidání zkoušené látky

na začátku
Postupně
po vytvoření kalu

Analýzy

Specifická
CHSK
DOC

▼B**C.11. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST****ZKOUŠKA NA INHIBICI DÝCHÁNÍ AKTIVOVANÉHO KALU****1. METODA****1.1. ÚVOD**

Popsanou metodou se posuzuje vliv zkoušené látky na mikroorganismy měřením rychlosti jejich dýchání za definovaných podmínek v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky.

Účelem této metody je poskytnout rychlou screeningovou metodu, kterou lze určit látky, které mohou nepříznivě ovlivnit aerobní mikrobiální čistírny vod, a odhadnout vhodné koncentrace zkoušených látek, které nejsou inhibující a které je možno použít ve zkouškách biologické rozložitelnosti.

Hlavní zkoušce může předcházet orientační zkouška. Poskytne informace o rozsahu koncentrací, které je možné použít v hlavní zkoušce.

Do plánu zkoušky se zařadí dvě kontroly, jedna na začátku a druhá na konci řady pokusů. Každá dávka aktivovaného kalu se také kontroluje pomocí referenční látky.

Tato metoda je nejnadhěji použitelná pro látky, které díky své rozpustnosti a nízké tčkavosti zůstávají většinou ve vodě.

U látek s nízkou rozpustností v médiích používaných ve zkoušce může být nemožné stanovit EC₅₀.

Pokud má zkoušená látka sklon k rozkladu oxidační fosforylací, mohou výsledky založené na absorpci kyslíku vést k nesprávným závěrům.

Před provedením zkoušky je užitečné ověřit tyto informace:

- rozpustnost látky ve vodě,
- tlak par,
- strukturní vzorec,
- čistota zkoušené látky.

Doporučení

Aktivovaný kal může obsahovat potenciálně patogenní organismy a je třeba s ním zacházet opatrně.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Respirační rychlost je spotřeba kyslíku mikroorganismy odpadních vod v aerobním kalu obecně vyjádřená v mg O₂ na 1 mg kalu za hodinu.

▼ B

Pro výpočet inhibičního účinku zkoušené látky při určité koncentraci se respirační rychlost vyjadřuje v procentech průměrné hodnoty dvou kontrolních respiračních rychlostí:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}} \right) \times 100 = \% \text{inhibice}$$

kde:

R_s = rychlost spotřeby kyslíku při použité koncentraci zkoušené látky,

R_{c1} = rychlost spotřeby kyslíku v kontrole 1,

R_{c2} = rychlost spotřeby kyslíku v kontrole 2,

EC_{50} je v této zkoušce koncentrace zkoušené látky, při které činí respirační rychlost 50 % hodnoty vycházející z kontroly za podmínek popsaných v této metodě.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Jako referenční látka se doporučuje známý inhibitor dýchání 3,5-dichlorfenol, kterým by mělo být prostřednictvím ověření EC_{50} u každé dávky aktivovaného kalu zkontrolováno, že kal není mimoriádně citlivý.

1.4. PRINCIP ZKUŠEBNÍ METODY

Respirační rychlost aktivovaného kalu vyživovaného standardním množstvím syntetické odpadní vody se měří po době kontaktu 30 minut nebo 3 hodiny, popřípadě v obou časech. Měří se také respirační rychlost téhož aktivovaného kalu v přítomnosti různých koncentrací zkoušené látky za jinak stejných podmínek. Inhibiční účinek zkoušené látky při určité koncentraci se vyjádří v procentech průměrné respirační rychlosti ze dvou kontrol. Hodnota EC_{50} se vypočte ze stanovení při různých koncentracích.

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Výsledky zkoušky jsou platné, jestliže

— se respirační rychlosti dvou kontrolních pokusů od sebe liší nejvýše o 15 %,

— EC_{50} (pro 30 minut a/nebo pro 3 hodiny) 3,5 dichlorfenolu leží v přijatelném rozmezí 5–30 mg/l.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. Činidla

1.6.1.1. Roztoky zkoušené látky

Roztoky zkoušené látky se připraví čerstvé na začátku studie s použitím zásobního roztoku. Postupuje-li se níže popsaným postupem, je vhodná koncentrace zásobního roztoku 0,5 g/l.

▼B

1.6.1.2. Roztok kontrolní látky

Roztok 3,5-dichlorfenolu lze připravit například rozpuštěním 0,5 g 3,5-dichlorfenolu v 10 ml 1 M NaOH, zředěním na přibližně 30 ml destilovanou vodou, za míchání přidáním 0,5M H₂SO₄ do začínajícího srážení – bude potřeba asi 8 ml 0,5M H₂SO₄ – konečným doplněním směsi destilovanou vodou na 1 litr. pH musí být poté 7 až 8.

1.6.1.3. Syntetická odpadní voda

Syntetická odpadní voda se připraví rozpuštěním následujícího množství látek v 1 litru vody:

— 16 g peptonu,

— 11 g masového extraktu,

— 3 g močoviny,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g CaCl₂·2H₂O,

— 0,2 g MgSO₄·7H₂O,

— 2,8 g K₂HPO₄.

Poznámka 1: Tato syntetická odpadní voda má stonásobnou koncentraci oproti vodě popsané v technické zprávě OECD „Návrh metody stanovení biologické rozložitelnosti povrchově aktivních látek používaných v syntetických detergentech“ (11. června 1976), s přidavkem hydrogenufosforečnanu draselného.

Poznámka 2: Nepoužije-li se připravené médium ihned, přechovává se v temnu při 0–4 °C ne déle než jeden týden za podmínek, které nezpůsobují žádné změny v jeho složení. Médium může být před uschováním sterilizováno, nebo je možné pepton a masový extrakt přidat krátce před provedením zkoušky. Před použitím je nutné médium důkladně promíchat a upravit pH.

1.6.2. *Přístroje a pomůcky*

Měřicí aparatura: Přesná konstrukce není podstatná. Musí však mít volný prostor nad kapalinou a sonda musí přesně zapadat do hrdla odměrné baňky.

Kromě běžného laboratorního vybavení jsou nezbytné zejména tyto přístroje:

— měřicí přístroje,

— provzdušňovací zařízení,

— pH-metr s elektrodou,

— kyslíková elektroda.

1.6.3. *Příprava inokula*

Jako mikrobiální inokulum pro zkoušku se používá aktivovaný kal z čistírny odpadních vod čistící převážně odpadní vody z domácností.

Je-li to nutné, je možné při dodání kalu do laboratoře odstranit hrubé částice krátkodobým usazením (např. 15 minut) a dekantovat horní vrstvu jemnějších pevných částic pro použití. Alternativně je možné kal několik sekund promíchat.

▼B

Pokud se kromě toho předpokládá, že je přítomna látka s inhibičním účinkem, promyje se kal vodovodní vodou nebo isotonickým roztokem. Po centrifugaci se supernatant dekantuje (tento postup se opakuje třikrát).

Malé množství kalu se zváží a vysuší. Z výsledku je možné vypočítat množství vlhkého kalu, které je nutné suspendovat ve vodě, aby se získal aktivovaný kal v oblasti koncentrací suspendovaných pevných látek ve směsné kapalině mezi 2 a 4 g/l. Dodrží-li se níže doporučený postup získá se zkušební médium s koncentrací kalu 0,8 až 1,6 g/l.

Není-li možné kal použít v den, kdy byl odebrán, přidá se ke každému litru aktivovaného kalu připraveného tak, jak je popsáno výše, 50 ml syntetické odpadní vody, kal se poté provzdušňuje přes noc při 20 ± 2 °C. Poté se během dne za provzdušňování udržuje až do použití. Před použitím se zkontroluje pH, a je-li třeba, upraví se na 6–8. Obsah suspendovaných pevných látek ve směsné kapalině se stanoví způsobem popsaným v předchozím odstavci.

Je-li třeba v následující dny použít stejné dávky kalu (nejvýše po čtyři dny), přidá se na konci každého pracovního dne dalších 50 ml syntetické odpadní vody na litr kalu.

1.6.4. *Provedení zkoušky*

Trvání/doba kontaktu:	30 minut a/nebo 3 hodiny, během kterých probíhá provzdušňování
Voda:	Pitná voda (v případě potřeby zbavená chlórů)
Prívod vzduchu:	Čistý vzduch, prostý oleje. Průtok 0,5–1 l/min
Měřicí aparatura:	Baňka s plochým dnem, jaká se používá pro stanovení BSK
Oxymetr:	Vhodná kyslíková elektroda se zapisovačem
Živný roztok:	Syntetická odpadní voda (viz výše)
Zkoušená látka	Roztok zkoušené látky se připraví čerstvý na začátku zkoušky
Referenční látka:	Např. 3,5-dichlorfenol (nejméně tři koncentrace)
Kontrola:	Naočkovaný vzorek bez zkoušené látky
Teplota:	20 ± 2 °C

Níže je uveden navržený experimentální postup, který je možné použít pro dobu kontaktu tři hodiny jak pro zkoušenou, tak pro referenční látku:

Použije se několik nádob (např. kádinek na jeden litr).

Použije se alespoň pět koncentrací lišících se konstantním faktorem pokud možno nepřevyšujícím hodnotu 3,2.

V čase „0“ se 16 ml syntetické odpadní vody doplní vodou na 300 ml. Přidá se 200 ml mikrobiálního inokula a výsledná směs (500 ml) se převede do první nádoby (první kontrola C₁).

▼ B

Zkušební nádoby je nutno nepřetržitě provzdušňovat, aby bylo zaručeno, že koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 2,5 mg/l, a aby těsně před měřením respirační rychlosti byla koncentrace kyslíku přibližně 6,5 mg/l.

V čase „15 minut“ (15 minut je libovolně zvolený, avšak vhodný interval) se opakuje tentýž postup, který se liší pouze tím, že se k 16 ml syntetické odpadní vody přidá 100 ml zásobního roztoku zkoušené látky před doplněním vodou na 300 ml a přidáním mikrobiálního inokula na celkový objem 500 ml. Tato směs se poté převede do druhé nádoby a provzdušňuje se, jak bylo popsáno výše. Tento postup se opakuje v 15minutových intervalech s různými objemy zásobního roztoku zkoušené látky, čímž se získá řada nádob obsahujících různé koncentrace zkoušené látky. Nakonec se připraví druhá kontrola (C₂).

Po třech hodinách se zaznamená pH, dobře promíchaný vzorek obsahu první nádoby se převede do měřicí aparatury a v době do 10 minut se změří respirační rychlost.

Stanovení se opakuje u obsahu každé z nádob v 15minutových intervalech tak, že doba kontaktu v každé nádobě je tři hodiny.

Referenční látka se zkouší na každé dávce mikrobiálního inokula tímž způsobem.

Mají-li se měření provádět po 30 minutách kontaktu, je třeba použít jiný režim (např. použití více než jednoho oxymetru).

Je-li požadováno měření chemické spotřeby kyslíku, připraví se další nádoby obsahující zkoušenou látku, syntetickou odpadní vodu a čistou vodu, avšak žádný aktivovaný kal. Spotřeba kyslíku se změří a zaznamená po době provzdušňování 30 minut a/nebo tři hodiny (doba kontaktu).

2. ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Respirační rychlost se vypočte ze záznamu zapisovače mezi koncentracemi O₂ přibližně 6,5 mg/l a 2,5 mg/l, nebo za období deseti minut, je-li respirační rychlost nízká. Úsek respirační křivky, ze které se vyhodnocuje respirační rychlost, musí být lineární.

Jestliže se respirační rychlosti v obou kontrolách od sebe liší o více než 15 % nebo EC₅₀ referenční látky (za 30 min a/nebo tři hodiny) neleží v přijatelném rozmezí (5–30 mg/l pro 3,5-dichlorfenol), je zkouška neplatná a musí se opakovat.

Pro každou zkoušenou koncentraci (viz bod 1.2) se vypočte inhibice v %. Inhibice v % se vynese proti koncentraci do semilogaritmického (nebo logaritmicko-probitového) papíru a odečte se hodnota EC₅₀.

Standardními postupy lze stanovit pro hodnoty EC₅₀ 95 % interval spolehlivosti.

▼ B**3. ZPRÁVY****3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce má pokud možno obsahovat tyto údaje:

- zkoušená látka chemické identifikační údaje,
- systém použitý při zkoušce: zdroj, koncentrace a veškerá předběžná úprava aktivovaného kalu,
- zkušební podmínky:
 - pH reakční směsi před měřením respirace,
 - zkušební teplota,
 - doba trvání zkoušky,
 - referenční látka a její změřená hodnota EC₅₀,
 - abiotická spotřeba kyslíku (pokud k ní dochází).
- výsledky:
 - všechny naměřené hodnoty,
 - křivka inhibice a metoda výpočtu EC₅₀,
 - EC₅₀ a podle možnosti 95 % interval spolehlivosti, EC₂₀ a EC₈₀,
 - veškerá pozorování a veškeré odchylky od této zkušební metody, které mohly ovlivnit výsledek.

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Hodnotu EC₅₀ je třeba považovat pouze za orientační hodnotu pravděpodobné toxicity zkoušené látky buď při zpracování odpadních vod aktivovaným kalem, nebo pro mikroorganismy v odpadních vodách, protože složité interakce, ke kterým dochází v životním prostředí, nelze přesně simulovat laboratorní zkouškou. Kromě toho zkoušené látky, které mohou mít inhibiční účinky na oxidaci amoniaku, mohou také způsobovat atypické inhibiční křivky. Proto je nutné interpretovat tyto křivky opatrně.

4. LITERATURA

- 1) Norma ISO 8192-1986.
- 2) Broecker, B., Zahn, R., Water Research 11, 1977, str. 165.
- 3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., Chemosphere 10, 1981, str. 245.
- 4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), Recommended Method No 103, také popsáno v:
- 5) Robra, B., Wasserl Abwasser 117, 1976, str. 80.
- 6) Schefer, W., Textilveredlung 6, 1977, str. 247.
- 7) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 209, rozhodnutí Rady C(84) 30 v konečném znění.

▼B**C.12. BIOLOGICKÁ ROZLOŽITELNOST****MODIFIKOVANÁ ZKOUŠKA SCAS****1. METODA****1.1. ÚVOD**

Účelem této metody je hodnocení potenciální úplné biologické rozložitelnosti netěkavých organických látek rozpustných ve vodě, jsou-li po dlouhou dobu vystaveny poměrně vysokým koncentracím mikroorganismů. Životaschopnost mikroorganismů se udržuje po tuto dobu denními přídávky živin z usazené odpadní vody. (Pro potřebu během víkendů lze odpadní vodu přechovávat při 4 °C. Lze rovněž použít syntetickou odpadní vodu podle potvrzující zkoušky OECD.)

Při interpretaci výsledků (viz bod 3.2) je třeba vzít v úvahu, že může docházet k fyzikálně-chemické adsorpci na suspendovaných pevných látkách.

V důsledku dlouhé doby zdržení kapalně fáze (36 hodin) a průběžného přidávání živin nesimuluje zkouška podmínky existující v čistírně odpadních vod. Výsledky získané při pokusech s různými zkoušenými látkami ukazují, že zkouška má vysoký potenciál biologického rozkladu.

Podmínky, za nichž probíhá zkouška, jsou vysoce příznivé pro výběr a/nebo adaptaci mikroorganismů schopných rozkládat zkoušenou látku. (Postup je možné použít také k získávání aklimatizovaných inokul, pro použití v jiných zkouškách.)

V této metodě se úplná biologická rozložitelnost zkoušené látky posuzuje podle míry rozpuštěného organického uhlíku. Spíše než z rozdílu $C_{\text{celk}} - C_{\text{anorg}}$ se doporučuje stanovovat DOC po okyselení a přečištění.

Současným použitím specifické analytické metody může být stanovena také primární biologická rozložitelnost látky (úbytek výchozí chemické látky).

Touto metodou mohou být zkoušeny pouze organické látky, které mají při koncentracích použitých ve zkoušce tyto vlastnosti:

- jsou rozpustné ve vodě (nejméně 20 mg rozpuštěného organického uhlíku na litr),
- mají zanedbatelný tlak par,
- neinhibují bakterie,
- nejsou ve zkušebním systému významně adsorbovány,
- pěněním nedochází ve zkoušeném roztoku ke ztrátám.

Musí být stanoven obsah organického uhlíku ve zkoušené látce.

▼ B

Při interpretaci získaných výsledků budou užitečné informace o relativním podílu hlavních složek zkušebního materiálu, zejména pokud jsou stanovené hodnoty biologické rozložitelnosti nízké nebo marginální.

Informace o toxicitě zkoušené látky pro mikroorganismy jsou důležité rovněž pro interpretaci nižších hodnot biologické rozložitelnosti a volbu vhodných koncentrací zkoušené látky.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

C_T = koncentrace zkoušené látky na začátku provzdušňovacího cyklu, vyjádřená jako množství organického uhlíku přítomného nebo přidaného k usazené odpadní vodě (mg/l),

C_t = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu zkušební roztoku na konci provzdušňovacího cyklu (mg/l),

C_c = koncentrace rozpuštěného organického uhlíku zjištěná v supernatantu zkušební roztoku na konci provzdušňovacího cyklu (mg/l).

Biologický rozklad je v této metodě definován jako úbytek organického uhlíku. Biologický rozklad lze vyjádřit jako:

1. Procentuální úbytek D_{da} množství denně přidávané látky:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_T - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

kde

D_{da} = rozklad/denní přídavek.

2. Procentuální úbytek D_{ssd} množství látky přítomné na začátku každého dne:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{t_i} - C_{c_i} - 3C_{t_{(i+1)}} + 3C_{c_{(i+1)}}}{2C_T + C_{t_i} - C_{c_i}} \times 100 \quad [2 (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 (b)]$$

kde:

D_{ssd} = rozklad/množství látky na začátku dne,

indexy i a $(i + 1)$ se vztahují ke dni měření.

Rovnice 2(a) se doporučuje, jestliže se DOC ve výtokové vodě ze dne na den mění, zatímco rovnicí 2(b) lze použít v případě, že DOC zůstává ve výtokové vodě ze dne na den relativně konstantní.

▼ B

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

V některých případech mohou být při posuzování nových látek využity referenční látky; zatím však nelze doporučit žádné specifické referenční látky.

V doplňku I jsou uvedeny údaje k několika sloučeninám vyhodnoceným v okružních testech; jsou určeny především pro potřebu občasné kalibrace metody a dále umožní srovnání výsledků získaných jinými metodami.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Aktivovaný kal z čistírny odpadních vod se vpraví do semikontinuální jednotky pro aktivovaný kal (SCAS, semi-continuous activated sludge unit). Přidá se zkoušená látka a usazená odpadní voda z domácností a směs se 23 hodin provzdušňuje. Provzdušňování se poté ukončí, kal se nechá usadit a supernatant se odstraní.

Zbývající kal v provzdušňovací komoře se pak smísí s další alikvotní částí zkoušené látky a odpadní vody a cyklus se opakuje.

Biologický rozklad se určí stanovením obsahu rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu. Tato hodnota se porovná s hodnotou zjištěnou pro supernatant z kontrolní nádoby, do které byla přidána pouze usazená odpadní voda.

Při použití specifické analytické metody se měří změny koncentrací původní molekuly látky způsobené biologickým rozkladem (míra primární biologické rozložitelnosti).

1.5. KRITÉRIA JAKOSTI

Reprodukovatelnost této metody založené na úbytku rozpuštěného organického uhlíku dosud nebyla stanovena. (Pokud jde o primární biologický rozklad, dosahuje se velmi přesných hodnot pro látky, které dosahují vysokého stupně rozkladu.)

Citlivost metody je ve velké míře dána kolísáním slepého pokusu a v menší míře přesností stanovení rozpuštěného organického uhlíku a obsahem zkoušené látky v kapalině na začátku každého cyklu.

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍHO POSTUPU

1.6.1. *Příprava*

Pro každou zkoušenou látku a pro kontrolní zkoušky se sestaví dostatečný počet čistých provzdušňovacích jednotek, popřípadě je možné použít originální zkušební jednotku SCAS o obsahu 1,5 l, a trubice pro přívod vzduchu (obrázek 1). Stlačený vzduch přiváděný do zkušebních jednotek, přečištěný vatovým filtrem, nesmí obsahovat organický uhlík a musí být předem nasycen vodou, aby se snížily ztráty vypařováním.

Vzorek kapaliny s aktivovaným kalem obsahující 1–4 g suspendovaných pevných látek v 1 litru se získá z čistírny pracující s aktivovaným kalem, čistící převážně odpadní vody z domácností. Pro každou provzdušňovací jednotku je potřeba přibližně 150 ml kapaliny s aktivovaným kalem.

▼ B

Zásobní roztoky zkoušené látky se připravují s použitím destilované vody; obvykle se požaduje koncentrace 400 mg organického uhlíku na litr, aby se nastavila na začátku každého cyklu provzdušňování koncentrace zkoušené látky 20 mg uhlíku na litr, nedochází-li k biologickému rozkladu.

Umožňuje-li to toxicita pro mikroorganismy, jsou přípustné vyšší koncentrace.

Změří se obsah organického uhlíku zásobních roztoků.

1.6.2. Zkušební podmínky

Zkouška se provádí při 20–25 °C.

Použije se vysoká koncentrace aerobních mikroorganismů (1–4 g na litr suspendovaných látek) a efektivní doba zdržení je 36 hodin. Uhlíkaté látky v přiváděné odpadní vodě se ve velké míře oxidují, obvykle během osmi hodin po začátku každého cyklu provzdušňování. Poté kal po zbytek provzdušňovacího cyklu endogenně dýchá a v této době je jediným dostupným substrátem zkoušená sloučenina, pokud se také rychle nerozloží. Tyto skutečnosti spolu s denním opakovaným očkovaním, používá-li se jako médium odpadní voda z domácnosti, vytvářejí vysoce příznivé podmínky jak pro aklimatizaci, tak pro vysoký stupeň rozkladu.

1.6.3. Provedení zkoušky

Odebere se vzorek kapaliny s aktivovaným kalem z vhodné čistírny pracující s aktivovaným kalem a čistící převážně odpadní vody z domácností nebo vzorek kapaliny z laboratorní jednotky a udržuje se v aerobních podmínkách až do použití v laboroři. Každá provzdušňovací i kontrolní jednotka se naplní 150 ml kapaliny s aktivovaným kalem (používá-li se originální jednotka pro zkoušku SCAS, je třeba uvedené objemy násobit 10) a zahájí se provzdušňování. Po 23 hodinách se provzdušňování ukončí a kal se nechá 45 minut usazovat. Postupně se otevrou kohouty všech nádob a odeberou se 100ml podíly supernatantu. Ke zbývajícimu kalu v každé provzdušňovací jednotce se přidá 100 ml usazené odpadní vody z domácností získané bezprostředně před použitím. Opět se zahájí provzdušňování. V této etapě se nepřidávají žádné zkoušené látky a do jednotek se denně přidává pouze odpadní voda z domácností do té doby, dokud není voda po usazení čirá. To trvá obvykle až dva týdny, během nichž se obsah rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu na konci každého provzdušňovacího cyklu přiblíží konstantní hodnotě.

Na konci této fáze se jednotlivé usazené kaly smísí a do každé jednotky se vpraví 50 ml výsledného směsného kalu.

Do kontrolních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody a 5 ml vody a do zkušebních jednotek se přidá 95 ml usazené odpadní vody a 5 ml příslušného zásobního roztoku zkoušené látky (400 mg/l). Znovu se zahájí provzdušňování a pokračuje se v něm 23 hodin. Kal se poté nechá 45 minut usazovat, odebere se supernatant a analyzuje se na obsah rozpuštěného organického uhlíku.

Výše uvedený postup plnění a odběru se opakuje v průběhu zkoušky denně.

▼B

Před usazováním může být nezbytné očistit stěny jednotek, aby se předešlo hromadění pevných látek nad hladinou kapaliny. Pro každou jednotku se použije samostatná stěrka nebo kartáč, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci.

V ideálním případě se rozpuštěný organický uhlík stanoví v supernatantu denně, ale přípouštějí se i méně časté analýzy. Před analýzou se kapaliny zfiltrují přes promyté membránové filtry o velikosti pórů 0,45 μm nebo se odstředí. Vhodný membránový filtr nesmí uvolňovat uhlík a při filtraci nesmí adsorbovat zkoušenou látku. Teplota vzorku po dobu, kdy je v odstředivce, nesmí přesáhnout 40 °C.

Délka zkoušky u látek, u nichž dochází k malému biologickému rozkladu nebo se nerozkládají vůbec, není stanovena, ale na základě zkušenosti lze doporučit, aby trvala nejméně 12 týdnů, ne avšak déle než 26 týdnů.

2. ÚDAJE A VYHODNOCENÍ

Hodnoty koncentrace rozpuštěného organického uhlíku v supernatantu ve zkušebních jednotkách a v kontrolních jednotkách se vynesou do grafu proti času.

Po skončení biologického rozkladu by se koncentrace zjištěná ve zkušební jednotce měla blížit hodnotě v kontrolní jednotce. Jakmile se ve třech po sobě následujících měřeních zjistí, že rozdíl mezi oběma hladinami je konstantní, provede se takový počet dalších měření, který je postačující pro statistické vyhodnocení výsledků, a vypočte se procentuální hodnota biologického rozkladu zkoušené látky (D_{da} nebo D_{ssd} , viz bod 1.2).

3. ZPRÁVY

3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí pokud možno obsahovat tyto údaje:

— veškeré informace o druhu odpadní vody, typu použité jednotky a o experimentálních výsledcích týkajících se zkoušené látky, referenční látky (pokud byla použita) a slepého pokusu,

— teplota,

— křivka úbytku s popisem, způsob výpočtu (viz bod 1.2),

— datum a lokalita, kde byly odebrány aktivovaný kal a odpadní voda, stav adaptace, koncentrace atd.,

— vědecké důvody pro jakékoli změny ve zkušebním postupu,

— podpis a datum.

▼ B

3.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Protože látky, které mají být zkoušené touto metodou, nejsou snadno biologicky rozložitelné, bude obvykle jakýkoli úbytek DOC, ke kterému dojde pouze v důsledku biologického rozkladu, rozložený do dnů nebo týdnů, s výjimkou případů, kdy je aklimatizace náhlá, což se projeví náhlým vymizením zkoušené látky po několika týdnech.

Někdy však může hrát významnou úlohu fyzikálně-chemická adsorpce, která se projeví úplným nebo částečným úbytkem přídavného DOC na začátku. Další vývoj závisí na faktorech, jako jsou míra adsorpce a koncentrace suspendovaných látek v nepoužité výtokové vodě. Obvykle rozdíl mezi koncentrací DOC v supernatantech u kontrol a u zkušebních jednotek postupně vzrůstá z počáteční nízké hodnoty a tento rozdíl poté zůstává na nové hodnotě po zbytek experimentu, pokud nedojde k aklimatizaci.

Má-li se rozlišit biologická rozložitelnost (nebo částečná biologická rozložitelnost) od adsorpce, je třeba provést další zkoušky. To lze provést několika způsoby, nejspřávnější je však použít supernatant nebo kal jako inokulum v některé základní zkoušce (nejlépe ve zkoušce respirometrii).

Zkoušené látky, které vykazují v této zkoušce velký úbytek DOC, lze pokládat za potenciálně biologicky rozložitelné. Částečný, neadsorpční úbytek znamená, že látka je alespoň částečně biologicky rozložitelná.

Nízký nebo nulový úbytek DOC může být způsoben inhibicí mikroorganismů zkoušenou látkou, která se může projevovat rozpuštěním nebo úbytkem kalu nebo zákalem supernatantu. V takových případech se zkouška opakuje s nižšími koncentracemi zkoušené látky.

Vyšší citlivosti může být dosaženo specifickými analytickými metodami nebo použitím látek značených ^{14}C . Při použití zkoušené látky značené ^{14}C bude probíhající rozklad zkoušené látky potvrzen vývinem $^{14}\text{CO}_2$.

Pokud se výsledek udává jako primární biologická rozložitelnost, měly by být podle možnosti uvedeny změny v chemické struktuře, které způsobily, že se snížil signál výchozí zkoušené látky.

Musí být popsána vhodnost analytické metody a výsledky stanovení ve slepém živném médiu.

4. LITERATURA

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, rozhodnutí Rady C (81) 30 v konečném znění.

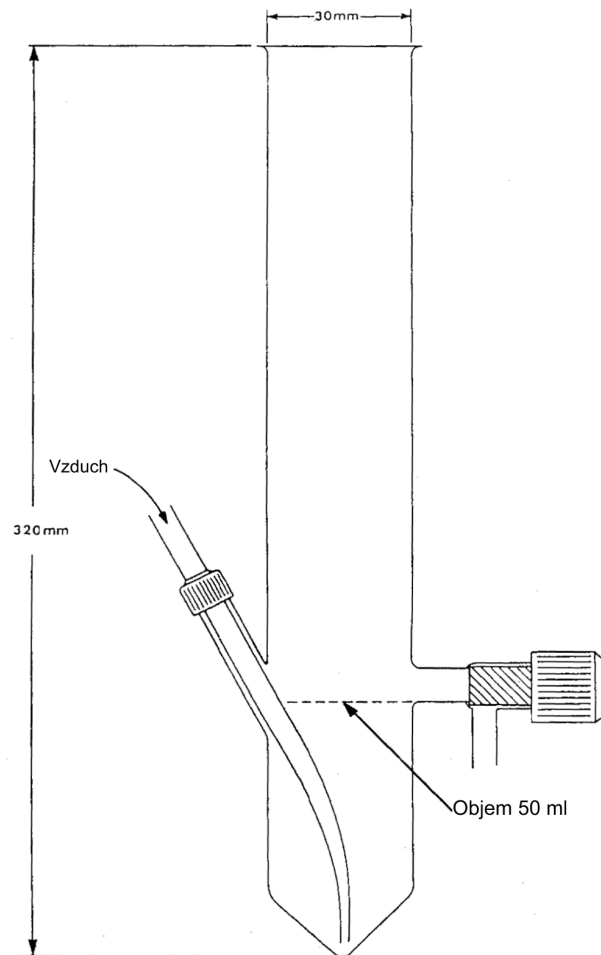
▼B*Doplňěk 1***Zkouška SCAS: příklad výsledků**

Látka	C_T (mg/l)	$C_T - C_c$ (mg/l)	Procento biologického rozkladu D_{da}	Délka zkoušky (dny)
4-acetamidobenzen-1-sulfonát	17,2	2,0	85	40
4-dodecylbenzen-1-sulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
diethylenglykol	16,5	0,2	98,8	40
anilin	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentantetrakarboxylát	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Doplněk 2

Příklad zkušební aparatury



▼B**C.13. BIOAKUMULACE: PRŮTOKOVÁ ZKOUŠKA NA RYBÁCH****1. METODA**

Tato bioakumulační metoda je replikou metody OECD TG 305 (1996).

1.1. ÚVOD

V této metodě je popsán postup pro charakterizaci schopnosti látek bioakumulovat se v rybách za průtokových podmínek. Ačkoliv jsou průtokové režimy preferovány, přípouštějí se i semistatické režimy, jsou-li splněna kritéria validace.

V metodě jsou dostatečně popsány podrobnosti pro provedení zkoušky, přičemž je poskytnuta dostatečná volnost pro přizpůsobení experimentálního uspořádání podmínkám v jednotlivých laboratořích a různým vlastnostem zkoušených látek. Metoda je neefektivnější pro stabilní organické chemikálie s hodnotou $\log P_{ow}$ od 1,5 do 6,0 (1), ale může být také použita na superlipofilní látky (s hodnotou $\log P_{ow} > 6,0$). Předběžně odhadnutý bioakumulační faktor (BCF), někdy označovaný jako K_B bude pro takové superlipofilní látky pravděpodobně vyšší než hodnota bioakumulačního faktoru v ustáleném stavu (BCF_{US}), která je očekávána z laboratorních experimentů. Předběžné odhady pro organické látky s hodnotou $\log P_{ow}$ až asi 9,0 lze získat pomocí rovnice Binteina at al (2). Mezi parametry, které charakterizují bioakumulační potenciál, patří rychlostní konstanta příjmu (k_2), rychlostní konstanta vylučování (k_1) a BCF_{US} .

Izotopově značené zkoušené látky mohou usnadnit analýzu vzorků vody a ryb a mohou být použity v případě, že by měla být provedena identifikace a kvantifikace produktů rozkladu. Měří-li se celkový obsah radioaktivního zbytku (například po spálení nebo solubilizaci tkáně), je hodnota BCF založena na výchozí sloučenině, všech zadržených metabolitech a také na asimilovaném uhlíku. Hodnoty BCF založené na celkovém obsahu radioaktivního zbytku tedy nemohou být přímo srovnatelné s hodnotou BCF získanou specifickou chemickou analýzou pouze výchozí sloučeniny.

V izotopových studiích mohou být pro stanovení BCF výchozí sloučeniny zařazeny čisticí postupy, a je-li to považováno za nezbytné, mohou být charakterizovány hlavní metabolity. Je možné rovněž kombinovat studii metabolismu ryb se studií bioakumulace analýzou a identifikací zbytků v tkáních.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Biokoncentrace/bioakumulace je nárůst koncentrace zkoušené látky v organismu (v jeho specifikované tkáni) nebo na něm vzhledem ke koncentraci zkoušené látky v okolním médiu.

Bioakumulační faktor (BCF or K_B) je koncentrace zkoušené látky v rybách nebo na nich nebo v jejich specifikovaných tkáních (C_r as $\mu\text{g/g}$ (ppm)) dělená koncentrací chemikálie v okolním médiu (C_w as $\mu\text{g/ml}$ (ppm)), a to kdykoliv ve fázi příjmu při této zkoušce.

▼ B

Bioakumulační faktor v ustáleném stavu (BCF_{US} nebo K_B) se po dlouhou dobu výrazně nemění; koncentrace zkoušené látky v okolním médiu je po tuto dobu konstantní.

Plató nebo ustálený stav je stav dosažený tehdy, je-li při grafickém znázornění křivka časové závislosti koncentrace zkoušené látky v rybách (C_T) rovnoběžná s časovou osou a tři po sobě jdoucí analýzy C_T vzorků odebraných v intervalech alespoň dvou dnů se neliší více než o $\pm 20\%$ a není-li mezi těmito třemi dobami odběru žádný výrazný rozdíl. Analyzují-li se spojené vzorky, požadují se čtyři po sobě jdoucí analýzy. v případě zkoušených látek, jejichž příjem probíhá pomalu, jsou vhodnější sedmidenní intervaly.

Bioakumulační faktory vypočtené přímo z kinetických rychlostních konstant (k_1/k_2) se nazývají kinetické akumulační faktory (BCF_K).

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (P_{ow}) je rovnovážný poměr mezi rozpustností chemikálie v n-oktanolu a ve vodě (metoda A.8) a označuje se také jako K_{ow} . Logaritmus hodnoty P_{ow} se používá jako ukazatel potenciálu chemikálie bioakumulovat se ve vodních organismech.

Expozice nebo fáze příjmu je časový úsek, během něhož jsou ryby vystaveny působení zkoušené chemikálie.

Rychlostní konstanta příjmu (k_1) je číselná hodnota definující rychlost nárůstu koncentrace zkoušené látky v testovacích rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních), jsou-li ryby této chemikálii vystaveny (k_1 se vyjadřuje v jednotce/den).

Poexpoziční nebo vylučovací fáze je časový úsek po přemístění testovacích ryb z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které tuto látku neobsahuje, během něhož se studuje vylučování látky z testovacích ryb (nebo její čistý úbytek v nich).

Rychlostní konstanta vylučování (k_2) je číselná hodnota definující rychlost poklesu koncentrace zkoušené látky v testovacích rybách (nebo v jejich specifikovaných tkáních) po jejich přemístění z média obsahujícího zkoušenou látku do média, které tuto látku neobsahuje (k_2 se vyjadřuje v jednotce/den).

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Zkouška má dvě fáze: fázi expozice (příjem) a poexpoziční fázi (vylučování). Během fáze příjmu jsou dvě oddělené skupiny ryb stejného druhu vystaveny alespoň dvěma koncentracím zkoušené látky. Poté jsou přemístěny do média, které zkoušenou látku neobsahuje, aby začala fáze vylučování. Fáze vylučování je vždy nezbytná, není-li příjem látky během fáze příjmu nevýznamný (např. je-li BCF menší než 10). Koncentrace zkoušené látky v rybách nebo na nich (nebo v jejich specifikovaných tkáních) se sleduje v průběhu obou fází zkoušky. Vedle těchto dvou zkušebních koncentrací se za stejných podmínek, s výjimkou přítomnosti zkoušené látky, udržuje kontrolní skupina ryb, aby mohly být na odpovídající kontrolní skupině porovnány možné nepříznivé účinky pozorované při bioakumulačních zkouškách a aby byly získány koncentrace zkoušené látky v pozadí.

▼ B

Fáze příjmu trvá 28 dnů, není-li prokázáno, že je rovnováhy dosaženo dříve. Délku fáze příjmu a dobu potřebnou k ustavení rovnovážného stavu lze předpovědět pomocí rovnice v příloze 3. Fáze vylučování poté začne po přemístění ryb do jiné nádrže bez zkoušené látky. Je-li to možné, vypočítají se bioakumulační faktory nejlépe jako poměr (BCF_{US}), tj. poměr koncentrace v rybách (C_r) a ve vodě (C_w) ve zřetelném rovnovážném stavu, a jako kinetický bioakumulační faktor BCF_K , tj. poměr rychlostních konstant příjmu (k_1) a vylučování (k_2) za předpokladu kinetiky prvního řádu. Neřídí-li se zjevně naměřené hodnoty kinetikou prvního řádu, měl by být použit složitější model (dodatek 5).

Nedojde-li k ustálenému stavu do 28 dnů, měla by být fáze příjmu prodloužena do jeho dosažení nebo na 60 dnů, podle toho, co nastane dříve; poté začne fáze vylučování.

Rychlostní konstanta příjmu, rychlostní konstanta (nebo konstanty, jsou-li použity složitější modely) vylučování (úbytku), bioakumulační faktor a , je-li to možné, intervaly spolehlivosti každého z těchto parametrů se vypočítají z modelu, který popisuje naměřené koncentrace zkoušené látky v rybách a ve vodě.

Faktor BCF se vyjadřuje jako funkce celkové živé hmotnosti ryby. Pro zvláštní účely však mohou být použity specifikované tkáně nebo orgány (např. svalovina, játra), je-li ryba dostatečně velká nebo je-li možné ji rozdělit na jedlý (vykostěný) podíl a nejedlý podíl (vnitřnosti). Vzhledem k tomu, že u mnoha organických látek existuje zřetelný vztah mezi schopností bioakumulace a lipofilností, existuje také odpovídající vztah mezi obsahem tuku v testovacích rybách a pozorovanou bioakumulací takové látky. Aby se tedy snížilo kolísání výsledků pro tyto látky s vysokou lipofilností (tj. s $\log P_{ow} > 3$), měla by být bioakumulace vztažena vedle celkové hmotnosti těla také k obsahu tuku.

Obsah tuku by měl být stanoven pokud možno na stejném biologickém materiálu, jaký je použit ke stanovení koncentrace zkoušené látky.

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Před prováděním zkoušek bioakumulace by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

- rozpustnost ve vodě,
- rozdělovací koeficient n-oktanol/voda P_{ow} (označovaný také jako K_{ow} , stanovený metodou HPLC, viz A.8),
- hydrolýza,
- fototransformace ve vodě stanovená ozářením slunečním nebo simulovaným slunečním světlem za podmínek zkoušky bioakumulace (3),

▼ B

- povrchové napětí (u látek, u nichž nelze stanovit $\log P_{ow}$),
- tlak par,
- v případě potřeby „snadná“ biologická rozložitelnost.

Další požadovanou informací je toxicita pro druh ryby, který má být použit, nejlépe asymptotická hodnota LC_{50} (tj. časově nezávislá). K dispozici musí být vhodná analytická metoda o známé přesnosti a citlivosti pro kvantitativní stanovení zkoušené látky ve zkušebních roztocích a v biologickém materiálu a dále podrobnosti o přípravě a uchovávání vzorků. Měly by být také známy meze stanovitelnosti zkoušené látky jak ve vodě, tak v rybích tkáních. Je-li použita zkoušená látka značená ^{14}C , měla by být známá aktivita nečistot vyjádřená v procentech.

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Aby byla zkouška platná, měly by být splněny tyto podmínky:

- kolísání teploty je menší než ± 2 °C,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení,
- koncentrace zkoušené látky v nádrži je udržována v intervalu ± 20 % kolem střední hodnoty naměřených hodnot během fáze příjmu,
- mortalita nebo jiné nepříznivé účinky a choroby jak u kontrolních, tak u exponovaných ryb je na konci zkoušky menší než 10 %; jestliže je zkouška prodloužena na několik týdnů nebo měsíců, měl by být úhyn nebo jiné nepříznivé účinky v obou skupinách ryb menší než 5 % za měsíc nebo by neměl překročit celkem 30 %.

1.6. REFERENČNÍ SLOUČENINY

Použití referenčních sloučenin o známém bioakumulačním potenciálu by mohlo být užitečné pro kontrolu experimentálního postupu. Zatím však ještě nelze doporučit žádné specifické látky.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. *Přístroje a pomůcky*

U všech částí zařízení je třeba se vyhýbat použití materiálů, které se mohou rozpouštět, sorbovat nebo vyluhovat a mají nepříznivý účinek na ryby. Lze použít standardní pravouhlé nebo válcové nádrže vyrobené z inertního materiálu a mající vhodný objem s ohledem na náplň. Použití měkkých trubek z plastu by mělo být minimalizováno. Měly by být použity trubky z teflonu ®, z korozivzdorné oceli a/nebo ze skla. Zkušební ukázaly, že pro látky s vysokými absorpčními koeficienty, jako jsou syntetické pyrethroidy, je nutné použít silanizované sklo. V těchto případech musí být zařízení po použití zlikvidováno.

▼ B1.7.2. *Voda*

Ke zkoušce se používá přírodní voda, která by měla být získána z nekontaminovaného zdroje stálé kvality. Ředící voda musí mít kvalitu, která umožní přežití zvoleného druhu ryby po dobu aklimatizace a v průběhu fází zkoušky, aniž by vykazoval abnormální vzhled nebo chování. V ideálním případě by mělo být prokázáno, že testovací druh může v ředící vodě přežít, růst a rozmnožovat se (např. zkouškou s laboratorní kulturou nebo zkouškou toxicity během životního cyklu). Voda by měla být charakterizována alespoň hodnotou pH, tvrdostí, celkovým obsahem pevných látek, celkovým obsahem organického uhlíku a podle možnosti také obsahem amoniaku a dusičnanů, alkalitou a v případě mořských druhů salinitou. Všechny parametry, které jsou důležité pro optimální prospívání ryb, jsou známy; v příloze I jsou přesto uvedeny doporučené maximální koncentrace pro řadu parametrů sladké a mořské vody.

Voda by měla mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,0 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než $\pm 0,5$. Pro ujištění, že voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav obsádky ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředící vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců).

Celkový přirozený obsah částic a rovněž obsah organického uhlíku (TOC) v ředící vodě by měl být co nejnižší, aby nedošlo k adsorpci zkoušené látky na organických látkách, což může snížit její biologickou dostupnost (4). Maximální přijatelná hodnota je 5 mg/l pro částice (sušina zachycená filtrem 0,45 μm) a 2 mg/l pro celkový organický uhlík (viz dodatek 1). Je-li to nezbytné, měla by být voda před použitím filtrována. Příspěvek k obsahu organického uhlíku od testovacích ryb (exkrekty) a ze zbytků potravy by měl být co nejmenší. V průběhu zkoušky by neměla koncentrace organického uhlíku ve zkušební nádrži překročit koncentraci organického uhlíku pocházejícího ze zkoušené látky a ze solubilizačního činidla, je-li použito, o více než 10 mg/l ($\pm 20\%$).

1.7.3. *Zkušební roztoky*

Zásobní roztok zkoušené látky se připraví ve vhodné koncentraci. Zásobní roztok by měl být připraven nejlépe jednoduchým smícháním nebo protřepáním zkoušené látky s ředící vodou. Použití rozpouštědel nebo dispersantů (solubilizačních činidel) se nedoporučuje; v některých případech však může být pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Rozpouštědly, která mohou být použita, jsou ethanol, methanol, ethylenglykol-monomethylester, ethylenglykol-dimethylester, dimethylformamid a triethylenglykol. Dispersanty, které mohou být použity, jsou Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky odbouratelná činidla je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Zkoušená látka může být značena radioaktivními izotopy a měla by být nejvyšší čistoty (např. > 98 %).

▼ B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění koncentrací zkoušené látky nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. měřicí čerpadlo, proporcionální ředění, saturační systém). Přijatelná je výměna nejlépe pěti objemů v každé zkušební nádrži za den. Upřednostňuje se průtokový režim, není-li to však možné (např. jsou-li testovací organismy nepříznivě ovlivňovány), může být použita semistatická technika za předpokladu, že jsou splněna kritéria validity. Rychlosti průtoku zásobního roztoku a ředící vody by měly být kontrolovány jak 48 hodin před zkouškou, tak poté alespoň denně během zkoušky. Tato kontrola by měla zahrnovat stanovení rychlosti průtoku v každé testovací nádrži a měla by zajistit, aby se rychlost průtoku neměnila o více než 20 % v rámci jedné nádrže nebo mezi nádržemi.

1.7.4. *Výběr druhů*

Důležitými kritérii pro výběr druhu jsou jeho dostupnost, možnost získat jej ve vyhovující velikosti a jeho bezproblémové udržování v laboratoři. Dalšími kritérii pro výběr druhu ryb jsou jeho rekreační, komerční a ekologický význam a rovněž srovnatelná citlivost, úspěšné dřívější použití atd.

Doporučené druhy jsou uvedeny v příloze 2. Mohou být použity i jiné druhy, avšak zkušební postup musí být upraven, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.7.5. *Chov ryb*

Obsádka ryb se nechá aklimatizovat alespoň dva týdny při zkušební teplotě a krmí se odpovídající stravou stejného typu jako v průběhu zkoušky.

Po 48 hodinách aklimatizace se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

- úhyn vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,
- úhyn 5 až 10 % populace za sedm dnů: nechat aklimatizovat dalších sedm dnů,
- úhyn nižší než 5 % populace za sedm dnů: násada se přijímá; dojde-li během dalších sedmi dnů k úhynu vyššímu než 5 %, celá obsádka se vymění.

Zajistí se, aby ryby použité pro zkoušku nevykazovaly pozorovatelné nemoci a abnormality. Všechny nemocné ryby se vymění. Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny u ryb žádné nemoci.

▼ B

1.8. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.8.1. *Předběžná zkouška*

Může být užitečné provést předběžný experiment s cílem optimalizovat zkušební podmínky konečné zkoušky, např. výběr koncentrace (koncentraci) zkoušené látky, délka fáze příjmu a fáze vylučování.

1.8.2. *Podmínky expozice*

1.8.2.1. Délka fáze příjmu

Předpověď délky fáze příjmu lze získat z praktických zkušeností (např. z dřívější studie nebo podle chemikálie podobné akumulace) nebo z určitých empirických vztahů využívajících znalostí buď rozpustnosti ve vodě, nebo rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda pro zkoušenou látku (viz dodatek 3).

Fáze příjmu trvá 28 dnů, není-li prokázáno, že je rovnováhy dosaženo dříve. Nedosáhne-li se ustáleného stavu do 28 dnů, měla by být fáze příjmu prodloužena do jeho dosažení, přičemž se provádějí další měření, nebo na 60 dnů, podle toho, co nastane dříve.

1.8.2.2. Délka fáze vylučování

Doba odpovídající polovině délky fáze příjmu je obvykle dostatečná k tomu, aby se přiměřeně snížil (např. o 95 %) obsah látky v organismu (vysvětlení odhadu – viz dodatek 3). Jestliže doba nezbytná pro dosažení 95 % úbytku je neprakticky dlouhá, překračuje například dvakrát běžnou délku fáze příjmu (tj. více než 56 dnů), může být použita kratší doba (tj. dokud není koncentrace zkoušené látky menší než 10 % koncentrace v rovnovážném stavu). V případě látek se složitějším charakterem příjmu a vylučování, než jaký představuje model ryby s jedním kompartmentem řídícím se kinetikou prvního řádu, však delší fáze vylučování umožní stanovit rychlostní konstanty úbytku. Délka fáze však může být určena dobou, po kterou zůstává koncentrace zkoušené látky v rybách nad mezí detekce analytické metody.

1.8.2.3. Počty testovacích ryb

Počet ryb na jednu zkušební koncentraci se zvolí tak, aby byly pro každý odběr k dispozici nejméně čtyři ryby na jeden vzorek. Je-li požadována větší statistická váha, budou pro vzorek nezbytná větší množství ryb.

Použijí-li se pohlavně dospělé ryby, uvede se, zda byly v experimentu použity samice nebo samci nebo obojí. Jsou-li použita obě pohlaví, mělo by být před započítáním expozice prokázáno, že rozdíl v obsahu lipidů mezi oběma pohlavími není významný; oddělení samců a samic může být nezbytné.

▼ B

V každé zkoušce se vyberou ryby podobné hmotnosti, tak aby hmotnost nejmenší z nich nebyla nižší než dvě třetiny hmotnosti největší ryby. Všechny by měly být stejného stáří a měly by pocházet ze stejného zdroje. Vzhledem k tomu, že stáří a hmotnost ryby mají zřejmě často významný vliv na hodnoty BCF (1), musí být tyto podrobnosti přesně zaznamenány. Doporučuje se zvážit před zkouškou dílčí vzorek obsádky ryb s cílem odhadnout střední hmotnost.

1.8.2.4. N á s a d a

Volí se vysoký poměr množství vody k množství ryb, aby se minimalizovalo snížení koncentrace C_w způsobené přidáním ryb na začátku zkoušky, a také proto, aby nedošlo k poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku. Je důležité, aby rychlost nasazování byla přiměřená použitému druhu. V každém případě se obvykle doporučuje rychlost nasazování 0,1 až 1,0 g ryb (živá hmotnost) na litr vody za den. Vysoká rychlost nasazování může být zvolena, je-li prokázáno, že požadovaná koncentrace zkoušené látky může být udržována v mezích $\pm 20\%$ a že koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesne pod 60 % nasycení.

Při volbě režimu nasazování má být přihlédnuto k obvyklému přirozenému prostředí ryb. Například ryby žijící u dna mohou vyžadovat při stejném objemu vody větší plochu dna než pelagické druhy ryb.

1.8.2.5. K r m e n í

Během aklimatizace a po dobu zkoušky se ryby krmí vhodnou stravou se známým obsahem tuku a celkových bílkovin podávanou v množství dostatečném pro udržení zdravého stavu a pro udržení tělesné hmotnosti. Ryby se krmí denně v průběhu aklimatizace a po dobu zkoušky množstvím přibližně 1 až 2 % tělesné hmotnosti; tím se udrží v průběhu zkoušky obsah tuku u většiny druhů ryb na relativně konstantní úrovni. Množství krmiva by mělo být například jednou týdně nově přepočítáno, aby byla udržena odpovídající tělesná hmotnost a obsah tuku. Hmotnost ryb v každé nádrži může být pro tento výpočet odhadnuta z hmotnosti ryb naposledy odebraných z dotyčné nádrže. Ryby, které zůstaly v nádrži, se neváží.

Nezkrmená potrava a exkřety se odstraňují z nádrží odsátím denně krátce po krmení (30 minut až 1 hodina). Nádrže se udržují v celém průběhu zkoušky v co nejvyšší čistotě, aby byla koncentrace organických látek co nejnižší, neboť přítomnost organického uhlíku může snižovat biologickou dostupnost zkoušené látky (1).

Poněvadž mnoho krmiv pochází z rybí moučky, mělo by být krmivo analyzováno na přítomnost zkoušené látky. Je rovněž žádoucí, aby bylo krmivo analyzováno na přítomnost pesticidů a těžkých kovů.

▼B

1.8.2.6. Světlo a teplota

Fotoperioda je obvykle 12 až 16 hodin a teplota (± 2 °C) by měla odpovídat testovacímu druhu (viz dodatek 2). Druh a charakteristiky osvětlení by měly být známy. Měla by být věnována pozornost možné fototransformaci zkoušené látky za světelných podmínek studie. Mělo by být použito vhodné osvětlení, aby ryby nebyly vystaveny fotoproduktům nevyskytujícím se v přírodě. V některých případech může být vhodné použít filtr pro odfiltrování UV záření s vlnovou délkou kratší než 290 nm.

1.8.2.7. Zkušební koncentrace

Ryby jsou vystaveny za průtokových podmínek alespoň dvěma koncentracím zkoušené látky ve vodě. Vyšší (nejvyšší) koncentrace zkoušené látky se obvykle volí tak, aby byla na úrovni 1 % její asymptotické hodnoty akutní LC_{50} a aby byla desetkrát vyšší než je mez detekce této látky ve vodě při použité analytické metodě.

Nejvyšší zkušební koncentraci lze také stanovit dělením akutní 96hodinové LC_{50} příslušným poměrem akutní/chronická letální dávka (u některých chemikálií může koeficient ležet mezi 3 a 100). Je-li to možné, volí se další koncentrace tak, aby se lišila od výše uvedené faktorem 10. Není-li to možné z důvodu kritéria 1 % z LC_{50} nebo z důvodu kritéria meze detekce, může být použit nižší faktor než 10 nebo by mělo být zváženo použití zkoušené látky značené ^{14}C . Žádná koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky.

Je-li použito solubilizační činidlo, neměla by jeho koncentrace být vyšší než 0,1 ml/l a mělo by být stejné ve všech zkušebních nádržích. Jeho příspěvek, společně s příspěvkem zkoušené látky, k celkovému obsahu organického uhlíku ve zkušební vodě by měl být znám. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

1.8.2.8. Kontrolní experimenty

Vedle zkušební série by měl být proveden kontrolní experiment s ředící vodou, která popřípadě obsahuje solubilizační činidlo, pokud bylo zjištěno, že toto činidlo nemá na ryby žádné účinky. Není-li tomu tak, měly by být provedeny oba kontrolní experimenty.

1.8.3. Četnost měření kvality vody

V průběhu zkoušky by mělo být v každé nádrži měřeno množství rozpuštěného kyslíku, TOC, pH a teplota. Celková tvrdost a popřípadě salinita by měly být měřeny v kontrolních experimentech a v jedné nádrži s vyšší (nejvyšší) koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a popřípadě salinita by měly být měřeny alespoň třikrát – na začátku, přibližně uprostřed a na konci fáze příjmu – a jednou týdně ve fázi vylučování. Hodnota TOC by měla být měřena na začátku zkoušky (24 hodin a 48 hodin před započetím fáze příjmu) před nasazením ryb a alespoň jednou týdně jak v průběhu fáze příjmu, tak v průběhu fáze vylučování. Teplota by měla být měřena denně, pH na začátku a na konci každé fáze a tvrdost vody jednou v průběhu zkoušky. Teplota by měla být měřena nejlépe nepřetržitě alespoň v jedné nádrži.

▼B1.8.4. *Odběr vzorků a analýza ryb a vody*1.8.4.1. *Časový rozvrh odebírání vzorků ryb a vody*

Voda ze zkušebních nádrží se pro stanovení koncentrace zkoušené látky odebírá před nasazením ryb a během fáze příjmu i během fáze vylučování. Voda se odebírá alespoň ve stejnou dobu jako ryby a před krmením. Během fáze příjmu se stanovují koncentrace zkoušené látky, aby se ověřilo, že jsou v souladu s kritérii validity.

Ryby se odebírají alespoň pětkrát během fáze příjmu a alespoň čtyřikrát během fáze vylučování. Vzhledem k tomu, že v mnoha případech bude obtížné s tímto počtem vzorků vypočítat rozumně přesný odhad hodnoty BCF, zejména jde-li o jinou než jednoduchou kinetiku prvního řádu, může být účelné odebírat vzorky v obou fázích častěji (viz dodatek 4). Dodatečné vzorky se uloží a analyzují až poté, co se výsledky prvního kola analýz ukáží jako nedostatečné pro výpočet hodnoty BCF o požadované přesnosti.

Příklad přijatelného časového rozvrhu odběru vzorků je uveden v příloze 4. Jiné plány lze snadno odvodit pomocí jiné předpokládané hodnoty P_{ow} , s níž se vypočítá expoziční doba pro 95 % příjem.

V odběru vzorků se pokračuje během fáze příjmu do dosažení ustáleného stavu nebo po dobu 28 dnů, podle toho, co nastane dříve. Není-li ustáleného stavu dosaženo do 28 dnů, v odběru vzorků se pokračuje do ustávení ustáleného stavu nebo do 60 dnů, podle toho, co nastane dříve. Před zahájením fáze vylučování se ryby přemístí do čistých nádrží.

1.8.4.2. *Odběr vzorků a příprava vzorků*

Vzorky vody pro analýzy se odebírají například odsáváním potrubím z inertního materiálu ze středu zkušební nádrže. Vzhledem k tomu, že se biologicky nedostupná frakce zkoušené látky nedá často oddělit od biologicky dostupné frakce ani filtrací, ani odstředěním (zejména v případě superlipofilních chemikálií, tj. chemikálií s $\log P_{ow} > 5$) (1, 5), nemohou být vzorky takto zpracovány.

Namísto toho je třeba učinit opatření pro to, aby byly nádrže udržovány co nejčistší, a obsah organického uhlíku by měl být pravidelně monitorován jak během fáze příjmu, tak během fáze vylučování.

Při každém odběru se z nádrží odebere vhodný počet ryb (obvykle alespoň čtyři). Odebrané ryby se rychle omyjí pod tekoucí vodu, důkladně se osuší, ihned se usmrtí nejhodnější humánní metodou a zváží se.

Ryby a voda se pokud možno analyzují ihned po odběru s cílem předejít degradaci nebo ztrátám a vypočítat přibližné rychlosti příjmu a vylučování ještě v průběhu zkoušky. Okamžitá analýza rovněž zabrání opožděnému stanovení platů při jeho dosažení.

▼ B

Neprovádí-li se analýza okamžitě, vzorky se vhodným způsobem uchovávají. Před zahájením studie je třeba zjistit informace o řádné metodě uchovávání vzorků s ohledem na dotyčnou zkoušenou látku – například hluboké zmrazení, udržování při 4 °C, délka uchovávání, vyluhování atd.

1.8.4.3. Kvalita analytické metody

Vzhledem k tomu, že celý postup je určen hlavně správností, přesností a citlivostí analytické metody použité pro analýzu zkoušené látky, je třeba experimentálně kontrolovat, že přesnost a reprodukovatelnost chemické analýzy a rovněž výtěžek zkoušené látky jak z vody, tak ze vzorků ryb jsou pro danou analytickou metodu dostatečné. Kontroluje se také, zda se zkoušená látka nevyškyluje v použité ředící vodě.

Hodnoty C_w and C_r se podle potřeby korigují na výtěžky a hodnoty pozadí v kontrolních experimentech. Vzorky ryb a vody se zpracovávají tak, aby se minimalizovala kontaminace a ztráty (např. v důsledku adsorpce odběrným zařízením).

1.8.4.4. Analýza vzorků ryb

Je-li ve zkoušce použit materiál značený radioizotopy, je možné provést analýzu na celkovou aktivitu (tj. pro výchozí látku i s metabolity) nebo lze provést separaci, tak aby mohla být výchozí látka analyzována samostatně. Také hlavní metabolity mohou být charakterizovány v rovnovážném stavu nebo na konci fáze příjmu, podle toho, k čemu dojde dříve. Je-li hodnota BCF vyjádřená celkovou aktivitou reziduí $\geq 1\ 000$ %, může být účelné, a pro určité kategorie chemikálií, např. pesticidy, se to důrazně doporučuje, identifikovat a kvantifikovat produkty rozkladu představující ≥ 10 % celkového množství reziduí v tkáních ryb v ustáleném stavu. Jsou-li produkty rozkladu představující ≥ 10 % celkových značených reziduí identifikovány a kvantifikovány, doporučuje se také identifikovat a kvantifikovat produkty rozkladu ve zkušební vodě.

Koncentrace zkoušené látky by měla být obvykle stanovena pro každou jednotlivou zváženou rybu. Není-li to možné, mohou být vzorky při každém odběru sdružovány, avšak sdružování omezuje statistické postupy, které lze na údaje aplikovat. Pokud je důležitý určitý statistický postup a statistická váha, měl by být ve zkoušce nasazen přiměřený počet ryb vyhovující požadovanému sdružování a statistické váze (6, 7).

Hodnota BCF by měla být vyjádřena jako funkce celkové hmotnosti a v případě lipofilních látek také jako funkce obsahu lipidů. Obsah lipidů v rybách se stanoví pokud možno při každém odběru. Pro stanovení obsahu lipidů by měla být použita vhodná metoda (odkazy 8 a 2 v příloze 3). Jako standardní metoda může být doporučena technika extrakce směsí chloroform a methanol (9). Různé metody neposkytují stejné hodnoty (10), a proto je důležité uvést podrobnosti o použité metodě. Je-li to možné, měla by být analýza lipidů provedena na extraktu připraveném pro analýzu zkoušené látky, neboť lipidy musí být často před chromatografickou analýzou odstraněny. Obsah lipidů v rybách (v mg/kg živé hmotnosti) na konci experimentu by se neměl lišit od jejich obsahu na počátku o více než ± 25 %. Měl by být uveden také podíl pevných látek v tkáních, aby bylo možné provést přepočítání koncentrace tuků z živé hmotnosti na sušinu.

▼ B**2. ÚDAJE****2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Křivka příjmu zkoušené látky se sestrojí vynesením její koncentrace v rybách nebo na nich (nebo ve specifikovaných tkáních) v průběhu fáze příjmu proti času v lineárním měřítku. Dosáhla-li křivka platů, tj. pokud začíná být rovnoběžná s časovou osou, vypočítá se hodnota BCF_{us} v rovnovážném stavu z poměru:

$$\frac{C_r \text{ v ustáleném stavu (střední hodnota)}}{C_v \text{ v ustáleném stavu (střední hodnota)}}$$

Není-li dosaženo ustáleného stavu, je možné vypočítat hodnotu BCF_{us} s dostatečnou přesností pro posouzení rizika z ustáleného stavu při 80 % ($1,6/k_2$) nebo 95 % ($3,0/k_2$) rovnováže.

Také akumulční faktor (BCF_K) se stanoví jako poměr dvou rychlostních konstant prvního řádu k_1/k_2 . Rychlostní konstanta vylučování (k_2) se obvykle stanoví z křivky vylučování (tj. grafu poklesu koncentrace zkoušené látky v rybách v čase). Rychlostní konstanta příjmu se poté vypočte pomocí hodnoty (k_1) k_2 a hodnoty C_r odvozené z křivky příjmu (viz také dodatek 5). Upřednostňovanou metodou pro získání hodnoty BCF_K a rychlostních konstant k_1 a k_2 je metoda nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače (11). K výpočtu hodnot k_1 a k_2 lze jinak použít grafické metody. Není-li zjevně křivka vylučování křivkou prvního řádu, měly by být použity složitější modely (viz odkazy v příloze 3) a měl by být konzultován biostatistik.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že se naměřené koncentrace zkoušených roztoků pohybují na úrovních blízkých mezi detekce analytické metody.

Jasně vymezené křivky příjmu a úbytku jsou ukazatelem dobré kvality údajů o bioakumulaci. Rozdíl konstant příjmu a vylučování pro dvě zkušební koncentrace by měl být nižší než 20 %. Pozorované významné rozdíly v rychlostech příjmu a vylučování mezi dvěma použitými zkušebními koncentracemi by měly být zaznamenány a mělo by být uvedeno jejich možné vysvětlení. Interval spolehlivosti hodnot BCF u dobře navržených studií se obecně blíží ± 20 %.

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

3.1. ZKOUŠENÁ LÁTKA

- fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,
- chemické identifikační údaje (včetně obsahu organického uhlíku, je-li to třeba),
- v případě značení radioaktivními izotopy jejich přesná poloha a aktivita nečistot, vyjádřená v procentech.

▼ B

3.2. TESTOVACÍ DRUH

- vědecký název, kmen, zdroj, případné předběžné ošetření, aklimatizace, stáří, rozmezí velikostí atd.

3.3. ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY:

- použitý zkušební postup (např. průtokový nebo semistatický),
- typ a charakteristiky použitého osvětlení a fotoperioda (fotoperiody),
- uspořádání zkoušky (např. počet a velikost zkušebních nádrží, rychlost výměny objemu vody, počet opakování, počet ryb v jednom opakování, počet zkušebních koncentrací, délka fází příjmu a vylučování, četnost odběru vzorků ryb a vzorků vody),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost jejich obnovování (je-li použito solubilizační činidlo, musí být uvedena jeho koncentrace a jeho příspěvek k obsahu organického uhlíku ve vodě),
- nominální zkušební koncentrace, střední hodnoty naměřených koncentrací ve zkušebních nádržích, jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení,
- zdroj ředící vody, popis jakékoli předchozí úpravy, výsledky jakéhokoli prokazování schopnosti zkušebních ryb žít v této vodě a charakteristiky vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,
- kvalita vody ve zkušebních nádržích, hodnota pH, tvrdost vody, obsah TOC, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,
- podrobné informace o krmení (například typ krmiva, zdroj, složení – alespoň pokud možno obsah lipidů a bílkovin, podávané množství a četnost),
- informace o zpracování vzorků ryb a vody, včetně podrobností o přípravě, uchovávání, o extrakci a analytických postupech (a přesnosti), pokud jde o zkoušenou látku a obsah tuku (je-li měřen).

3.4. VÝSLEDKY:

- výsledky jakýchkoli provedených předběžných studií,
- úhyn kontrolních ryb a ryb v každé expoziční nádrži a jakékoli pozorované neobvyklé chování,
- obsah lipidů v rybách (je-li stanoven při zkoušce),
- křivky (včetně všech naměřených údajů) příjmu a vylučování zkoušené chemikálie rybami, doba dosažení ustáleném stavu,

▼B

- hodnoty C_r a C_v (popřípadě se směrodatnými odchylkami a rozpětím) pro všechny odběry (hodnota C_r se vyjadřuje v $\mu\text{g/g}$ živé hmotnosti (ppm) celého těla nebo specifikovaných tkání, např. lipidů, a C_v se vyjadřuje v $\mu\text{g/ml}$ (ppm)); hodnoty C_v pro kontrolní experimenty (měly by být uvedeny také hodnoty pozadí),
- bioakumulační faktor v ustáleném stavu (BCF_{us}) a/nebo kinetický akumulační faktor (BCF_k) a popřípadě 95 % meze spolehlivosti pro rychlostní konstanty příjmu a vylučování (úbytku) (vše vztaženo na celý organismus a na celkový obsah lipidů v rybě, je-li stanoven, nebo na její specifikované tkáně), intervaly spolehlivosti a směrodatné odchylky (jsou-li k dispozici) a metody výpočtu nebo analýzy údajů pro každou použitou koncentraci zkoušené látky,
- v případě použití látek značených radioaktivními izotopy a je-li to nutné, musí být uvedena akumulace jakýchkoli detekovaných metabolitů,
- všechny zvláštnosti zkoušky, všechny odchylky od těchto postupů a ostatní relevantní informace.

Výsledky typu „nedetekováno při uvedené mezi detekce“ by se měly minimalizovat předběžným vývojem metod a uspořádáním experimentu, neboť takové výsledky nelze pro výpočet rychlostních konstant použít.

4. LITERATURA

- 1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, str. 117–156.
- 2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 1, 29–390.
- 3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.
- 4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support 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, The Netherlands.

▼B

- 9) Gardner et al, (1995) *Limn. & Oceanogr.* 30, 1099–1105.
- 10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* 10, str. 1431–1436.
- 11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

DODATEK 1

Chemické charakteristiky přijatelné ředící vody

	Látka	Koncentrační limit
1	Částice pevné	5 mg/l
2	Celkový obsah organického uhlíku	2 mg/l
3	Neionizovaný amoniak	1 µg/l
4	Zbytkový chlor	10 µg/l
5	Celkové organické fosforové pesticidy	50 ng/l
6	Celkové organické chlorové pesticidy a polychlorované bifenylly	50 ng/l
7	Celkový organický chlor	25 ng/l
8	Hliník	1 µg/l
9	Arsen	1 µg/l
10	Chrom	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Měď	1 µg/l
13	Železo	1 µg/l
14	Olovo	1 µg/l
15	Nikl	1 µg/l
16	Zinek	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Rtuť	100 ng/l
19	Stříbro	100 ng/l



DODATEK 2

Doporučené druhy ryb pro zkoušení

	Doporučený druh	Doporučené rozpětí teploty při zkoušce (°C)	Doporučená celková délka těla testovacích jedinců (cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) danio pruhované	20–25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), stěvle	20–25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus), kapr obecný	20–25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel), halančík japonský	20–25	4,0 ± 1,0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters), živorodka duhová	20–25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque Linnaeus), slunečnice	20–25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum), pstruh duhový	13–17	8,0 ± 4,0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus), koljuška tříostná	18–20	3,0 ± 1,0

⁽¹⁾ Meyer A., Orti G. (1993) Proc. R. Soc. London, Ser. B., sv. 252, str. 231.

V různých zemích byly použity různé druhy estuarinních a mořských druhů, například:

ryba z čeledi Scienidae (smuhovití)	<i>Leiostomus xanthurus</i>
halančík	<i>Cyprinodon variegatus</i>
ryba z čeledi Argentiniidae (stříbrnicovití)	<i>Menidia beryllina</i>
ryba z čeledi Enbiotocidae (příbojkovití)	<i>Cymatogaster aggregata</i>
platýz z čeledi Pleuronectidae	<i>Parophrys vetulus</i>
vranka z čeledi Cottidae	<i>Leptocottus armatus</i>
koljuška tříostná	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
mořčák z čeledi Moronidae	<i>Dicentracus labrax</i>
ouklej obecná	<i>Alburnus alburnus</i>

Opatřování ryb

Sladkovodní ryby uvedené v tabulce se snadno chovají nebo jsou dobře dostupné po celý rok, zatímco dostupnost mořských nebo estuarinních ryb je omezena na určité země. Lze je množit a chovat buď v rybích farmách, nebo v laboratoři za kontrolovaných zdravotních a parazitologických podmínek tak, aby ryby byly zdravé a byly známého původu. Tyto ryby jsou dostupné v mnoha částech světa.

▼B

DODATEK 3

Předpověď délky fáze příjmu a fáze vylučování1. *Předpověď délky fáze příjmu*

Před provedením zkoušky lze získat odhad hodnoty k_2 a odtud lze získat dobu nezbytnou pro dosažení určitého stupně rovnovážného stavu (v procentech) z empirických vztahů mezi k_2 a rozdělovacím koeficientem n-oktanol/voda (P_{ov}) nebo mezi k_2 a rozpustností ve vodě (s).

Odhad hodnoty k_2 (den^{-1}) lze získat například z tohoto empirického vztahu (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10} (P_{ov}) + 1,47 \quad (r^2 = 0,95) \quad (\text{rovnice 1})$$

Další vztahy viz odkaz (2).

Není-li rozdělovací koeficient (P_{ov}) znám, lze jej odhadnout (3) ze znalosti rozpustnosti látky ve vodě (s) pomocí vztahu:

$$\log_{10} (P_{ov}) = -0,862 \log_{10} (s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,994) \quad (\text{rovnice 2})$$

kde

s = rozpustnost (v mol/l): ($n=36$).

Tyto vztahy platí pouze pro chemikálie s hodnotou $\log P_{ov}$ od 2 do 6,5 (4).

Dobu, za kterou dojde k dosažení určitého stupně rovnovážného stavu vyjádřeného v procentech, lze získat pomocí odhadu hodnoty k_2 – z obecné rovnice kinetiky popisující příjem a vylučování (kinetika prvního řádu):

$$\frac{dC_r}{dt} = k_1 \cdot C_v - k_2 \cdot C_r$$

nebo je-li C_v konstanta:

$$C_r = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_v (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{rovnice 3})$$

Pro blízký ustálený stav ($t \rightarrow \infty$), může být rovnice 3 zjednodušena (5, 6) na:

$$C_r = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_v, \text{ nebo } C_r/C_v = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Pak $(k_1/k_2) \times C_v$ je přiblížením ke koncentraci v rybách v „ustáleném stavu“ ($C_{r,s}$).

Rovnice 3 může být přepsána na rovnici:

$$C_r = C_{r,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{or} \quad \frac{C_r}{C_{r,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (\text{rovnice 4}).$$

Při použití rovnice 4 lze předpovědět dobu potřebnou k dosažení určitého stupně ustáleného stavu vyjádřeného v procentech, je-li hodnota k_2 předem odhadnuta z rovnice 1 nebo 2.

▼ B

Je pravidlem, že statisticky optimální délka fáze příjmu pro získání statisticky přijatelných údajů (BCF_K) je doba nezbytná k tomu, aby křivka sestavená vynesemím logaritmu koncentrace zkoušené látky v rybách proti času v lineárním měřítku dosáhla svého středního bodu, popřípadě $1,6/k_2$ neboli 80 % ustáleného stavu, ale ne více než $3,0/k_2$ neboli 95 % rovnovážného stavu (7).

Doba nezbytná pro dosažení 80 % ustáleného stavu je (rovnice 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ or } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (\text{rovnice 5}).$$

Podobně 95 % ustáleného stavu je dosaženo:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (\text{rovnice 6}).$$

Například délka fáze příjmu (f_p) pro zkoušenou látku s $P_{ov} = 4$ je (při použití rovnic 1, 5 a 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ den}^{-1}$$

nebo f_p (80 %) = $1,6/0,652$, tj. 2,45 dnů (59 hodin)

f_p (95 %) = $3,0/0,652$, tj. 4,60 dnů (110 hodin)

Podobně pro zkoušenou látku s hodnotou $s = 10^{-5}$ mol/l ($\log(s) = -5,0$) je délka fáze příjmu (při použití rovnic 1, 2, 5 a 6):

$$\log_{10} (P_{ov}) = -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} K_2 = 0,414 (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ den}^{-1}$$

f_p (80 %) = $1,6/0,246$, tj. 6,5 dnů (156 hodin)

nebo f_p (95 %) = $3,0/0,246$, tj. 12,2 dnů (293 hodin).

Rovnice

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ov} + 55,31 \text{ (hodin)}$$

může být eventuálně použita pro výpočet doby potřebné pro dosažení efektivního ustáleného stavu (4).

2. Předpověď délky fáze vylučování

Předpověď doby nezbytné pro snížení obsahu látky v organismu na určitou procentuální úroveň počáteční koncentrace může být rovněž získána z obecné rovnice kinetiky popisující příjem a vylučování (kinetika prvního řádu) (1, 8):

V případě fáze vylučování se C_v předpokládá rovna nule. Rovnice může být zjednodušena na rovnici:

$$\frac{dC_r}{dt} = -k_2 C_r \text{ nebo } C_r = C_{r,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

kde $C_{r,o}$ je koncentrace na počátku fáze vylučování. 50 % vyloučení bude dosaženo v čase (t_{50}):

$$\frac{C_r}{C_{r,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ nebo } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Podobně 95 % vyloučení bude dosaženo v čase

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Je-li pro první fázi zvoleno dosažení 80 % příjmu ($1,6/k_2$) a pro fázi vylučování je zvoleno dosažení 95 % úbytku ($3,0/k_2$), je délka fáze vylučování přibližně dvojnásobkem délky fáze příjmu.

Je však důležité poznamenat, že odhady jsou založeny na předpokladu, že se příjem a vylučování řídí kinetikou prvního řádu. Neřídí-li se zřejmě kinetikou prvního řádu, měly by být použity složitější modely (např. odkaz (1)).

Literatura (k příloze 3)

- 1) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* 1, str. 309–320.
- 2) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) Chiou C.T. and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 16 (1), str. 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), str. 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), str. 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 str. 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, str. 614–622.
- 8) Kōnemann H. and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, 9, str. 3–19.



DODATEK 4

Teoretický příklad plánu odběru vzorků pro bioakumulační zkoušky látek s $\log P_{ow} = 4$

Odběr vzorků ryb	Plán dob odběru vzorků		Počet vzorků vody	Počet ryb na vzorek
	Minimální požadovaná četnost (dny)	Dodatečný odběr vzorků		
Fáze příjmu	- 1 0		2 (*) 2	Přídavek 45 až 80 ryb
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
Fáze vylučování				Přenesení ryb do vody neobsahující zkoušené chemikálie
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)

(*) Odběr vzorku vody po dodání alespoň tří „objemů nádrže“.

Hodnoty v závorkách jsou počty vzorků (vody, ryb), které mají být odebrány, je-li prováděn dodatečný odběr.

Poznámka: Předběžný odhad k_2 pro $\log P_{ow}$ rovný 4,0 je $0,652 \text{ den}^{-1}$. Celková délka experimentu je stanovena na $3 \times fp = 3 \times 4,6$ dnů, tj. 14 dnů. Odhad hodnoty „fp“ viz dodatek 3.

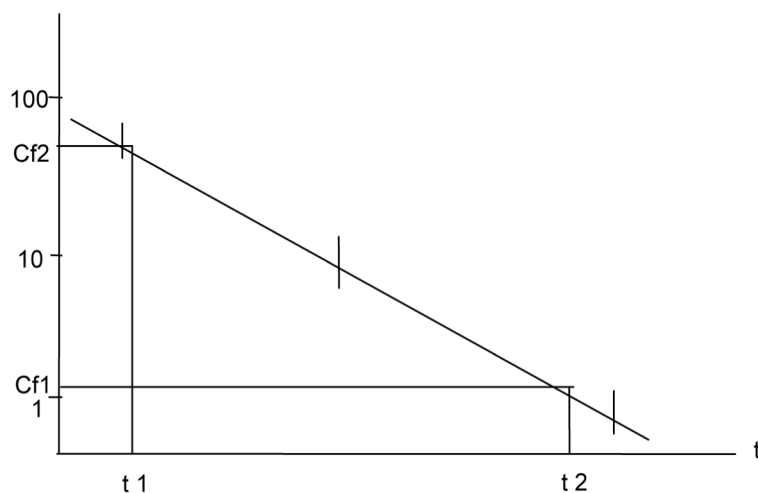
▼ B*DODATEK 5***Omezení modelu**

U většiny údajů týkajících se bioakumulace se předpokládá, že jsou „rozumně“ dobře popsány jednoduchým dvoukompartmentovým nebo dvouparametrovým modelem, jak je patrné z přímky, která je aproximací bodů pro koncentrace v rybách během fáze vylučování, je-li vynesena na semilogaritmickém papíru. (Nelze-li tyto body popsat přímkou, měl by být použit složitější model, viz například Spacie a Hamelink, odkaz 1 v příloze 3.)

Grafická metoda stanovení rychlostní konstanty vylučování (úbytku) k_2

Koncentrace zkoušené látky nalezená v každém vzorku ryb se vynesou na semilogaritmickém papíru proti času odběru vzorků. Směrnice této přímky je rovna k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{r1}/C_{r2})}{t_2 - t_1}$$



Je třeba si všimnout, že odchylky od přímky mohou znamenat složitější model vylučování, než je kinetika prvního řádu. Pro analýzu typů vylučování, které se odchylojí od kinetiky prvního řádu, mohou být použity grafické metody.

Grafická metoda stanovení rychlostní konstanty příjmu k_1

Při dané konstantě k_2 se k_1 vypočte takto:

$$k_1 = \frac{C_r k_2}{C_v \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad (\text{rovnice 1})$$

Hodnota C_r se odečte ze středního bodu hladké křivky příjmu vytvořené vynesím logaritmu koncentrace proti času (v lineárním měřítku).

▼B**Počítačová metoda výpočtu rychlostních konstant příjmu a vylučování (úbytku)**

Pro získání hodnoty bioakumulačního faktoru a rychlostních konstant k_1 a k_2 se dává přednost metodě nelineárního odhadu parametrů s využitím počítače. Těmito programy se naleznou hodnoty k_1 a k_2 založené na souboru po sobě jdoucích údajů o koncentracích a na modelu:

$$C_r = C_v \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{rovnice 2})$$

$$C_r = C_v \cdot \frac{k_1}{k_2} (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \quad (\text{rovnice 3})$$

kde t_c = čas konce fáze příjmu.

Tento přístup poskytuje odhady směrodatné odchylky k_1 and k_2 .

Vzhledem k tomu, že ve většině případů lze odhadnout k_2 z křivky vylučování s relativně vysokou přesností, a vzhledem k tomu, že mezi těmito dvěma parametry k_1 a k_2 existuje silná korelace, jsou-li odhadovány současně, může být účelné nejdříve vypočítat k_2 pouze z údajů o vylučování a následně vypočítat k_1 z údajů příjmu nelineární regresi.

▼B**C.14. RŮSTOVÁ ZKOUŠKA NA NEDOSPĚLÝCH RYBÁCH****1. METODA**

Tato metoda růstové zkoušky pro stanovení toxicity je replikou metody OECD TG 215 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška je určena k posouzení účinků dlouhodobé expozice chemickým látkám na růst nedospělých ryb. Je založena na metodě pro posouzení účinků chemických látek na růst nedospělého pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) při průtokových podmínkách, která byla vyvinuta v Evropské unii a testována v okružních testech (1, 3). Mohou být použity také jiné dobře popsání druhy. Byly například získány zkušenosti z růstových zkoušek s daniem pruhovaným (*Danio rerio*)⁽¹⁾ (2, 4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8).

Viz také Obecný úvod, část C.

1.2. DEFINICE

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): nejnižší zkušební koncentrace zkoušené látky, při níž jsou u látky pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (No Observed Effect Concentration, NOEC): zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

EC_x: pro tuto metodu koncentrace zkoušené látky, která vyvolává x % změnu rychlosti růstu ryb ve srovnání s kontrolami.

Velikost násady: živá hmotnost ryb v jednotce objemu vody.

Hustota obsádky: počet ryb v jednotce objemu vody.

Individuální specifická rychlost růstu ryby: vyjadřuje rychlost růstu jedince vycházející z jeho výchozí hmotnosti.

Průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž: vyjadřuje střední rychlost růstu populace v nádrži při určité koncentraci.

Pseudospecifická rychlost růstu: vyjadřuje rychlost růstu jednotlivce vycházející ze střední počáteční hmotnosti populace v nádrži.

⁽¹⁾ Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231–236.

▼ B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Nedospělé ryby v exponenciální fázi růstu se po zvážení umístí do zkušebních nádrží a vystaví se řadě subletálních koncentrací zkoušené látky přednostně za průtokových podmínek, nebo pokud to není možné, za vhodných semistatických podmínek (statické podmínky s obnovováním média). Zkouška trvá 28 dnů. Ryby se krmí denně. Přísun potravy se řídí počáteční hmotností ryb a může být po 14 dnech nově vypočten. Na konci zkoušky se ryby opět zváží. Účinky na rychlost růstu se analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x % změnu rychlosti růstu, tj. EC_x (např. EC₁₀, EC₂₀, nebo EC₃₀). Údaje mohou být popřípadě porovnány s hodnotami pro kontrolní skupiny s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC), a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC).

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Musí být předloženy výsledky zkoušky akutní toxicity (viz zkušební metoda C.1) provedené přednostně na druhu zvoleném pro tuto zkoušku. To znamená, že jsou známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejich par a je k dispozici vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezí stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi jsou strukturní vzorec, čistota látky, její stálost ve vodě a na světle, pK_a, P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz zkušební metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

- mortalita v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %,
- nárůst střední hodnoty hmotnosti ryb v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) musí být dostatečný na to, aby umožnil rozeznat minimální významnou změnu rychlosti růstu. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového musí střední hmotnost ryb v kontrolních skupinách vzrůst alespoň o polovinu (tj. o 50 %) jejich počáteční hmotnosti za 28 dnů; např. počáteční hmotnost: 1 g/rybu (= 100 %), konečná hmotnost po 28 dnech: ≥ 1,5 g/rybu (≥ 150 %);
- koncentrace rozpuštěného kyslíku musí dosahovat alespoň 60 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,
- teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi lišit o více než ± 1 °C a měla by být udržována v rozpětí 2 °C v rozsahu teplot stanovených pro testovací druh (doplňk 1).

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Přístroje a pomůcky**

Normální laboratorní vybavení a zejména:

- přístroj pro stanovení kyslíku a pH-metr,

▼B

- vybavení pro stanovení tvrdosti vody a alkality,
- vhodné zařízení pro regulaci teploty a pro její pokud možno nepřetržitě sledování,
- nádrže z chemicky inertního materiálu o vhodném objemu vzhledem k doporučenému nasazování a obsádce (viz bod 1.8.5 a doplněk 1),
- dostatečně přesné váhy (tj. vážící s přesností na $\pm 0,5$ %).

1.6.2. Voda

Jako zkušební voda může být použita jakákoli voda, v níž testovací druh dlouhodobě přežívá a roste. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by měla být v rozmezí 6,5 až 8,5, avšak během zkoušky by se pH nemělo lišit o více než $\pm 0,5$. Doporučuje se tvrdost nad 140 mg/l (jako CaCO_3). S cílem zajistit, aby ředící voda neměla nadměrný vliv na výsledek zkoušky (například v důsledku tvorby komplexů zkoušené látky), by měly být v určitých intervalech odebírány vzorky k analýze. Je-li kvalita ředící vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců). Některé chemické charakteristiky přijatelné ředící vody jsou uvedeny v doplňku 2.

1.6.3. Zkušební roztoky

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředící vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sytící kolony.

Použití rozpouštědel nebo dispergátorů (solubilizačních činidel) může být v některých případech pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky rozložitelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těkavé sloučeniny je třeba používat s rozvahou, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizující činidlo, nesmí mít významné účinky na růst ryb ani viditelné nepříznivé účinky na nedospělé ryby, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze působení rozpouštědla.

▼B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dává a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, sycí systém). Průtok zásobních roztoků a ředící vody by měl být v průběhu zkoušky kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je výměna vody 6 litrů na gram ryb za den přijatelná (viz bod 1.8.2.2).

U semistatických zkoušek (s obnovováním média) bude četnost obnovování média záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat vodu denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zváženo použití průtokové zkoušky.

1.6.4. Výběr druhů

Doporučeným druhem pro tuto zkoušku je pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), neboť u něj bylo v okružních testech získáno nejvíce zkušeností (1, 3). Mohou však být použity jiné dobře popsané druhy, může však být nutné v tomto případě zkušební postup upravit, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. Zkušenosti jsou například s daniem pruhovaným (*Danio rerio*) (4, 5) a halančíkem japonským (*Oryzias latipes*) (6, 7, 8). V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.6.5. Chov ryb

Testovací ryby by měly pocházet z jednoho chovu (přednostně ze stejného tření), který se alespoň dva týdny před zkouškou udržuje v podmínkách kvality vody a osvětlení, které jsou podobné podmínkám použitým ve zkoušce. V průběhu chovu a v průběhu zkoušky by měly být krmeny množstvím potravy odpovídajícím minimálně 2 % tělesné hmotnosti za den a nejlépe 4 % tělesné hmotnosti za den.

Po 48hodinové aklimatizaci se zaznamená mortalita a použijí se tato kritéria:

- mortalita vyšší než 10 % populace za sedm dnů: vyměnit celou obsádku,
- mortalita od 5 do 10 % populace za sedm dnů: aklimatizace dalších sedm dnů; je-li mortalita během následujících sedmi dnů vyšší než 5 %, vymění se celá obsádka,
- mortalita nižší než 5 % populace za sedm dnů: obsádka se přijme.

Dva týdny před zkouškou nebo v průběhu zkoušky nesmí být léčeny u ryb žádné nemoci.

▼ B

1.7. USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

„Uspořádáním zkoušky“ se rozumí výběr počtu zkušebních koncentrací a jejich odstupňování, počet nádrží pro každou koncentraci a počet ryb v nádrži. Uspořádání by mělo být v ideálním případě zvoleno s ohledem na:

- cíl studie,
- metodu statistické analýzy, která bude použita,
- dostupnost a cenu prostředků pro experiment.

S cílem studie by měly být specifikovány pokud možno statistická významnost, s jakou má být daná velikost změny (např. změny rychlosti růstu) rozeznána, nebo přesnost, s jakou má být odhadnuta hodnota EC_x (např. při $x = 10, 20$ nebo 30 , pokud možno ne méně než 10). Bez těchto údajů nelze stanovit přesně rozsah studie.

Je důležité vzít na vědomí, že uspořádání, které je optimální (nejlépe využívá prostředky) při použití jedné metody statistické analýzy, není nezbytně optimální pro jinou metodu. Doporučené uspořádání pro odhad LOEC/NOEC tedy nebývá stejné jako uspořádání pro analýzu regrese.

V mnoha případech se regresní analýze dává přednost před analýzou rozptylu, a to z důvodů diskutovaných Stephanem a Rogersem (9). Není-li však nalezen vhodný regresní model ($r^2 < 0,9$), měla by být použito stanovení NOEC/LOEC.

1.7.1. Uspořádání pro regresní analýzu

Pro uspořádání zkoušky, která má být analyzována regresí, jsou důležitá tato hlediska:

- koncentrace použité ve zkoušce musí v každém případě pokrývat koncentraci vyvolávající účinek (např. $EC_{10,20,30}$) a rozsah koncentrací, při nichž dochází k účinku, který je předmětem zájmu. Přesnost, s jakou mohou být odhadnuty koncentrace vyvolávající účinek, bude nejlepší, bude-li koncentrace vyvolávající účinek ležet uprostřed rozsahu zkušebních koncentrací. Předběžné orientační zkoušky mohou být užitečné při výběru vhodných zkušebních koncentrací,
- aby mohl být vytvořen uspokojivý statistický model, měla by zkouška zahrnovat alespoň jednu kontrolní nádrž a pět dalších nádrží o různých koncentracích. Popřípadě by při použití solubilizčního činidla měla být vedle zkušebních skupin nasazena jedna kontrolní skupina vystavená koncentraci solubilizačního činidla použité při nejvyšší zkušební koncentraci (viz body 1.8.3 a 1.8.4),
- může být použita vhodná geometrická nebo logaritmická řada koncentrací (10) (viz doplněk 3). Upřednostňuje se logaritmické stupňování koncentrací,

▼B

- je-li k dispozici více než šest nádrží, měly by být další nádrže použity buď pro duplicitní stanovení, nebo by měly být použity pro koncentrace rozložené v rozsahu koncentrací tak, aby se zmenšily rozestupy mezi koncentracemi. Obě použití lze doporučit stejnou měrou.

1.7.2. **Uspořádání pro odhad NOEC/LOEC analýzou rozptylu (ANOVA)**

Pro každou koncentraci by měly být nejlépe k dispozici nádrže pro duplicitní stanovení a statistická analýza by měla být provedena na úrovni nádrže (11). Bez duplicitních nádrží není možné zohlednit jinou variabilitu mezi nádržemi, než jaká je důsledkem rozdílů mezi jednotlivými rybami. Ve vyšetřovaném případě (12) se však ukázalo, že variabilita mezi nádržemi byla velmi malá ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami). Relativně přijatelnou alternativou je tedy provedení statistické analýzy pro jednotlivé ryby.

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2.

Provádí-li se zkouška s duplicitními nádržemi, měl by být počet duplicitních kontrolních nádrží, a tedy i počet ryb, dvojnásobkem počtu použitého pro každou zkušební koncentraci, jenž by měl být pro všechny koncentrace stejný (13, 14, 15). Nejsou-li naproti tomu duplicitní nádrže použity, měl by být v kontrolní skupině stejný počet ryb jako ve skupině pro každou zkušební koncentraci.

Je-li ANOVA založena na nádržích namísto na jednotlivých rybách (což by znamenalo buď ryby jednotlivě označit, nebo použít „pseudospecifickou“ rychlost růstu (viz bod 2.1.2)), je nezbytné počet nádrží dostatečně znásobit, aby bylo možné stanovit směrodatnou odchylku pro nádrže použité v rámci jednotlivé koncentrace. To znamená, že by měl být počet stupňů volnosti pro chybu v analýze rozptylu alespoň 5 (11). Je-li znásoben pouze počet kontrolních skupin, existuje nebezpečí, že bude zjištěná proměnlivost ovlivněna, neboť může narůstat se střední hodnotou sledované rychlosti růstu. Vzhledem k tomu, že rychlost růstu s největší pravděpodobností klesá s rostoucí koncentrací, povede to k nadhodnocení variability.

1.8. **POSTUP**

1.8.1. **Výběr a vážení testovacích ryb**

Je důležité minimalizovat rozdíly v hmotnostech ryb na začátku zkoušky. Vhodná rozpětí velikostí ryb různých druhů doporučených pro tuto zkoušku jsou uvedena v dodatku 1. Rozpětí individuálních hmotností na začátku zkoušky by mělo být pro celou násadu ryb použitých ve zkoušce nejlépe ± 10 % aritmetického průměru hmotností a v žádném případě by nemělo překročit 25 %. Doporučuje se zvážit před zkouškou menší vzorek ryb s cílem odhadnout střední hodnotu hmotnosti.

▼B

24 hodin před zahájením zkoušky se obsádka ryb přestane krmit. Poté se provede náhodný výběr ryb. Za použití běžného anestetika (např. vodný roztok trikain-methan-sulfonátu (MS 222) o koncentraci 100 mg/l neutralizovaný přidavkem dvou dílů hydrogenuhličitanu sodného na jeden díl MS 222) se ryby jednotlivě s přesností uvedenou v doplňku 1 zváží za účelem stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha). Ryby s hmotností v požadovaném rozsahu se náhodně rozdělí do nádrží. Zaznamená se celková živá hmotnost ryb v každé zkušební nádrži. Při manipulaci s rybami za použití anestetik (včetně osušení a zvážení) může u nedospělých ryb, a zejména u druhů o malé velikosti, dojít ke stresu a poranění. S nedospělými rybami se tedy musí manipulovat s nejvyšší opatrností, aby nedošlo u testovacích ryb ke stresu a poranění.

Ryby se opět zváží po 28 dnech zkoušky (viz bod 1.8.6). Považuje-li se však za nezbytné nově vypočítat přísun potravy, mohou být ryby opět zváženy po 14 dnech zkoušky (viz bod 1.8.2.3). Ke stanovení změn velikosti ryb, na jejichž základě se upravuje přísun potravy, může být použita jiná metoda, např. fotografická metoda.

1.8.2. Podmínky expozice**1.8.2.1. Délka expozice**

Zkouška trvá 28 dnů nebo déle.

1.8.2.2. Velikost násady a hustota obsádky

Je důležité, aby velikost násady a hustota obsádky vyhovovaly použitému testovacímu druhu (viz doplněk 1). Je-li hustota obsádky příliš vysoká, dojde ke stresu vedoucímu ke snížené rychlosti růstu a popřípadě k nemocem. Je-li příliš nízká, může vyvolat teritoriální chování, což by mohlo rovněž ovlivnit růst. V každém případě by měla být velikost násady tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60 % ASV bez provzdušňování. Okružní test (3) ukázal, že u pstruha duhového je přijatelná velikost násady 16 ryb o hmotnosti 3–5 g do objemu 40 litrů. Doporučené obnovování vody během zkoušky je 6 litrů na gram ryb za den.

1.8.2.3. Krmení

Ryby by měly být krmeny dostatečným množstvím vhodného krmiva (dodatek 1), aby byla umožněna přijatelná rychlost růstu. Je třeba dbát na to, aby nedošlo k růstu mikroorganismů a k zakalení vody. U pstruha duhového by mělo těmto požadavkům vyhovovat množství odpovídající 4 % jejich tělesné hmotnosti za den (3, 16, 17, 18). Denní množství může být rozděleno na dva stejné díly a podáno rybám dvakrát za den s odstupem alespoň pěti hodin. Množství se řídí celkovou počáteční hmotností ryb v každé zkušební nádrži. Pokud se ryby opět zváží 14. den, množství se nově vypočte. 24 hodin před vážením se ryby přestanou krmit.

▼B

Nespotřebovaná potrava a výkaly se ze zkušebních nádrží každý den odstraní důkladným odsátím ze dna každé nádrže.

1.8.2.4. Světlo a teplota

Fotoperioda a teplota vody by měly vyhovovat testovacím druhům (doplněk 1).

1.8.3. Zkušební koncentrace

Obvykle je nutných pět koncentrací zkoušené látky, a to bez ohledu na uspořádání zkoušky (viz bod 1.7.2). Předchozí znalost toxicity zkoušené látky (např. ze zkoušek akutní toxicity nebo z orientačních studií) by měla pomoci při volbě vhodných zkušebních koncentrací. Použije-li se méně než pět koncentrací, mělo by to být zdůvodněno. Nejvyšší zkušební koncentrace by neměla překročit rozpustnost látky ve vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo, neměla by být jeho konečná koncentrace vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná (viz bod 1.6.3). Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

1.8.4. Kontrolní skupiny

Počet kontrolních skupin v ředící vodě závisí na uspořádání zkoušky (viz body 1.7 až 1.7.2). Použije-li se solubilizační činidlo, měl by být nasazen stejný počet kontrolních skupin se solubilizačním činidlem jako s ředící vodou.

1.8.5. Četnost analytických stanovení a měření

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanoví v pravidelných intervalech (viz níže).

Při průtokových zkouškách se průtok zásobních roztoků toxické látky a ředící vody kontroluje v určitých intervalech, přednostně denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Mají-li se koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. 80–120 %, viz body 1.6.2 a 1.6.3), doporučuje se, aby byly nejnižší a nejvyšší koncentrace analyzovány alespoň na začátku zkoušky a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se (na základě údajů o stálosti látky) nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to stejně často jako u stálých látek.

U semistatických zkoušek (s obnovováním média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot, se doporučuje analyzovat alespoň nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace alespoň na začátku studie ihned po jejich přípravě a bezprostředně před obnovením a poté v týdenních intervalech. U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, musí být analyzovány všechny koncentrace stejně často jako u stálých látek.

▼ B

Doporučuje se zakládat výsledky na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace zkoušené látky v roztoku uspokojivě udržována v rozmezí $\pm 20\%$ nominální hodnoty nebo měřené počáteční koncentrace, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených hodnotách.

Může být nezbytné vzorky filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů $0,45\ \mu\text{m}$ nebo odstředit). Doporučuje se odstředování. Neadsorbují-li se zkoušená látka na filtry, je filtrace přijatelná.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost, alkalita a popřípadě salinita se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a salinita (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, přednostně před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každé výměny vody u statických zkoušek a alespoň týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody a alkalita se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří přednostně nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

1.8.6. **Pozorování**

Hmotnost: na konci každé zkoušky se musí ryby, které přežily, zvážit za účelem stanovení živé hmotnosti (po osušení do sucha), a to buď jako skupina pro každou zkušební nádrž, nebo jednotlivě. Vážení ryb jako skupin se upřednostňuje před vážením jednotlivých ryb, které vyžaduje, aby byly ryby jednotlivě označeny. V případě vážení jednotlivých ryb pro stanovení individuální specifické rychlosti růstu by neměla zvolená technika označení vyvolávat u ryb stres (alternativou ke značení ryb vymražením může být popřípadě použití barevného jemného rybářského vlasce).

Ryby se v průběhu zkoušky vyšetřují denně a jakékoli vnější abnormality (hemoragie, odbarvení) a neobvyklé chování se zaznamená. Každý úhyn se zaznamená a uhynulé ryby se co nejdříve odstraní. Uhynulé ryby se nenahrazují, neboť velikost násady a hustota obsádky by měly být dostatečné na to, aby nedošlo k ovlivnění růstu v důsledku změn počtu ryb v nádrži. Bude však nutné upravit množství krmiva.

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

2.1. **ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Doporučuje se, aby se navrhování i analýzy zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, v počtu ryb atd. S ohledem na možnosti uspořádání zkoušky zde nejsou uvedeny specifické pokyny pro postup statistického zpracování.

▼ B

Rychlost růstu se nevypočítává pro zkušební nádrže, v nichž mortalita překročila 10 %. Velikost mortality se však uvede pro všechny zkušební koncentrace.

Bez ohledu na použitou metodu analýzy údajů je hlavním ukazatelem specifická rychlost růstu r od okamžiku t_1 do t_2 . Může být definována několika způsoby v závislosti na tom, zda jsou, či nejsou ryby individuálně značeny nebo zda se požaduje průměrná hodnota pro nádrž.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kde,

r_1 = individuální specifická rychlost růstu ryby,

r_2 = průměrná specifická rychlost růstu pro nádrž,

r_3 = „pseudospecifická“ rychlost růstu,

w_1, w_2 = hmotnosti určité ryby v čase t_1 a t_2 ,

$\log_e w_1$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na začátku vyšetřovacího intervalu,

$\log_e w_2$ = logaritmus hmotnosti jednotlivé ryby na konci vyšetřovacího intervalu,

$\log_e W_1$ = průměr logaritmů hodnot w_1 pro ryby v nádrži na začátku vyšetřovacího intervalu,

$\log_e W_2$ = průměr logaritmů hodnot w_2 pro ryby v nádrži na konci vyšetřovacího intervalu,

t_1, t_2 = čas (ve dnech) začátku a konce vyšetřovacího intervalu.

r_1, r_2, r_3 mohou být vypočteny pro interval 0–28 dnů a popřípadě (bylo-li provedeno měření 14. den) pro intervaly 0–14 a 14–28 dnů.

2.1.1. **Analýza výsledků regrese (modelování závislosti koncentrace-odezva)**

V této metodě analýzy se závislosti mezi specifickou rychlostí růstu a koncentrací proloží vhodná matematická funkce, a to umožní odhadnout „ EC_x “, tj. jakoukoli požadovanou hodnotu EC. U této metody není nutný výpočet r pro jednotlivou rybu (r_1) a namísto toho se analýza může založit na průměrné hodnotě r (r_2) pro nádrž. Dává se přednost poslední uvedené metodě. Je také vhodnější při použití velmi malých druhů.

Průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (r_2) se graficky vynesou proti koncentraci, aby bylo možno zkontrolovat závislost odezvy na koncentraci.

▼B

K vyjádření závislosti r_2 na koncentraci se zvolí vhodný model; jeho volba musí být řádně zdůvodněna.

Liší-li se pro jednotlivé nádrže počty ryb, které přežily, je nutno prokládání každé závislosti, ať již jednoduché nebo nelineární, vážit s ohledem na různé velikosti skupin.

Metoda proložení modelu musí umožnit odhadnout například hodnotu EC_{20} a stanovit její rozptyl (buď směrodatnou odchylku, nebo interval spolehlivosti). Graf proložené závislosti se vynese spolu s údaji, aby byla zřejmá vhodnost použitého modelu (9, 19, 20, 21).

2.1.2. **Analýza výsledků pro odhad LOEC**

Bylo-li ve zkoušce použito pro každou koncentraci více nádrží, může být odhad LOEC založen na analýze rozptylu (ANOVA) průměrné specifické rychlosti růstu pro nádrž (viz bod 2.1) a poté na vhodném srovnání průměrné hodnoty r pro každou koncentraci s průměrnou hodnotou r pro kontrolní skupiny (např. Dunnettovým nebo Williamsovým testem (13, 14, 15, 22)) s cílem zjistit nejmenší koncentraci, u níž je na hladině spolehlivosti 0,05 tento rozdíl významný. Nejsou-li předpoklady pro použití parametrických metod splněny, kvůli jinému než normálnímu rozdělení (např. se použije Shapiro-Wilkův test) nebo kvůli heterogennímu rozptylu (Bartlettův test), měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace údajů za účelem homogenizace rozptylů nebo by měla být provedena vážená ANOVA.

Nebylo-li pro každou koncentraci použito více nádrží, není použití ANOVA u jednotlivé nádrže dostatečně citlivé nebo je nemožné. v takovém případě je přijatelným kompromisem založit ANOVA na „pseudospécifické“ rychlosti růstu r_3 pro jednotlivé ryby.

Průměrná hodnota r_3 pro každou koncentraci může být poté porovnána s průměrnou hodnotou r_3 pro kontrolní skupiny. Hodnotu LOEC lze poté nalézt výše uvedeným způsobem. The LOEC can then be identified as before. Je třeba vzít na vědomí, že tato metoda neumožňuje zohlednit variabilitu mezi nádržemi ve větší míře, než s jakou se počítá v důsledku variability mezi rybami, a ani před ní nechrání. Ukázalo se však (9), že variabilita mezi nádržemi byla velmi malá ve srovnání s variabilitou v rámci nádrže (tj. mezi rybami). Nejsou-li v analýze zahrnuty jednotlivé ryby, musí být uvedena metoda zjištění odlehých hodnot a její použití musí být zdůvodněno.

2.2. **INTERPRETACE VÝSLEDKŮ**

Výsledky je třeba interpretovat opatrně, leží-li naměřené hodnoty koncentrací toxické látky v roztocích blízko meze stanovitelnosti analytické metody nebo klesá-li u semistatických zkoušek koncentrace zkoušené látky od okamžiku přípravy roztoku do jeho obnovení.

2.3. **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

▼ B**2.3.1. Zkoušená látka:**

- fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,
- údaje o chemické identifikaci včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

2.3.2. Testovací druh:

- vědecký název, podle možnosti,
- kmen, velikost, původ, jakákoli příprava atd.

2.3.3. Zkušební podmínky:

- použitý zkušební postup (např. semistatický/s obnovováním, průtokový, nasazování, hustota obsádky atd.),
- uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží, zkušební koncentrace a znásobení počtu nádrží, počet ryb v nádrži),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),
- nominální zkušební koncentrace, průměry naměřených hodnot v jednotlivých nádržích, jejich směrodatné odchylky a metody jejich stanovení a důkazy toho, že naměřené hodnoty odpovídají koncentracím zkoušené látky v pravém roztoku,
- charakteristiky ředící vody: pH, alkalita, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných pevných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,
- kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku,
- podrobné informace o krmení (např. druh krmiva (krmiv), původ, podávané množství a frekvence krmení).

2.3.4. Výsledky:

- doklady o tom, že kontrolní skupiny vyhověly kritériu přežití, a údaje o mortalitě pro každou zkušební koncentraci,
- použité metody statistické analýzy, statistiky založené na znásobeném počtu nádrží nebo na jednotlivých rybách, zpracování údajů a zdůvodnění použitých metod,
- údaje ve formě tabulky o individuálních a středních hodnotách hmotností ryb v den 0, 14 (bylo-li prováděno vážení) a 28, hodnoty průměrných rychlostí růstu pro nádrž nebo popřípadě pseudospecifických rychlostí růstu pro intervaly 0–28 dnů nebo popřípadě 0–14 a 14–28 dnů,
- výsledky statistické analýzy (tj. regresní analýzy nebo ANOVA) přednostně ve formě tabulky nebo v grafické formě a hodnota LOEC ($p = 0,05$) a NOEC nebo EC_x, popřípadě se směrodatnými odchylkami,

▼ B

— výskyt jakýchkoli neobvyklých reakcí ryb a viditelné účinky vyvolané zkoušenou látkou.

3. LITERATURA

- 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., Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231–236.
- 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, str. 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, str. 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, str. 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. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.
- 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, str. 328–338.
- 10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, str. 81.
- 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, str. 1096–1121.

▼ B

- 14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, str. 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, str. 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, 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, 33–41.
- 18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 str.
- 19) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 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, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- 21) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the IC_p approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988. 12 str. 12.
- 22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, str. 510–531.

DRUHY RYB DOPORUČNÉ KE ZKOUŠENÍ A VHODNÉ ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY

Druhy	Doporučený rozsah zkušební teploty (°C)	Fotoperioda (h)	Doporučené rozpětí počáteční hmotnosti ryb (g)	Doporučená přesnost měření	Velikost násady (g/l)	Hustota obsádky (l ⁻¹)	Krmivo	Délka zkoušky (d)
Doporučené druhy: <i>Oncorhynchus mykiss</i> pstruh duhový	12,5–16,0	12–16	1–5	na 100 mg	1,2–2,0	4	značkové sušené krmivo pro mladé lososovité	≥ 28
Jiné dobře popsané druhy: <i>Danio rerio</i> danio pruhované	21–25	12–16	0,050–0,100	na 1 mg	0,2–1,0	5–10	živé krmivo (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> halančík japonský	21–25	12–16	0,050–0,100	na 1 mg	0,2–1,0	5–20	živé krmivo (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28

▼B*DOPLNĚK 2***NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ
ŘEDICÍ VODY**

LÁTKA	KONCENTRACE
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l



DOPLNĚK 3

Logaritmické řady koncentrací vhodných pro zkoušku toxicity (9)

Sloupec (počet koncentrací mezi 100 a 10, nebo mezi 10 a 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Ze sloupců může být zvolena řada pěti (nebo více) po sobě jdoucích koncentrací. Mezilehlé body pro koncentrace ve sloupci (x) jsou uvedeny ve sloupci (2x + 1). Uvedené hodnoty mohou být koncentracemi vyjádřenými v objemových nebo hmotnostních procentech (mg/l nebo µg/l). Hodnoty mohou být podle potřeby násobeny nebo děleny jakoukoli mocninou 10. Sloupec 1 by se měl použít, pokud je úroveň toxicity značně neurčitá.

▼B**C.15. ZKOUŠKA KRÁTKODOBÉ TOXICITY NA RYBÍM EMBRYU A VÁČKOVÉM PLŮDKU****1. METODA**

Tato zkouška krátkodobé toxicity je replikou metody OECD TG 212 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška krátkodobé toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku je krátkodobou zkouškou, při níž jsou exponována životní stadia od čerstvě oplodněných jiker do stadia váčkových plůdků. Při zkoušce na embryu a na váčkovém plůdku se nekrmí, a zkouška by tedy měla být ukončena, dokud je váčkový plůdek stále vyživován ze žloutkového váčku.

Zkouška je určena k zjištění letálních a v omezené míře subletálních účinků chemických látek na specifická stadia a testovací druhy. Tato zkouška by měla poskytnout užitečné informace, neboť by a) mohla být přechodem mezi letálními a subletálními zkouškami, b) mohla být použita jako screeningová zkouška pro úplnou zkoušku toxicity na raných životních stadiích nebo pro zkoušky chronické toxicity a c) mohla být použita pro zkoušení na druzích, u nichž nejsou dostatečně rozvinuty chovné techniky, aby pokryly období od endogenní výživy k exogenní.

Je třeba mít na paměti, že pouze zkoušky pokrývající celý životní cyklus ryb obecně umožňují odhadnout chronickou toxicitu chemické látky pro ryby a že jakékoli omezení expozice nějakého životního stadia může snížit citlivost, a tím podhodnotit chronickou toxicitu. Očekává se tedy, že zkouška na embryu a váčkovém plůdku je méně citlivá než úplná zkouška na raných životních stadiích, zejména pokud jde o vysoce lipofilní chemické látky ($\log P_{ov} > 4$) a chemické látky se specifickým mechanismem toxického účinku. v citlivostech těchto dvou zkoušek se však očekávají menší rozdíly v případě chemických látek s nespecifickým, narkotickým mechanismem účinku (1).

Před publikováním této zkoušky bylo nejvíce zkušeností s touto zkouškou na embryu a váčkovém plůdku získáno u sladkovodní ryby *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – obecný název danio pruhované). Podrobnější pokyny pro zkoušku s tímto druhem jsou tedy uvedeny v doplňku 1. To nevylučuje použití jiného druhu, pro něhož jsou zkušenosti rovněž k dispozici (tabulky IA a IB).

1.2. DEFINICE

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): je nejnižší zkušební koncentrace zkoušené látky, při níž jsou u látky pozorovány významné účinky ve srovnání s kontrolou (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$). Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC.

Koncentrace bez pozorovaných účinků No Observed Effect Concentration (NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

▼ B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Rybí embrya a vččkové plůdky se vystaví rozsahu koncentrací zkoušené látky rozpuštěné ve vodě. Zkouška umožňuje volit mezi semistatickým a průtokovým uspořádáním. Volba závisí na povaze zkoušené látky. Zkouška se zahájí umístěním oplodněných jiker do zkušebních nádrží a ukončí se těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového vččku čerstvých plůdků v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Posoudí se letální a subletální účinky a porovná se s hodnotami kontrolních skupin s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky, a tedy koncentraci bez pozorovaných účinků. Mohou být popřípadě analyzovány za použití regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která způsobuje určitý procentuálně vyjádřený účinek (tj. LC/EC_x, kde x je definovaný procentuální účinek).

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měly by být dostupné výsledky zkoušky akutní toxicity (viz metoda C.1) provedené přednostně na druhu zvoleném pro tuto zkoušku. Výsledky mohou být užitečné při výběru vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkoušce na raných životních stádiích. Měly by být známy rozpustnost látky ve vodě (včetně rozpustnosti ve zkušební vodě) a tlak par látky. Měla by být k dispozici vhodná analytická metoda pro kvantitativní stanovení látky ve zkoušených roztocích, a to se známou a doloženou správností a známou mezi stanovitelností.

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek jsou strukturální vzorec, čistota látky, stálost na světle, pK_a, P_{ov} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

- celková míra přežití oplodněných jiker v kontrolních skupinách a podle potřeby v nádržích, do nichž bylo přidáno pouze rozpouštědlo, musí být rovna limitům stanoveným v dodatcích 2 a 3 nebo vyšší,
- koncentrace rozpuštěného kyslíku musí ležet mezi 60 a 100 % hodnoty nasycení vzduchem (ASV) po celou dobu zkoušky,
- teplota vody se po celou dobu zkoušky nesmí mezi zkušebními nádržemi nebo mezi dny, které po sobě následují, lišit o více než $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ a měla by být udržována v rozpětí teplot stanoveném pro testovací druh (dodatky 2 a 3).

▼B

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Zkušební nádrže**

Mohou být použity jakékoli nádrže ze skla nebo z jiného inertního materiálu. Rozměry zkušebních nádrží by měly být dostatečné k tomu, aby vyhovovaly velikosti násady (viz bod 1.7.1.2). Doporučuje se, aby byly nádrže umístěny ve zkušebním prostoru náhodně. Uspořádání do náhodných bloků se zastoupením všech variant expozice v každém bloku se upřednostňuje před zcela náhodným uspořádáním, kdy existují systémové účinky v laboratoři, které mohou být blokovým uspořádáním kontrolovány. Je-li použito blokové uspořádání, mělo by být zohledněno při následné analýze údajů. Nádrže by měly být chráněny před nežádoucími rušivými vlivy.

1.6.2. **Výběr druhů ryb**

Doporučené druhy ryb jsou uvedeny v tabulce 1A. To nevylučuje použití jiného druhu (příklady jsou uvedeny v tabulce 1B), avšak zkušební postup musí být upraven tak, aby byly vytvořeny vhodné zkušební podmínky. V takovém případě by měly být uvedeny důvody pro výběr druhu a experimentální podmínky.

1.6.3. **Chov matečných ryb**

Podrobnosti o chovu matečných ryb v uspokojivých podmínkách jsou uvedeny v metodě OECD TG 210 ⁽¹⁾ a v odkazech (2, 3, 4, 5, 6).

1.6.4. **Chov embryí a plůdků**

Embrya a plůdky mohou být exponovány v hlavní nádrži v menších nádobách s pletivovými stěnami nebo konci, aby jimi mohl proudit zkušební roztok. Nevířivého průtoku nádobami lze dosáhnout jejich zavěšením do ramen, pomocí nichž lze pohybovat nádobami nahoru a dolů, přičemž organismy zůstanou stále ponořeny; lze rovněž použít systém sifonového průtoku. Oplodněné jikry lososovitých ryb mohou ležet na podložce nebo pletivu s dostatečně velkými oky, aby jimi mohly plůdky po vylíhnutí propadnout. K přemístění embryí a plůdků v semistatické zkoušce s každodenní úplnou výměnou média je vhodné použít odsávačky (viz bod 1.6.6).

Jsou-li k udržení jiker v hlavní nádrži použity nádoby, mřížky nebo pletiva, měly by být po vylíhnutí plůdků odstraněny ⁽¹⁾, pokud ovšem nemají být ponechány k zamezení úniku ryb. Je-li třeba přemístit plůdky, neměly by být vystaveny vzduchu a neměly by se k jejich vytažení z nádob používat sítky (taková opatrnost není nutná u méně křehkých druhů, např. u kapra). Okamžik přemístění se liší podle druhu a přemístění nemusí být vždy nutné. U semistatických technik mohou být použity kádinky nebo mělké nádobky a podle potřeby mohou být opatřeny sítím umístěným nepatrně nad dnem kádinky. Je-li objem těchto nádob dostatečný, aby vyhovoval požadavkům na nasazování (viz bod 1.7.1.2), nemusí být přemístění embryí nebo plůdků nutné.

⁽¹⁾ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test“.

▼ B**1.6.5. Voda**

Pro tuto zkoušku je vhodná jakákoli voda, která vyhovuje chemickým charakteristikám přijatelné ředící vody, jak jsou uvedeny v dodatku 4, a v níž testovací druhy kontrolních skupin přežívají alespoň tak, jak je uvedeno v dodatcích 2 a 3. Měla by mít po celou dobu zkoušky stejnou kvalitu. Hodnota pH by se neměla měnit o více než $\pm 0,5$. Pro ujištění, že voda nebude mít přílišný vliv na výsledky zkoušky (například tvorbou komplexů se zkoušenou látkou) nebo nepříznivý vliv na stav matečných ryb, by měly být odebírány v pravidelných intervalech její vzorky pro analýzu. Je-li kvalita ředící vody relativně konstantní, mělo by být stanovení těžkých kovů (např. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavních aniontů a kationtů (např. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), pesticidů (např. celkový obsah organických fosforových a chlorových pesticidů), celkový obsah organického uhlíku a suspendovaných látek provedeno např. každé tři měsíce. Je-li prokázáno, že kvalita vody je konstantní po dobu alespoň jednoho roku, mohou být stanovení méně častá a intervaly lze prodloužit (např. každých šest měsíců).

1.6.6. Zkušební roztoky

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se připraví ředěním zásobního roztoku.

Zásobní roztok by měl být připraven přednostně jednoduchým mechanickým mícháním nebo protřepáváním zkoušené látky v ředící vodě (např. mechanickým mícháním nebo pomocí ultrazvuku). Pro dosažení vhodné koncentrace zásobního roztoku mohou být použity sytící kolony. Neměla by být používána rozpouštědla nebo dispergátory (solubilizační činidla), v některých případech však může být použití takových látek pro vytvoření zásobního roztoku o vhodné koncentraci nezbytné. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. Snadno biologicky odbouratelná činidla (např. aceton) nebo vysoce těkavé sloučeniny je třeba používat rozvážně, neboť mohou způsobit problémy s růstem bakterií v průtokových zkouškách. Je-li použito solubilizační činidlo, nesmí mít významné účinky na přežití ani viditelné nepříznivé účinky na raná životní stadia, což musí být prokázáno na kontrolní skupině vystavené pouze rozpouštědlu. Měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat.

U semistatických technik mohou být použity dva různé postupy obměny; buď i) se do čistých nádob připraví nové zkušební roztoky a přežívající jikry a plůdky se s malým objemem starého roztoku opatrně přemístí do nových nádob, aniž by se vystavily vzduchu, nebo ii) se testovací organismy ponechají v nádobě a vymění se určitý podíl (alespoň tři čtvrtiny) zkušební vody. Četnost obnovování média bude záviset na stálosti zkoušené látky, avšak doporučuje se obnovovat médium denně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky mezi obnoveními média stálá, (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), měla by být zváženo použití průtokové zkoušky. V každém případě je třeba dbát na to, aby plůdky nebyly při obnovování vody vystaveny stresu.

▼ B

Při průtokových zkouškách je pro zajištění řady koncentrací nezbytný systém, který nepřetržitě dávkuje a ředí zásobní roztok zkoušené látky (např. dávkovací čerpadlo, zařízení pro proporcionální ředění, syticí systém). Průtok zásobních roztoků a ředicí vody by měl být kontrolován v určitých intervalech, nejlépe denně, a neměl by se v průběhu zkoušky měnit o více než 10 %. Jako vhodný byl shledán průtok odpovídající výměně alespoň pětinasobku objemu nádrže za 24 hodin (2).

1.7. POSTUP

Užitečné informace o provádění zkoušek toxicity na rybím embryu a váčkovém plůdku jsou dostupné v literatuře, přičemž některé literární zdroje jsou uvedeny v tomto textu v oddílu s literaturou (7, 8, 9).

1.7.1. Podmínky expozice**1.7.1.1. Délka expozice**

Zkouška se zahájí přednostně do 30 minut po oplodnění jiker. Embrya se ponoří do zkušební roztoku před započítáním rýhování blastuly nebo co nejdříve po něm, a v každém případě před počátkem stadia gastruly. U jiker získaných od komerčního dodavatele nemusí být možné zahájit zkoušku ihned po oplodnění. Vzhledem k tomu, že citlivost zkoušky může být vážně ovlivněna zpožděním začátku zkoušky, měla by být zkouška zahájena do osmi hodin po oplodnění. Vzhledem k tomu, že se plůdky v průběhu expozice nekrmí, ukončí se zkouška těsně před tím, než dojde k úplné absorpci žloutkového váčku u některého plůdku v některé ze zkušebních nádrží, nebo než začne v kontrolních skupinách docházet k úhynu v důsledku hladovění. Délka zkoušky bude záviset na použitém druhu. Některé doporučené délky zkoušky jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3.

1.7.1.2. Nasazování

Počet oplodněných jiker na začátku zkoušky by měl dostatečný ke splnění statistických požadavků. Měly by být náhodně rozděleny mezi varianty expozice a na jednu koncentraci by mělo být rozděleno alespoň 30 jiker rovným dílem (nebo alespoň tak, jak je to možné s ohledem na to, že u některých druhů může být obtížné získat stejně velké podíly) mezi alespoň tři zkušební nádrže. Velikost násady (biomasa v jednotce objemu) by měla být tak nízká, aby bylo možné udržet koncentraci rozpuštěného kyslíku na alespoň 60 % hodnoty ASV bez provzdušňování. U průtokových zkoušek se doporučuje nasazování nepřekračující 0,5 g/l za 24 hodin a v žádném okamžiku nepřekračující 5 g/l roztoku (2).

1.7.1.3. Světlo a teplota

Fotoperioda a teplota zkušební vody by měly vyhovovat testovacím druhům (dodatky 2 a 3). Pro účely sledování teploty může sloužit další zkušební nádrž.

▼ B**1.7.2. Zkušební koncentrace**

Obvykle je nezbytných pět koncentrací zkoušené látky lišících se od sebe konstatním faktorem nepřekračujícím 3,2. Při výběru rozsahu zkušebních koncentrací by měla být zohledněna křivka závislosti hodnoty LC_{50} na délce expozice ve studii akutní toxicity. Za určitých okolností může být oprávněně použít méně než pět koncentrací, např. v limitní zkoušce, a užší rozsah koncentrací. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Koncentrace látky, které jsou vyšší než 96hodinová LC_{50} nebo vyšší než 100 mg/l, podle toho, co je nižší, nemusí být zkoušeny. Látky by neměly být zkoušeny pro koncentrace vyšší, než je jejich rozpustnost ve zkušební vodě.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku solubilizační činidlo (viz bod 1.6.6), neměla by být jeho konečná koncentrace ve zkušební nádrži vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádržích stejná.

1.7.3. Kontrolní skupiny

Jako další zkušební sady by měly být nasazeny kontrolní skupina v ředící vodě (příslušným způsobem znásobená) a podle potřeby také jedna kontrolní skupina se solubilizačním činidlem (příslušným způsobem znásobená).

1.7.4. Četnost analytických stanovení a měření

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech.

U semistatických zkoušek, u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. 80–120 %, viz bod 1.4 a 1.6.6), se doporučuje analyzovat nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace na začátku studie, ihned po jejich přípravě, a bezprostředně před obnovením, a to alespoň třikrát ve stejných intervalech v průběhu celé doby zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku – ihned po jeho přípravě a při jeho obnovení).

U zkoušek, u nichž se (na základě údajů o stálosti látky) nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace ihned po jejich přípravě a před jejich výměnou, a to stejně často (tj. alespoň ve třech okamžicích rovnoměrně rozložených na celou dobu zkoušky). Stanovení koncentrací zkoušené látky před obnovením je třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádrže. Stanovení se provádějí v odstupu ne více než 7 dnů. Doporučuje se, aby výsledky byly založeny na naměřených koncentracích. Lze-li však prokázat, že po celou dobu zkoušky byla koncentrace uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách.

Pro průtokové zkoušky je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Je-li však zkouška delší než sedm dnů, doporučuje se zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé.

▼B

Může být nezbytné vzorky odstředit nebo filtrovat (např. přes filtr s průměrem pórů 0,45 µm). Vzhledem k tomu, že však odstředění ani filtrace vždy neoddělí od sebe biologicky dostupný a biologicky nedostupný podíl zkoušené látky, nemusí být vzorky takto zpracovány.

V průběhu zkoušky se měří v každé zkušební nádrži množství rozpuštěného kyslíku, pH a teplota. Celková tvrdost a salinita se měří v kontrolních nádržích a v jedné nádrži s nejvyšší koncentrací. Množství rozpuštěného kyslíku a salinita (podle potřeby) se měří alespoň třikrát (na začátku, uprostřed a na konci zkoušky). U semistatických zkoušek se doporučuje měřit množství rozpuštěného kyslíku častěji, přednostně před každým obnovením média a po něm, nebo alespoň jednou týdně. pH se měří na začátku a na konci každého období mezi výměnami vody u semistatických zkoušek a alespoň jednou týdně u průtokových zkoušek. Tvrdost vody se měří v každé zkoušce jednou. Teplota se měří denně a přednostně nepřetržitě alespoň v jedné zkušební nádrži.

1.7.5. **Pozorování**

1.7.5.1. *Stadia vývoje embrya*

Embryonální stadium (tj. stadium gastruly) na začátku expozice zkoušené látky by mělo být identifikováno co nejpřesněji. Lze to provést za použití reprezentativního vzorku vhodně uchovávaných a očištěných jiker. Popis a vyobrazení embryonálních stadií lze také nalézt v literatuře (2, 5, 10, 11).

1.7.5.2. *Líhnutí a přežívání*

Líhnutí a přežívání se pozoruje alespoň jednou denně a zaznamenávají se počty. Může být žádoucí provádět na začátku zkoušky častější pozorování (např. každých 30 minut během prvních tří hodin), neboť v některých případech mohou být důležitější doby přežití než pouhé počty úhynů (např. dochází-li k akutním toxickým účinkům). Uhynulá embrya a plůdky se odstraní ihned po nalezení, neboť se mohou rychle rozkládat. Při odstraňování uhynulých jedinců se postupuje s mimořádnou opatrností, aby se nenarazilo do sousedních jiker/plůdků nebo aby se fyzicky nepoškodily, neboť jsou mimořádně křehké a citlivé. Kritéria uhynutí se u životních stadií liší:

- u jiker: zejména v raných stadiích zřetelná ztráta průsvitnosti a změna ve zbarvení vyvolaná koagulací a/nebo sražením bílkovin, které vedou k bílému zakalení,
- u embryí: absence pohybu nebo tepu srdce nebo neprůsvitné zbarvení u druhů, jejichž embrya jsou za normálních okolností průsvitná,
- u plůdků: nepohyblivost nebo absence dýchacích pohybů nebo tepu srdce nebo bílé neprůsvitné zbarvení centrálního nervového systému a nedostatečná reakce na mechanické podněty.

▼ B1.7.5.3. *Neobvyklý vzhled*

Počet plůdků vykazujících neobvyklý tělesný vzhled nebo pigmentaci a stav absorpce žloutkového váčku se zaznamenávají v přiměřených intervalech závislejících na délce zkoušky a na povaze popisované abnormality. Je třeba si uvědomit, že se neobvyklá embrya a plůdky přirozeně vyskytují a u některých druhů jich může být v kontrolních skupinách řádově několik procent. Neobvyklí jedinci by měli být ze zkušební nádrže odstraněni pouze v případě uhynutí.

1.7.5.4. *Neobvyklé chování*

Abnormality, např. hyperventilace, nekoordinované plavání a netypická nečinnost, se zaznamenávají v přiměřených intervalech závislejících na délce zkoušky. Tyto účinky, přestože je obtížné je kvantifikovat, mohou – jsou-li pozorovány – napomoci interpretovat údaje o mortalitě, tj. mohou poskytnout informace o mechanismu toxického působení látky.

1.7.5.5. *Tělesná délka*

Doporučuje se změřit na konci zkoušky individuální délky; může být použita standardní délka, délka k vidlici nebo celková délka. Došlo-li však k uhnutí ocasní ploutve nebo k erozi ploutví, použijí se standardní délky. Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro délku mezi jednotlivými kontrolními skupinami ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Hmotnost*

Na konci zkoušky lze stanovit hmotnosti jedinců; hmotnost po vysušení (24 hodin při 60 °C) se upřednostňuje před živou vahou (po osušení do sucha). Obecně by měl být v dobře provedených zkouškách variační koeficient pro hmotnost mezi jednotlivými kontrolními skupinami ≤ 20 %.

Tato pozorování poskytnou některé nebo všechny následující údaje, které budou k dispozici pro statistickou analýzu:

- kumulativní mortalita,
- počty zdravých plůdků na konci zkoušky,
- čas začátku líhnutí a konce líhnutí (tj. 90 % vylíhnutí v každé paralelní skupině),
- počty plůdků vylíhnutých každý den,
- délka (a hmotnost) ryb, které přežily do konce zkoušky,
- počty plůdků, které jsou deformované nebo mají neobvyklý vzhled,
- počty plůdků vykazujících neobvyklé chování.

▼ B**2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ****2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Doporučuje se, aby se navrhování i analýzy zkoušky účastnil statistik, neboť tato zkušební metoda umožňuje značné variace v experimentálním uspořádání, například v počtu zkušebních nádrží, v počtu zkušebních koncentrací, ve výchozím počtu oplodněných jiker a v měřených parametrech. S ohledem na možnosti uspořádání zkoušky zde nejsou uvedeny specifické pokyny pro postup statistického zpracování.

Mají-li být odhadnuty hodnoty LOEC/NOEC, bude nezbytné analyzovat rozdíly v rámci každé sady paralelních skupin pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) nebo pomocí kontingenční tabulky. K vícenásobnému porovnání výsledků pro jednotlivé koncentrace a pro kontrolní skupiny může být užitečný Dunnettův test (12, 13). K dispozici jsou další užitečné příklady (14, 15). Vypočte se a uveďte velikost účinku, zjištěná pomocí analýzy ANOVA nebo jiných metod (tj. vypovídací schopnost zkoušky). Je třeba si uvědomit, že ne všechna pozorování uvedená v bodu 1.7.5.6 jsou vhodná pro statistickou analýzu pomocí ANOVA. Například kumulativní mortalita a počet zdravých plůdků na konci zkoušky by mohly být analyzovány probitovými metodami.

Mají-li být odhadnuty LC nebo EC_x , proloží se údaji vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logistická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka nebo křivky by měly být popsány parametry tak, aby bylo možné přímo odhadnout požadované hodnoty LC nebo EC_x a jejich směrodatné odchylky. To značně usnadní výpočet intervalů spolehlivosti pro hodnoty LC nebo EC_x . Pokud nejsou dobré důvody pro upřednostnění jiných intervalů spolehlivosti, uveďte se oboustranný 95 % interval spolehlivosti. Metoda proložení by měla pokud možno umožnit posouzení závažnosti nedostatků proložení. Proložení lze provést graficky. Regresní analýza je vhodná pro všechna pozorování uvedená v bodu 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Výsledky by měly být interpretovány opatrně v případě, že se naměřené koncentrace toxické látky ve zkušebních roztocích pohybují na úrovních blízkých mezi stanovení analytické metody. Interpretace výsledků pro koncentrace vyšší, než je rozpustnost látky ve vodě, by měla být rovněž opatrná.

2.3. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.3.1. Zkoušená látka:

— fyzikální povaha, fyzikálně-chemické vlastnosti,

— údaje o chemické identifikaci včetně údajů o čistotě a podle potřeby o metodě kvantitativního stanovení zkoušené látky.

▼ B**2.3.2. Testovací druh:**

- vědecký název, kmen, počet matečných ryb (tj. kolik samic bylo ve zkoušce použito pro získání požadovaného počtu jiker), zdroj a metoda sběru oplodněných jiker a následné zpracování.

2.3.3. Zkušební podmínky:

- použitá zkušební metoda (např. semistatická nebo průtoková metoda, doba od oplodnění do začátku zkoušky, nasazování atd.),
- fotoperioda (fotoperiody),
- uspořádání zkoušky (např. počet zkušebních nádrží a jejich znásobení, počet embryí v nádrži),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito, uvede se solubilizační činidlo a jeho koncentrace),
- nominální zkušební koncentrace, naměřené hodnoty ve zkušebních nádržích, jejich střední hodnoty a směrodatné odchylky a metody jejich stanovení, a je-li zkoušená látka rozpustná ve vodě v koncentracích nižších, než jsou vyšetřované koncentrace, uvede se důkaz toho, že naměřené koncentrace odpovídají koncentraci zkoušené látky v roztoku,
- charakteristiky ředící vody: hodnota pH, tvrdost, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku, koncentrace zbytkového chloru (je-li měřena), obsah celkového organického uhlíku, obsah suspendovaných látek, popřípadě salinita zkušebního média a výsledky jakýchkoli jiných provedených měření,
- kvalita vody ve zkušebních nádržích: pH, tvrdost, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku.

2.3.4. Výsledky

- výsledky případných předběžných studií stálosti zkoušené látky,
- doklady o tom, že kontrolní skupiny splnily obecné požadavky na přijatelnou míru přežití pro testovací druh (dodatky 2 a 3),
- údaje o mortalitě nebo přežití v embryonálním stadiu a ve stadiu plůdku a údaje o celkové mortalitě nebo přežití,
- doba do vylíhnutí, počty vylíhnutých jedinců,
- údaje o délce (a hmotnosti),
- výskyt a popis morfologických odchylek, vyskytly-li se,
- výskyt a popis účinků na chování, vyskytly-li se,
- statistická analýza a zpracování údajů,
- u zkoušek analyzovaných pomocí ANOVA nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na hladině spolehlivosti $p = 0,05$ a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) pro každou posuzovanou odezvu, včetně popisu použité statistické metody a údaje o tom, jak velký účinek bylo možné zjistit,

▼B

— u zkoušek analyzovaných pomocí regresních metod, hodnoty LC a ECx a intervaly spolehlivosti a graf proložený závislosti použité pro jejich výpočet,

— vysvětlení jakékoli odchylky od této zkušební metody.

3. **LITERATURA**

- 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, str. 60. 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 str.
- 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, 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, str. 328–330.
- 7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, str. 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, str. 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, 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 str.
- 12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.
- 13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482–491.
- 14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼ B

- 15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, str. 321–334.
- 16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, str. 81.
- 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, 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; 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, 19–28.
- 20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- 21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- 22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G., Dean J.H. and Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10, 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 str.
- 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, str. 1–58.

Tabulka 1A

Druhy ryb doporučené pro zkoušku

SLADKOVODNÍ

Oncorhynchus mykiss

pstruh duhový (9, 16)

Danio rerio

danio pruhované (7, 17, 18)

Cyprinus caprio

kapr obecný (8, 19)

Oryzias latipes

halančík japonský (20, 21)

Pimephales promelas

střevle (8, 22)

▼B

Tabulka 1B

Příklady dalších dobře popsáných druhů, které byly rovněž použity

SLADKOVODNÍ	MOŘSKÉ
<i>Carassius auratus</i> karas zlatý (8)	<i>Menidia peninsulae</i> (23, 24, 25)
<i>Lepomis macrochirus</i> slunečnice modrá (8)	<i>Clupea harengus</i> (24, 25) <i>Gadus morhua</i> (24, 25) <i>Cyprinodon variegatus</i> (23, 24, 25)



DODATEK 1

**NÁVOD K PROVEDENÍ ZKOUŠKY TOXICITY NA EMBRYÍCH
A VÁČKOVÝCH PLŮDCÍCH DANIA PRUHOVANÉHO
(BRACHYDANIO RERIO)**

ÚVOD

Danio pruhované pochází z indického pobřeží Coromandel, kde žije v bystřinách. Je běžnou akvarijní rybou z čeledi kaprovitých a informace o péči o něj a o jeho chovu jsou uvedeny v standardních příručkách o tropických rybách. Přehled jeho biologie a použití ve výzkumu ryb podává Laale (1).

Ryba zřídka dorůstá délky více než 45 mm. Má válcové tělo se 7–9 horizontálními tmavě modrými stříbřitými pruhy. Pruhy pokračují přes ocasní a řitní ploutve. Hřbet má olivově zelený. Samečci jsou štíhlejší než samičky. Samičky jsou stříbrnější a mají rozšířené břicho, zejména před třením.

Dospělé ryby dokážou snášet velké kolísání teploty, pH a tvrdosti vody. Mají-li se však získat zdravé ryby poskytující jikry dobré kvality, měly by být zajištěny optimální podmínky.

Při tření sameček sleduje samičku a doráží na ni a při vypuzení jiker je oplodní. Jikry, které jsou průsvitné a nejsou přilnavé, dopadají na dno, kde mohou být pozřeny rodiči. Na tření má vliv světlo. Při odpovídajícím ranním světle se ryby třou v prvních hodinách po rozednění.

Samička může klást v odstupu jednoho týdne dávky o několika stech jiker.

PODMÍNKY PRO MATEČNÉ RYBY, REPRODUKCE A RANÁ ŽIVOTNÍ STADIA

Vybere se vhodný počet zdravých ryb, které se alespoň dva týdny před předpokládaným třením udržují ve vhodné vodě (např. dodatek 4). Skupina ryb by měla mít možnost se před kladením jiker pro zkoušku alespoň jednou vytřít. Hustota obsádky ryb by v tomto období neměla přesáhnout 1 gram ryb na litr. Pravidelná výměna vody nebo použití přečišťovacího systému umožní hustotu zvýšit. Teplota v chovných nádržích se má udržovat na 25 ± 2 °C. Ryby by měly dostávat rozmanitou potravu, která může obsahovat například komerční suché krmivo, čerstvě vylíhnuté žábřonožky (*Artemia*), chironomidy, dafnie, bílé červy rouvice (*Enchytraeids*).

Dále jsou uvedeny dvě metody, které v praxi vedly k dostatečnému množství zdravých oplodněných jiker pro provedení zkoušky:

- i) Osm samiček a 16 samečků se umístí do nádrže obsahující 50 litrů ředící vody a chráněné před přímým světlem a ponechá se alespoň 48 hodin co nejvíce v klidu. Na dno nádrže se odpoledne v den před započatím zkoušky umístí vytírací rošt. Vytírací rošt se skládá z 5–7 cm vysokého rámu (z plexiskla nebo jiného vhodného materiálu) s 2–5 cm hrubým roštem nahoře a s 10–30 µm jemným roštem vespod. Na hrubém roštu je připevněna řada vytíracích stěraců pro kladení jiker z nekrouceného silonového vlákna. Poté, co byly ryby drženy 12 hodin v temnu, se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Dvě až čtyři hodiny po vytření se vytírací rošt vyjme a jikry se seberou. Vytírací rošt zabrání rybám v požívání jiker a zároveň umožní snadný sběr jiker. Skupina ryb by se měla před třením určeným k produkci jiker pro zkoušku vytřít alespoň jednou.

▼B

- ii) Pět až deset samečků a samic se alespoň dva týdny před zamýšleným třením chová odděleně. Po 5 až 10 dnech se břicha samic rozšíří a zviditelní se jejich genitální papily. Samečci papily nemají. Tření se provede v nádržích pro tření opatřených falešným dnem z pletiva (jako výše). Nádrž se naplní ředící vodou tak, aby voda sahala 5–10 cm nad dno. Jedna samička a dva samečci se umístí do nádrže den před zamýšleným třením. Teplota vody se postupně zvýší jeden stupeň nad aklimatizační teplotu. Vypne se osvětlení a nádrž se ponechá co nejvíce v klidu. Ráno se slabě nasvítí, čímž se vyvolá tření. Po 2–4 hodinách se ryby vyjmou a jikry se seberou. Je-li potřeba více dávek jiker, než lze získat od jedné samičky, nasadí se paralelně dostatečný počet nádrží pro tření. Zaznamenáním úspěšnosti (množství a kvality) reprodukce jednotlivých samic před zkouškou lze vybrat pro chov samičky s nejvyšší úspěšností.

Jikry se přenesou do zkušební nádrže skleněnou trubičkou (o vnitřním průměru ne menším než 4 mm) opatřenou pružným nasávacím balónekem. Množství vody, které se přenáší s jikrami, by mělo být co nejmenší. Jikry jsou těžší než voda a z trubičky vypadnou. Je třeba zabránit tomu, aby jikry (a plůdky) přišly do kontaktu se vzduchem. Provede se mikroskopické vyšetření vzorku (vzorků) jiker, aby se ověřilo, že v prvních stádiích vývoje nedošlo k nepravdělnostem. Dezinfekce jiker není přípustná.

Mortalita jiker je nejvyšší během prvních 24 hodin po oplodnění. V této době je často pozorována mortalita 5–40 %. Jikry degenerují v důsledku neúspěšného oplodnění nebo vývojových vad. Zdá se, že kvalita jiker závisí na samičce, neboť některé samičky soustavně kladou jikry dobré kvality, jakou jiné samičky neposkytují. Rovněž rychlost vývoje a líhnutí se mezi jednotlivými soubory liší. Úspěšně oplodněné jikry a plůdky se žlutkovým váčkem přežívají dobře, obvykle jich přežívá více než 90 %. Při 25 °C se z jiker líhnou jedinci po 3–5 dnech po oplodnění a žlutkový váček je absorbován přibližně po 13 dnech po oplodnění.

Embryonální vývoj byl dobře definován Hisaokou a Battlem (2). Díky průsvitnosti jiker a plůdků čerstvě po vylíhnutí lze vývoj ryb dobře sledovat a lze pozorovat malformace. Přibližně čtyři hodiny po vytření lze rozlišit neoplozené jikry od oplodněných (3). K tomuto vyšetření se jikry a plůdky umístí do nádobky o malém objemu a prohlížejí se pod mikroskopem.

Zkušební podmínky požadované pro raná životní stadia jsou uvedeny v dodatku 2. Optimální hodnoty pH a tvrdosti vody jsou 7,8 a 250 mg/l, vyjádřeno jako CaCO₃.

VÝPOČTY A STATISTIKA

Navrhuje se dvoufázový postup. V první fázi se statisticky analyzují údaje o mortalitě, nenormálním vývoji a době líhnutí. Poté se pro ty koncentrace, při nichž nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky na tyto parametry, statisticky vyhodnotí tělesná délka. Tento postup se doporučuje, neboť toxická látka může selektivně usmrcovat menší ryby, prodlužovat dobu líhnutí a indukovat viditelné malformace, a tedy zkreslovat výsledky měření délky. Kromě toho tak bude pro každou expozici měřen zhruba stejný počet ryb, čímž se zajistí validita statistiky zkoušky.

▼ BSTANOVENÍ LC₅₀ A EC₅₀

Procento přežití jiker a plůdků se vypočte a zkoriguje na mortalitu v kontrolních skupinách podle Abbottovy rovnice (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

kde,

P = = korigované procento přežití,

P' = = procento přežití pozorované ve zkoušené koncentraci,

C = = procento přežití v kontrolní skupině.

Podle možnosti se vhodnou metodou stanoví hodnota LC₅₀ na konci zkoušky.

Požaduje-li se, aby byly do statistiky pro EC₅₀ zahrnuty morfologické odchylky, lze k tomu nalézt návod v práci Stephana (5).

ODHAD LOEC A NOEC

Cílem zkoušky na jikrách a váčkových plůdcích je porovnat koncentrace, u nichž nebyl účinek nulový, s kontrolními skupinami, tj. stanovit LOEC. Použijí se tedy metody vícenásobného srovnání (6, 7, 8, 9, 10).

LITERATURA

- 1) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 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, str. 311.
- 3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, str. 173–181.
- 4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, str. 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, str. 69–81.
- 6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, str. 1096–1121.
- 7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 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, str. 103–117.
- 9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, str. 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.

DODATEK 2

ZKUŠEBNÍ PODMÍNKY, DÉLKA ZKOUŠKY A KRITÉRIA PŘEŽITÍ PRO DOPORUČENÉ DRUHY

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (H)	Délka stadií (D)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %)	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
Sladkovodní <i>Brachydanio rerio</i> Danio pruhovaný	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Pokud možno ihned od oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (8–10 dnů)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> pstruh duhový	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	—	0 ^(a)	30–35	25–30	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 20 dnů po vylíhnutí (50–55 dnů)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> kapr obecný	21–25	—	12–16	5	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8–9 dnů)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> halančík japonský	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	—	12–16	8–11	4–8	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (13–16 dnů)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> střevle	25 ± 2	—	16	4–5	5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (8–9 dnů)	60	70

⁽¹⁾ Pro embrya.

⁽²⁾ Pro plůdky.

^(a) Temno pro embrya a plůdky do jednoho týdne po vylíhnutí, s výjimkou doby prohlídky. Poté po dobu zkoušky tlumené světlo.

DODATEK 3

Zkušební podmínky, délka zkoušky a kritéria přežití pro jiné dobře popsané druhy

Druh	Teplota (°C)	Salinita (‰)	Fotoperioda (H)	Délka stadií (D)		Typická délka zkoušky	Přežití v kontrolních skupinách (minimální hodnota v %)	
				Embryo	Váčkový plůdek		Úspěšnost líhnutí	Po vylíhnutí
Sladkovodní								
<i>Carassius auratus</i> karas zlatý	24 ± 1	—	—	3 — 4	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	80
<i>Leopomis macrochirus</i> slunečnice modrá	21 ± 1	—	16	3	> 4	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4 dnů po vylíhnutí (7 dnů)	—	75
Mořský								
<i>Menidia peninsulae</i>	22 – 25	15 – 22	12	1,5	10	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 5 dnů po vylíhnutí (6–7 dnů)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Sled' obecný	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (23–27 dnů)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Treska obecná	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 3 dnů po vylíhnutí (18 dnů)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i>	25 ± 1	15 – 30	12	–	—	Pokud možno ihned po oplodnění (od raného stadia gastruly) do 4/7 dnů po vylíhnutí (28 dnů)	> 75	80

▼B*DODATEK 4***NĚKTERÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PŘIJATELNÉ
ŘEDICÍ VODY**

Látka	Koncentrace
Nerozpuštěné látky	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Volný amoniak	< 1 µg/l
Zbytkový chlor	< 10 µg/l
Celkové organofosforové pesticidy	< 50 ng/l
Celkové organochlorové pesticidy a polychlorované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlor	< 25 ng/l

▼B**C.16. ZKOUŠKA AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITY PRO VČELU MEDONOSNOU****1. METODA**

Tato metoda zkoušky akutní toxicity je replikou metody OECD TG 213 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení orální akutní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dělnice včely medonosné (dospělce).

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní orální toxicity pro včelu medonosnou, např. je-li expozice včel dané chemické látky pravděpodobná. Zkouška akutní orální toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro definování potřeby dalšího hodnocení. The results of this test should be used to define the need for further evaluation. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. 1.) nebo ve formě finálně upravených přípravků.

K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušební postupu se použije standard toxicity.

1.2. DEFINICE

Akutní orální toxicita: jsou nepříznivé účinky, ke kterým dojde nejpozději do 96 hodin od orálního podání jediné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství požití zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho testovacího živočicha (v μg na včelu). Skutečnou dávku u každé včely nelze vypočítat, neboť se včely krmí vzájemně, lze však odhadnout průměrnou dávku (celkově odebrané množství zkoušené látky dělené počtem včel v jedné kličce).

LD₅₀ (střední letální dávka) orálně je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po orálním podání způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD₅₀ se vyjadřuje v μg zkoušené látky na jednu včelu. U pesticidů může být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. 1.), nebo finálně upravený přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulého, je-li zcela nepohyblivý.

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) (dospělci) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozptýlené v cukerném roztoku. Včely jsou poté krmeny stejným roztokem neobsahujícím zkoušenou látku. Mortalita se zaznamenává denně během alespoň 48 hodin a porovnává se s kontrolními hodnotami. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje, zatímco mortalita v kontrolních skupinách zůstává na přijatelné úrovni, tj. ≤ 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD₅₀ pro 24 hodin a 48 hodin a v případě prodloužené studie pro 72 hodin a 96 hodin.

▼ B

1.4. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

— průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,

— LD₅₀ pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu.

1.5. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1. **Sběr včel**

Použijí se mladušky téhož plemena, tj. včely stejného stáří, téže funkce vzhledem ke krmení plodu atd. Včely by měly být získány z dobře potravou zásobených zdravých, pokud možno chorob prostých včelstev, s kladoucí matkou, se známým původem, chovem a fyziologickým stavem. Měly by být sesbírány ráno v den zkoušky nebo by měly být sesbírány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely sesbírané z rámků bez plodů. Včely by neměly být sbírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť během těchto období mají změněnou fyziologii. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, mohou se včely vylihnout v inkubátoru a chovat s „včelím chlebem“ (na plástovém pylu) a s cukerným roztokem. Včely ošetřené chemickými látkami, jako jsou antibiotika, prostředky proti varroatoze atd., by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

1.5.2. **Podmínky chovu a krmení**

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z korozi-vzdorné oceli, drátěného pletiva, plastu nebo jednorázově použitelné dřevěné klícky atd. Dává se přednost skupinám po 10 včelách. Velikost zkušebních klícek by měla vyhovovat počtu včel, tj. měla by poskytovat dostatek prostoru.

Včely by měly být přechovávány ve tmě v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50–70 %. Zacházení se včelami, včetně ošetřování a pozorování, může být prováděno za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný cukerný roztok o konečné koncentraci 500 g/l (50 % m/V). Po podání zkušebních dávek se podává potrava *ad libitum*. Systém krmení by měl umožňovat zaznamenání příjmu potravy pro každou klíčku (viz bod 1.6.3.1). Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

1.5.3. **Příprava včel**

Sesbírané včely se náhodně umístí do klícek, které se náhodně rozmístí v experimentální místnosti.

▼B

Před začátkem zkoušky mohou včely až 2 hodiny hladovět. Doporučuje se, aby nebyla včelám před expozicí podávána potrava, aby byly na začátku zkoušky rovnocenné, pokud jde o obsah zaživacího ústrojí. Hynoucí včely se před zahájením zkoušky odstraní a nahradí zdravými včelami.

1.5.4. Příprava dávek

Je-li zkoušená látka mísitelná s vodou, může být rozptýlena přímo v 50 % cukerném roztoku. U technických přípravků a látek s nízkou rozpustností ve vodě mohou být použity nosiče, jako jsou organická rozpouštědla, emulgátory nebo dispergátory s nízkou toxicitou pro včely (např. aceton, dimethylformamid, dimethylsulfoxid). Koncentrace nosiče závisí na rozpustnosti zkoušené látky a měla by být stejná pro všechny zkušební koncentrace. Obecně je vhodná 1 % koncentrace nosiče a neměla by být překračována.

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpuštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: roztok ve vodě a cukerný roztok s rozpouštědlem/nosičem v koncentraci použité v dávkování.

1.6. POSTUP**1.6.1. Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich opakování by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD_{50} na hladině spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět dávek tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD_{50} . Faktor ředění a počet koncentrací pro dávkování se však stanoví s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávkováni versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné koncentrace pro dávkování je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem souběžným zkušební skupinám o 10 včelách. Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Nasadí se také zkušební skupiny pro použítá rozpouštědla nebo nosiče (viz bod 1.5.4).

1.6.2. Standard toxicity

Do série zkoušení se zařadí standard toxicity. Zvolí se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD_{50} . Pro každou zkoušenou dávku se použijí alespoň tři klícky po deseti včelách, tj. tři opakování. Přednostním standardem toxicity je dimethoát, pro nějž se uvádí LD_{50} 24 hodin, orálně v rozmezí 0,10–0,35 μg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné standardy toxicity, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

▼ B**1.6.3. Expozice****1.6.3.1. Podávání dávek**

Každé zkušební skupině včel se musí poskytnout 100–200 µl 50 % vodného cukerného roztoku obsahujícího zkoušenou látku ve vhodné koncentraci. Větší objem je nezbytný u látek s nízkou rozpustností, nízkou toxicitou nebo nízkou koncentrací ve formulaci, neboť v cukerném roztoku musí být použit větší podíl. Sleduje se množství potravy se zkoušenou látkou odebrané zkušební skupinou. Po spotřebování potravy (obvykle do 3–4 hodin) se z klícky odebere krmítko a nahradí se krmítkem obsahujícím pouze cukerný roztok. Cukerný roztok se poté poskytne *ad libitum*. Vysoké koncentrace některých sloučenin mohou působit odpudivě. To má za následek, že je přijímáno málo potravy, nebo že se žádná potrava neodebere. Po maximálně 6 hodinách se nespotebovaná potrava se zkoušenou látkou nahradí samotným cukerným roztokem. Stanoví se množství spotřebované potravy se zkoušenou látkou (např. měřením objemu nebo zvážením neodebrané potravy).

1.6.3.2. Délka trvání zkoušky

Upřednostňuje se délka trvání zkoušky 48 hodin od okamžiku, kdy byl zkušební roztok nahrazen samotným cukerným roztokem. Jestliže se mortalita po prvních 24 hodinách zvyšuje o více než 10 %, zkouška se prodlouží maximálně na 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekročí 10 %.

1.6.4. Pozorování

Mortalita se zaznamená po 4 hodinách od zahájení zkoušky a poté po 24 hodinách a 48 hodinách (rozumí se po podání dávky). Je-li nezbytné pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech maximálně do 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Odhadne se množství spotřebované potravy na jednu skupinu. Porovnáním rychlosti spotřebování potravy se zkoušenou látkou a bez ní lze získat informaci o chutnosti potravy se zkoušenou látkou.

Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

1.6.5. Limitní zkouška

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 µg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD₅₀ je vyšší než tato hodnota. Při ní se postupuje stejným způsobem, tj. nasadí se tři souběžné zkušební skupiny pro každou zkušební dávku, odpovídající kontrolní skupiny, stanoví se množství spotřebované potravy s účinnou látkou a použije se standard toxicity. Dojde-li k úhynům, měla by se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

▼ B**2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ****2.1. ÚDAJE**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny se standardem toxicity uvede počet použitých včel, mortalita v každé době pozorování a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky závislosti dávka-reakce pro každou dobu pozorování a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD_{50}) s 95 % intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu v kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). Pokud nebyla potrava se zkoušenou látkou zcela odebrána, stanoví se spotřebovaná dávka zkoušené látky na skupinu. LD_{50} se vyjádří v μg zkoušené látky na včelu.

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1. Zkoušená látka:

- fyzikální stav a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),
- údaje o chemické identifikaci včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identifikace a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

2.2.2. Testovací druh:

- vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda sběru včel, datum sběru,
- informace o včelstvech použitých pro sběr testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o všech ošetřeních před pokusem atd.,

2.2.3. Zkušební podmínky:

- teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,
- podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klícek,
- metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků (je-li použito, uvede se rozpouštědlo a jeho koncentrace),
- metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (je-li použito rozpouštědlo, musí být uvedeno, včetně koncentrace), uspořádání zkoušky, např. použité zkušební koncentrace a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou koncentraci a kontrolu počet paralelních klícek a počet včel na klíčku,
- datum zkoušky.

▼ B2.2.4. **Výsledky:**

- výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,
- nekorigované údaje: mortalita pro každou zkoušenou dávku v každé době pozorování,
- graf křivek závislosti dávka-reakce na konci zkoušky,
- hodnoty LD₅₀ intervaly spolehlivosti pro každý doporučený čas pozorování, a to pro zkoušenou látku a standard toxicity,
- statistické metody použité pro stanovení LD₅₀,
- mortalita v kontrolních skupinách,
- jiné pozorované nebo naměřené biologické účinky, např. neobvyklé chování včel (včetně odmítnutí zkušební dávky), rychlost odebrání potravy v exponovaných a neexponovaných skupinách,
- jakákoli odchylka od zde popsaného zkušební postupu a jiné důležité informace.

3. **LITERATURA**

- 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, 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, 119–125.
- 3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 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, 265–267.

▼B**C.17. VČELA MEDONOSNÁ – ZKOUŠKA AKUTNÍ KONTAKTNÍ TOXICITY****1. METODA**

Tato metoda zkoušky akutní toxicity je replikou metody OECD TG 214 (1998).

1.1. ÚVOD

Tato zkouška toxicity je laboratorní metodou určenou k posouzení akutní kontaktní toxicity přípravků na ochranu rostlin a jiných chemických látek pro dělnice včely medonosné (dospělce).

Při posuzování a hodnocení toxických charakteristik látek může být nezbytné stanovení akutní kontaktní toxicity pro včelu medonosnou, např. je-li expozice včel dané chemické látky pravděpodobná. Zkouška akutní kontaktní toxicity se provádí s cílem stanovit vlastní toxicitu pesticidů a jiných chemických látek pro včely. Výsledky této zkoušky by měly být použity pro definování potřeby dalšího hodnocení. Tato metoda může být použita zejména ve stupňovaných programech hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro včely založených na postupném přechodu od laboratorních zkoušek k semi-polním a polním experimentům (1). Pesticidy mohou být zkoušeny ve formě účinné látky (ú. 1.) nebo ve formě finálně upravených přípravků.

K ověření citlivosti včel a přesnosti zkušebního postupu se použije standard toxicity.

1.2. DEFINICE

Akutní kontaktní toxicita: je nepříznivý účinek, ke kterému dojde nejpozději do 96 hodin od topikální aplikace jedné dávky zkoušené látky.

Dávka: je množství aplikované zkoušené látky. Dávka se vyjadřuje v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho testovacího živočicha (v μg na včelu).

LD₅₀ (střední letální dávka) kontaktně: je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po kontaktní aplikaci způsobit úhyn 50 % jedinců. Hodnota LD₅₀ se vyjadřuje v μg zkoušené látky na jednu včelu. U pesticidů může být zkoušenou látkou buď účinná látka (ú. 1.), nebo finálně upravený přípravek obsahující jednu nebo více účinných látek.

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulého, je-li zcela nepohyblivý.

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Dělnice včely medonosné (*Apis mellifera*) (dospělci) se exponují řadě dávek zkoušené látky rozpuštěné ve vhodném nosiči přímou aplikací na torax (jako kapičky). Zkouška trvá 48 hodin. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje, zatímco mortalita v kontrolních skupinách zůstává na přijatelné úrovni, tj. < 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin. Mortalita se zaznamenává denně a porovnává se s kontrolními hodnotami. Výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD₅₀ pro 24 hodin a 48 hodin a v případě prodloužené studie pro 72 hodin a 96 hodin.

▼ B

1.4. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

- průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %,
- LD₅₀ pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu.

1.5. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.5.1. Sběr včel

Použijí se mladušky téhož plemena, tj. včely stejného stáří, téže funkce vzhledem ke krmení plodu atd. Včely by měly být získány z dobře potravou zásobených zdravých, pokud možno chorob prostých včelstev, s kladoucí matkou, se známým původem, chovem a fyziologickým stavem. Měly by být sesbírány ráno v den zkoušky nebo by měly být sesbírány večer před zkouškou a drženy v podmínkách zkoušky do příštího dne. Vhodné jsou včely sesbírané z rámků bez plodů. Včely by neměly být sbírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim, neboť během těchto období mají změněnou fyziologii. Musí-li být zkoušky provedeny brzy na jaře nebo pozdě na podzim, mohou se včely vylihnut v inkubátoru a chovat s „včelím chlebem“ (na plástovém pylu) a s cukerným roztokem. Včely ošetřené chemickými látkami, jako jsou antibiotika, prostředky proti varroatoze atd., by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyři týdny od konce posledního ošetření.

1.5.2. Podmínky chovu a krmení

Použijí se snadno čistitelné a dobře větrané klícky. Lze použít jakýkoli vhodný materiál, např. klícky z koroziivzdorné oceli, drátěného pletiva, plastu nebo dřevěné klícky na jednorázové použití atd. Velikost zkušebních klíček by měla vyhovovat počtu včel, tj. klícky by měly poskytovat dostatek prostoru. Dává se přednost skupinám po 10 včelách.

Včely by měly být přechovávány ve tmě v experimentální místnosti při teplotě 25 ± 2 °C. Po dobu zkoušky se zaznamenává relativní vlhkost, která je obvykle 50–70 %. Zacházení se včelami, včetně ošetřování a pozorování, může být prováděno za (denního) světla. Jako potrava se používá vodný cukerný roztok o konečné koncentraci 500 g/l (50 % m/V) a podává se za použití krmítka včel po dobu zkoušky *ad libitum*. Lze použít skleněnou trubičku (přibližně 50 mm dlouhou, s průměrem 10 mm, zúženou na otevřeném konci na průměr asi 2 mm).

1.5.3. Příprava včel

Sesbírané včely mohou být za účelem aplikace zkoušené látky narkotizovány oxidem uhličitým nebo dusíkem. Množství anestetika v době expozice by mělo být minimalizováno. Hynoucí včely se před zahájením zkoušky odstraní a nahradí zdravými včelami.

1.5.4. Příprava dávek

Zkoušená látka se aplikuje jako roztok v nosiči, tj. v organickém rozpouštědle nebo jako vodný roztok se smáčedlem. Jako organické rozpouštědlo se upřednostňuje aceton, mohou však být použita i jiná rozpouštědla s nízkou toxicitou pro včely (např. dimethylformamid, dimethylsulfoxid). U finálně upravených přípravků dispergovaných ve vodě a u silně polárních organických látek nerozpustných v organických nosičových rozpouštědlech lze aplikaci usnadnit jejich rozpuštěním ve slabém roztoku komerčního smáčedla (např. smáčedla Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

▼ B

Připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpuštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: jedna ošetřená vodou a jedna rozpouštědlem/dispergátorem.

1.6. POSTUP**1.6.1. Zkušební a kontrolní skupiny**

Počet zkoušených dávek a jejich opakování by měl splňovat statistické požadavky na stanovení LD₅₀ na hladině spolehlivosti 95 %. Zpravidla se pro zkoušku požaduje alespoň pět dávek tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD₅₀. Počet dávek se však musí stanovit s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků. Vhodné dávky je možné zvolit pomocí orientační zkoušky.

Každá zkušební koncentrace se podá alespoň třem souběžným zkušební skupinám o 10 včelách.

Vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň tři kontrolní skupiny, každá o 10 včelách. Je-li použito organické rozpouštědlo nebo smáčedlo, musí se zařadit další tři kontrolní skupiny po 10 včelách pro rozpouštědlo a smáčedlo.

1.6.2. Standard toxicity

V rámci zkušebních skupin musí být použit standard toxicity. Zvolí se alespoň tři dávky pokrývající očekávanou hodnotu LD₅₀. Pro každou zkoušenou dávku se použijí alespoň tři klíčky po deseti včelách, tj. tři opakování. Upřednostňovaným standardem toxicity je dimethoát, pro nějž se uvádí LD₅₀ 24 hodin, kontaktně v rozmezí 0,10–0,30 µg účinné látky na včelu (2). Jsou však přijatelné i jiné standardy toxicity, pokud lze předložit dostatek údajů pro ověření očekávané reakce na dávku (např. parathion).

1.6.3. Expozice**1.6.3.1. Podávání dávek**

U narkotizovaných včel se jednotlivě provede topikální aplikace. Včely se náhodně rozdělí do různých zkušebních a kontrolních skupin. Objem 1 µl roztoku obsahujícího zkoušenou látku ve vhodné koncentraci se aplikuje mikroaplikátorem na dorsální stranu thoraxu každé včely. Mohou být použity i jiné objemy, je-li to opodstatněné. Po aplikaci se včely umístí do zkušebních klíček a zásobí se cukerným roztokem.

1.6.3.2. Délka doby trvání zkoušky

Upřednostňuje se délka doby trvání zkoušky 48 hodin. Jestliže se mortalita mezi 24 a 48 hodinami zvyšuje o více než 10 %, je vhodné zkoušku prodloužit maximálně na 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje ≤ 10 %.

▼B**1.6.4. Pozorování**

Mortalita se zaznamená po 4 hodinách od aplikace a poté po 24 hodinách a 48 hodinách. Je-li nezbytné dobu pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech maximálně do 96 hodin, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekračuje 10 %.

Zaznamená se neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky.

1.6.5. Limitní zkouška

V některých případech (např. očekává-li se u látky nízká toxicita) může být provedena limitní zkouška za použití 100 µg účinné látky na včelu s cílem prokázat, že LD₅₀ je vyšší než tato hodnota. Postupuje se stejným způsobem, včetně nasazení tří souběžných zkušebních skupin pro každou zkušební dávku, tj. tří opakování, odpovídajících kontrolních skupin a použití standardu toxicity. Dojde-li k úhynům, měla by se provést úplná studie. Jsou-li pozorovány subletální účinky (viz bod 1.6.4), zaznamenají se.

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**2.1. ÚDAJE**

Údaje se shrnou do tabulky, přičemž se pro každou zkušební skupinu, kontrolní skupiny a skupiny se standardem toxicity uvede počet použitých včel, mortalita v každé době pozorování a počet včel s nepříznivě ovlivněným chováním. Údaje o mortalitě se analyzují vhodnými statistickými metodami (např. probitovou analýzou, klouzavým průměrem, proložením binomického rozdělení) (3, 4). Sestrojí se křivky závislosti dávka-reakce pro každou dobu pozorování (tj. 24 hodin, 48 hodin a podle potřeby 72 hodin, 96 hodin) a vypočtou se směrnice křivek a střední letální dávky (LD₅₀) s 95 % intervalem spolehlivosti. Korekce na mortalitu v kontrolních skupinách lze provést Abbottovou korekcí (4, 5). LD₅₀ se vyjádří v µg zkoušené látky na včelu.

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

2.2.1. Zkoušená látka:

- fyzikální stav a fyzikálně-chemické vlastnosti (např. stálost ve vodě, tlak par),
- údaje o chemické identifikaci včetně strukturního vzorce, čistota, (tj. u pesticidů identifikace a koncentrace účinné látky (účinných látek)).

2.2.2. Testovací druh:

- vědecký název, plemeno, přibližné stáří (v týdnech), metoda sběru včel, datum sběru,
- informace o včelstvech použitých pro sběr testovacích včel, včetně informací o zdravotním stavu, nemocech dospělců, o všech ošetřeních před pokusem atd.,

▼ B**2.2.3. Zkušební podmínky:**

- teplota a relativní vlhkost v experimentální místnosti,
- podmínky chovu včetně typu, velikosti a materiálu klíček,
- metody aplikace zkoušené látky, např. použité nosičové rozpouštědlo, aplikovaný objem zkušební roztoku, použitý narkotizační prostředek,
- uspořádání zkoušky, např. použité zkoušené dávky a jejich počet, počet kontrolních skupin, pro každou dávku a kontrolu počet paralelních klíček, tj. opakování, a počet včel na klikku,
- datum zkoušky.

2.2.4. Výsledky:

- výsledky předběžné orientační zkoušky, byla-li provedena,
- primární údaje: mortalita pro každou zkoušenou dávku v každém čase pozorování,
- graf křivek závislosti dávkareakce na konci zkoušky,
- hodnoty LD₅₀ s 95 % intervaly spolehlivosti pro každou doporučenou dobu pozorování, a to pro zkoušenou látku a standard toxicity,
- statistické metody použité pro stanovení LD₅₀,
- mortalita v kontrolních skupinách,
- jiné pozorované nebo změřené biologické účinky a jakékoli neobvyklé reakce včel,
- jakákoli odchylka od zde popsaného zkušební postupu metody a jiné důležité informace.

3. LITERATURA

- 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, 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, 119–125.
- 3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 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, 265–267.

▼ B**C.18. STANOVENÍ ADSORPCE/DESORPCE ŠARŽOVITOU ROVNOVÁŽNOU METODOU****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 106 pro stanovení půdní adsorpce/desorpce šaržovitou rovnovážnou metodou (2000).

1.1. ÚVOD

Tato metoda se opírá o okružní testy a seminář o výběru půd pro vývoj zkoušky adsorpce (1, 2, 3, 4) a rovněž o existující metodiky na vnitrostátní úrovni (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Studie adsorpce/desorpce jsou užitečné pro získávání důležitých informací o mobilitě a distribuci chemických látek v půdních, vodních a vzdušných složkách biosféry (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Informace lze použít k předpovědi nebo odhadu například dostupnosti chemické látky pro odbourávání (22, 23), transformaci a příjem organismy (24), vymývání půdním profilem (16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28), vytěkávání z půdy (21, 29, 30) a odtékání z půdního povrchu do vod (18, 31, 32). Údaje o adsorpci lze použít pro účely porovnání a modelování (19, 33, 34, 35).

Distribuce chemické látky mezi půdu a vodnou fázi je složitý proces, který závisí na řadě různých faktorů: na chemické povaze látky (12, 36, 37, 38, 39, 40), na charakteristikách půdy (4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) a na klimatických faktorech, jako jsou dešťové srážky, teplota, sluneční svit a vítr. Četné jevy a mechanismy při adsorpci chemické látky v půdě tedy nelze v celém rozsahu definovat zjednodušeným laboratorním modelem, jakým je tato metoda. Přestože nelze tímto pokusem zahrnout všechny možné případy z životního prostředí, poskytuje hodnotné informace o významnosti adsorpce chemické látky z hlediska životního prostředí.

Viz také Obecný úvod.

1.2. ROZSAH

Tato metoda je zaměřena na odhad adsorpčního/desorpčního chování látky v půdách. Cílem je získat sorpční hodnoty, které lze použít pro předpověď distribuce za mnoha podmínek v životním prostředí; k tomuto účelu se pro chemickou látku stanovují rovnovážné adsorpční koeficienty v různých půdách jako funkce půdních charakteristik (např. obsahu organického uhlíku, obsahu jílu, půdní struktury a pH). Pro co nejširší podchycení interakcí dané látky s půdami vyskytujícími se v přírodě musí být použity různé druhy půd.

Při této metodě vyjadřuje adsorpce proces vázání chemické látky na půdní povrch; nerozlišuje se mezi různými adsorpčními procesy (fyzikální a chemickou adsorpcí) a procesy, jako jsou povrchově katalyzované odbourávání, adsorpce hmotou nebo chemická reakce. Adsorpce na koloidních částicích (průměr < 0,2 μm) vznikajících v půdě se nebere v úvahu.

▼B

Půdními parametry, které jsou považovány za nejdůležitější, jsou: obsah organického uhlíku (3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48), obsah jílů a půdní struktura (3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) a pro ionizovatelné sloučeniny také pH (3, 4, 42). Dalšími půdními parametry, které mohou mít vliv na adsorpci/desorpci určité látky jsou efektivní kationtová výměnná kapacita (ECEC), obsah amorfních oxidů železa a hliníku, zejména u vulkanických a tropických půd (4) a rovněž specifický povrch (49).

Zkouška je navržena pro vyhodnocení adsorpce chemické látky na různých druzích půd s proměnlivým obsahem organického uhlíku, jílů, proměnlivou půdní strukturou a proměnlivým pH. Je trojstupňová:

Stupeň 1: Předběžná studie pro stanovení:

- poměru půda/roztok,
- rovnovážné adsorpční doby a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze,
- adsorpce zkoušené látky na povrchu zkušební nádoby a stálosti zkoušené látky po dobu zkoušky.

Stupeň 2: Screeningová zkouška: adsorpce je studována v pěti různých typech půd měřením adsorpční kinetiky při jedné koncentraci zkoušené látky a stanovením distribučních koeficientů K_d a K_{ou} .

Stupeň 3: Stanovení Freundlichových adsorpčních isotherm za účelem zjištění vlivu koncentrace na rozsah adsorpce v půdách.

Studie desorpce měřením desorpční kinetiky/- Freundlichových desorpčních isotherm (dodatek 1).

1.3. DEFINICE A JEDNOTKY

Symbol	Definice	Jednotky
A_{t_i}	procento adsorpce v čase t_i	%
A_{eq}	procento adsorpce při adsorpční rovnováze	%
$m_p^{ads}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v čase t_i	μg
$m_p^{ads}(\Delta t_i)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v časovém intervalu Δt_i	μg
$m_p^{ads}(eq)$	hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze	μg
m_0	hmotnost zkoušené látky ve zkušební nádobce na začátku adsorpční zkoušky	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky naměřené v podílu (v_a^A)	μg
$m_{vod}^{ads}(eq)$	hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze	μg
$m_{p\ddot{u}da}$	množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti půdy	g

▼ B

Symbol	Definice	Jednotky
$C_{z\acute{a}s}$	hmotnostní koncentrace zásobního roztoku látky	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$
C_0	počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$
$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase t_i , kdy je prováděna analýza	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$
$C_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	množství látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze	$\mu\text{g}/\text{g}$
$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$
V_0	počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou během adsorpční zkoušky	cm^3
v_a^A	objem podílu, ve kterém je látka stanovována	cm^3
K_d	distribuční koeficient pro adsorpci	cm^3/g
K_{ou}	adsorpční koeficient normalizovaný na organický uhlík	cm^3/g
K_{om}	distribuční koeficient normalizovaný na obsah organických látek	cm^3/g
$K_{\text{F}}^{\text{ads}}$	Freundlichův adsorpční koeficient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlichův exponent	
D_{t_i}	procento desorpce v čase t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	procento desorpce v časovém intervalu Δt_i	%
K_{des}	zdánlivý desorpční koeficient	cm^3/g
$K_{\text{F}}^{\text{des}}$	Freundlichův desorpční koeficient	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)$	hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i	μg
$m_{\text{p}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$	hmotnost látky, která zůstává adsorbovaná v půdě po uplynutí časového intervalu Δt_i	μg
$m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq})$	analyticky stanovená hmotnost látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	μg
$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	μg
$m_{\text{p}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$	hmotnost látky, která zůstává adsorbovaná v půdě po uplynutí časového intervalu	μg
m_{vod}^A	hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze	μg
$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq})$	množství zkoušené látky, které zůstalo adsorbované v půdě při desorpční rovnováze	$\mu\text{g}/\text{g}$

▼ B

Symbol	Definice	Jednotky
$C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$	hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$
V_T	celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou při měření desorpční kinetiky sériovou metodou	cm^3
V_R	objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku CaCl_2	cm^3
V_a^D	objem podílu odebraného k analýze od okamžiku t_i při měření desorpční kinetiky provedeného sériovou metodou	cm^3
V_r^i	objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby (i) ke stanovení zkoušené látky při měření desorpční kinetiky (paralelní metoda)	cm^3
V_r^F	objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby ke stanovení zkoušené látky při desorpční rovnováze	cm^3
MB	hmotnostní bilance	%
m_E	celková hmotnost zkoušené látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádoby ve dvou stupních	μg
V_{rec}	objem supernatantu získaný po dosažení adsorpční rovnováhy	cm^3
P_{ov}	rozdělovací koeficient oktanol/voda	
$\text{p}K_a$	disociační konstanta	
S_v	rozpuštěnost ve vodě	g/l

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Známé objemy roztoků zkoušené látky isotopově značené nebo neznačené, o známé koncentraci, se v 0,01 M CaCl_2 přidají k půdním vzorkům o známé suché hmotnosti, které byly předem uvedeny do rovnováhy s 0,01 M CaCl_2 . Směs se přiměřenou dobu míchá. Půdní suspence se poté oddělí centrifugací a popřípadě zfiltruje a vodná se fáze se analyzuje. Množství zkoušené látky adsorbované v půdním vzorku se vypočte z rozdílu mezi počátečním množstvím zkoušené látky v roztoku a množstvím, které v něm zbylo na konci experimentu (nepřímá metoda).

Alternativně lze adsorbované množství zkoušené látky stanovit také přímo analýzou půdy (přímá metoda). Tato metoda, která zahrnuje postupnou extrakci vhodným rozpouštědlem, se doporučuje v případech, kdy nelze přesně stanovit rozdíl koncentrací látky v roztocích. Jde například o tyto případy: adsorpce zkoušené látky na stěnách zkušebních nádobek, nestálost zkoušené látky vzhledem k délce experimentu, nízká adsorpce s malou změnou koncentrace v roztoku a vysoká adsorpce, jejímž důsledkem je nízká koncentrace, kterou nelze přesně stanovit. Použije-li se látka isotopově značená, lze se extrakcí půdy vyhnout analýzou půdní fáze spálením a počítáním scintilací v roztoku. To je však nespecifická technika, která nerozlišuje mezi výchozími a transformačními produkty; měla by tedy být použita pouze tehdy, je-li zkoušená chemická látka po dobu studie stálá.

▼ B

1.5. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Chemická činidla musí mít analytickou čistotu. Doporučuje se použití radioisotopově neznačených zkoušených látek se známým složením a alespoň 95 % čistotou, nebo značených zkoušených látek, které mají známé složení a jsou isotopově čisté. U značených atomů s krátkým poločasem musí být provedena korekce na rozpad.

Před prováděním zkoušek adsorpce a desorpce by měly být o zkoušené látce známy tyto informace:

- a) rozpustnost ve vodě (A.6);
- b) tlak par (A.4) a/nebo Henryho konstanta;
- c) abiotický rozklad: hydrolýza jako funkce pH (C.7);
- d) rozdělovací koeficient (A.8);
- e) snadná biologická rozložitelnost (C.4) nebo aerobní a anaerobní transformace v půdě;
- f) pKa ionizovatelných látek;
- g) přímá fotolýza ve vodě (tj. UV-Vis absorpční spektrum ve vodě, kvantový výtěžek) a fotodegradace v půdě.

1.6. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Zkouška je použitelná u látek, pro něž existuje analytická metoda s dostatečnou správností. Důležitým parametrem, který může ovlivnit spolehlivost výsledku, zejména při nepřímé metodě, je stálost zkoušené látky po celou dobu zkoušky. Je tedy předpokladem ověřit stálost v předběžné studii; je-li v průběhu zkoušky pozorována přeměna látky, doporučuje se, aby byla v hlavní studii analyzována jak půdní, tak vodná fáze.

Obtíže mohou nastat při provádění této zkoušky u látek s nízkou rozpustností ve vodě ($S_v < 10^{-4}$ g/l) a rovněž u látek s vyšším nábojem v důsledku toho, že koncentraci ve vodné fázi nelze změřit s dostatečnou správností. V těchto případech musí být podniknuty další kroky. Pokyny pro řešení těchto problémů jsou uvedeny v příslušných částech této metody.

Při zkoušení těkavých látek je třeba dbát na to, aby se v průběhu studie předešlo ztrátám.

1.7. POPIS METODY

1.7.1. **Přístroje a pomůcky, chemická činidla**

Standardní laboratorní vybavení, zejména:

- a) Zkumavky nebo nádoby pro provedení experimentů. Je důležité, aby tyto zkumavky nebo nádoby:
 - odpovídaly odstředivce, aby se minimalizovaly nepřesnosti v důsledku manipulace a přenášení,
 - byly z inertního materiálu, který minimalizuje adsorpci zkoušené látky na jejich stěnách.

▼ B

- b) Třepací zařízení: třepačka s rotačním pohybem nebo rovnocenné zařízení; třepačka musí v průběhu třepání udržovat půdu v suspensi;
- c) Odstředivka: přednostně vysokootáčková, např. s odstředivým zrychlením $> 3\,000\text{ g}$, s řízenou teplotou, schopná odstředit z vodného roztoku částice o průměru větším než $0,2\ \mu\text{m}$. Kyvety by měly být během třepání a centrifugace opatřeny víčky, aby nedošlo ke ztrátám těkavých látek a vody; aby se minimalizovala adsorpce na víčkách, použijí se deaktivovaná víčka, např. šroubová víčka potažená teflonem.
- d) Volitelné: filtrační zařízení; filtry s průměrem pórů $0,2\ \mu\text{m}$, sterilní, na jedno použití. Zvláštní péče by měla být věnována volbě materiálu filtru, aby se předešlo ztrátám zkoušené látky; u špatně rozpustných zkoušených látek se organický materiál filtru nedoporučuje.
- e) Analytické přístroje vhodné pro měření koncentrace zkoušené látky.
- f) Laboratorní sušárna umožňující udržovat teplotu od 103 °C do 110 °C .

1.7.2. Charakterizace a výběr půd

Půdy by měly být charakterizovány třemi parametry, které jsou hlavně odpovědné za adsorpční kapacitu: obsahem organického uhlíku, obsahem jílu a půdní strukturou a hodnotou pH. Jak již bylo uvedeno, (viz oddíl Rozsah), mohou mít další fyzikálně-chemické charakteristiky půdy vliv na adsorpci/desorpci určité látky a měly by být v takových případech zohledněny.

Metody použité pro charakterizaci půdy jsou velmi důležité a mohou významně ovlivnit výsledky. Doporučuje se tedy, aby pH bylo odpovídající metodou ISO (ISO-10390-1) měřeno v $0,01\text{ M CaCl}_2$ (jde o roztok použitý při zkoušení adsorpce/desorpce). Doporučuje se rovněž, aby byly ostatní důležité půdní charakteristiky stanoveny standardními metodami (např. ISO „Handbook of Soil Analysis“); to umožní, aby byla analýza sorpčních údajů založena na světově standardizovaných půdních parametrech. Informace o existujících standardních metodách analýzy a charakterizace půdy jsou uvedeny v literatuře (50–52). Ke kalibraci metod zkoušení půd se doporučují referenční půdy.

Návod pro výběr půd pro adsorpční/desorpční experimenty je uveden v tabulce 1. Sedm vybraných druhů půd pokrývá půdní druhy vyskytující se v mírném zeměpisném pásu. V případě ionizovatelných zkoušených látek by měly vybrané půdy pokrývat široký rozsah pH, aby bylo možné hodnotit adsorpci látky v její ionizované a neionizované formě. Návod k volbě počtu různých půd, které mají být použity v jednotlivých stádiích zkoušky, je uveden v bodu 1.9 Provedení zkoušky.

Upřednostňují-li se jiné druhy půd, měly by být charakterizovány stejnými parametry a měly by mít podobný rozsah vlastností jako v tabulce 1, třebaže kritériím neodpovídají přesně.

▼ **B**

Tabulka 1

Návod pro výběr půdních vzorků pro adsorpci/desorpci

Druh půdy	Rozsah pH (v 0,01 M CaCl ₂)	Obsah organického uhlíku (%)	Obsah jílu (%)	Struktura půdy ⁽¹⁾
1	4,5–5,5	1,0–2,0	65–80	jílovitá
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	jílovitohlinitá
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	prachovitohlinitá
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	hlinitá
5	< 4,0–6,0 ⁽²⁾	< 0,5–1,5 ⁽²⁾ ⁽³⁾	< 10–15 ⁽²⁾	hlinitopísčítá
6	> 7,0	< 0,5–1,0 ⁽²⁾ ⁽³⁾	40–65	jílovitohlinitá/jíl
7	< 4,5	> 10	< 10	písek/hlinitopísčítá

⁽¹⁾ Podle FAO a amerického systému (85).

⁽²⁾ Příslušné hodnoty parametrů by měly přednostně ležet v uvedeném rozmezí. Vyskytnouli se však při hledání vhodného půdního materiálu obtíže, jsou přijatelné i hodnoty ležící pod uvedeným minimem.

⁽³⁾ U půd s obsahem organického uhlíku nižším než 0,3 % může být porušena korelace mezi obsahem organických látek a adsorpcí. Doporučuje se tedy používat půdy s minimálním obsahem organického uhlíku 0,3 %.

1.7.3. **Sběr a uchování půdních vzorků**1.7.3.1. *Sběr*

Není doporučena žádná specifická technika odběru vzorků; technika odběru závisí na účelu studie (53, 54, 55, 56, 57, 58).

Je třeba zvážit tyto hlediska:

a) informace o historii lokality jsou nezbytné; zahrnují informace o lokalitě, vegetaci, použití pesticidů nebo hnojiv, o biologických nánosech nebo náhodné kontaminaci. Pokud jde o popis místa odběru, měla by být dodržena doporučení normy ISO o vzorkování půd (ISO 10381-6);

b) místo odběru musí být definováno souřadnicemi UTM (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) nebo zeměpisnými souřadnicemi; to by mohlo umožnit opakovaný odběr dané půdy v budoucnu nebo pomoci při určení půdy podle různých klasifikačních systémů používaných v různých zemích. Kromě toho by měl být vzorkován pouze horizont A do maximální hloubky 20 cm. Zvláště je-li u půdního druhu č. 7 součástí půdy horizont O_h, měl by být zahrnut do vzorkování.

Půdní vzorky by měly být přepravovány v kontejnerech a za teploty, jež zaručí, že nedojde k výrazné změně původních charakteristik půdy.

▼B1.7.3.2. *Uchovávání*

Upřednostňuje se použití čerstvě odebraných půd. Pouze není-li to možné, mohou být půdy uchovávány při teplotě okolí a sušeny na vzduchu. Pro dobu uchovávání neexistuje žádný doporučený limit, ale půdy uchovávané déle než tři roky by měly být před použitím znovu analyzovány na obsah organického uhlíku, pH a CEC (kationtovou výměnnou kapacitu).

1.7.3.3. *Zpracování půdních vzorků a jejich příprava ke zkoušce*

Půdy se vysuší na vzduchu při teplotě okolí (přednostně při 20–25 °C). Rozrušení půd se provede minimální silou, aby se původní struktura půdy změnila co nejméně. Půdy se prosejí na sítu, aby se získaly částice o velikosti ≤ 2 mm; při prosévání by měla být dodržována doporučení normy ISO o vzorkování půdy (ISO 10381-6). Doporučuje se opatrná homogenizace, neboť tím se zvyšuje reprodukovatelnost výsledků. Vlhkost každé půdy se stanoví v třech alikvotech zahříváním při 105 °C, dokud se významně mění hmotnost (přibližně 12 hodin). Ve všech výpočtech se hmotností půdy rozumí hmotnost po sušení v sušárně, tj. hmotnost půdy korigovaná na obsah vlhkosti.

1.7.4. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se rozpustí v 0,01 M roztoku CaCl_2 v destilované nebo deionizované vodě; roztok CaCl_2 se použije jako vodná rozpouštědlová fáze, aby se zlepšila centrifugace a minimalizovala kationtová výměna. Koncentrace zásobního roztoku by měla být přednostně o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti použité analytické metody. Tento práh zabezpečuje přesnost měření s ohledem na metodu použitou při tomto postupu; kromě toho by měla být koncentrace zásobního roztoku nižší než rozpustnost zkoušené látky ve vodě.

Zásobní roztok by se měl připravovat nejlépe těsně před aplikací na půdní vzorky a uchovávat uzavřený v temnu při 4 °C. Doba uchovávání závisí na stálosti zkoušené látky a na její koncentraci v roztoku.

Pouze u špatně rozpustných látek ($S_v < 10^{-4}$ g/l) může být nezbytné použití solubilizačního činidla, je-li obtížné zkoušenou látku rozpustit. Solubilizační činidlo: a) by mělo být mísitelné s vodou, např. methanol nebo acetonitril, b) jeho koncentrace by neměla překročit 1 % celkového objemu zásobního roztoku a jeho podíl by měl být nižší v roztoku zkoušené látky přicházejícím do kontaktu s půdou (přednostně v koncentraci nižší než 0,1 %) a c) nemělo by být povrchově aktivní a nemělo by podléhat solvolytickým reakcím se zkoušenou chemickou látkou. Použití solubilizačního činidla by mělo být uvedeno a odůvodněno při uvádění údajů.

Jinou možností u špatně rozpustných látek je jejich vmíchání do systému: zkoušená látka se rozpustí v organickém rozpouštědle a alikvot se přidá ke směsi půdy a 0,01 M roztoku CaCl_2 v destilované nebo deionizované vodě. Obsah organického rozpouštědla ve vodné fázi by měl být co nejnižší a obvykle by neměl překročit 0,1 %. Nedostatkem vmíchání v organickém rozpouštědle je nereprodukovatelnost objemu. To může znamenat vnesení další chyby, neboť koncentrace zkoušené látky a kosolventu nebývají ve všech zkouškách stejné.

▼B

1.8. PŘEDPOKLADY PRO PROVEDENÍ ADSORPČNÍ/DESORPČNÍ ZKOUŠKY

1.8.1. Analytická metoda

Klíčovými parametry, které mohou mít vliv na správnost měření sorpce, jsou správnost metody analýzy jak roztoku, tak adsorbované fáze, stálost a čistota zkoušené látky, dosažení sorpční rovnováhy, velikost změny koncentrace roztoku, poměr půda/roztok a změny v půdní struktuře během ustavování rovnováhy (35, 59–62). Některé příklady týkající se problematiky správnosti jsou uvedeny v dodatku 2.

Spolehlivost použité analytické metody musí být ověřována v rozmezí koncentrací, které se mohou vyskytnout v průběhu zkoušky. Je na experimentátorovi, aby vyvinul vhodnou metodu s náležitou správností, přesností, reprodukovatelností, mezi stanovitelností a výtěžkem. Návodem k provedení takové zkoušky je níže uvedený experiment.

Vhodný objem 0,01 M CaCl_2 , např. 100 cm^3 , se protřepává 4 hodiny např. s 20 g půdy o vysoké adsorpční schopnosti, tj. s vysokým obsahem organického uhlíku a jílu; tato hmotnost a objem se mohou měnit podle požadavků analýzy, avšak poměr půda/roztok 1:5 je vhodnou výchozí hodnotou. Směs se odstředí a vodná fáze se může zfiltrvat. K vodné fázi se přidá určitý objem zásobního roztoku zkoušené látky, aby bylo dosaženo nominální hodnoty v koncentračním rozsahu, který se může vyskytnout v průběhu zkoušky. Tento objem by neměl překročit 10 % konečného objemu vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně. Roztok se analyzuje.

Založí se jeden slepý pokus s půdou a roztokem CaCl_2 (bez zkoušené látky) a podrobí se kontrole, pokud jde o nahodilé chyby analytické metody a vlivy matrice způsobené půdou.

Mezi analytické metody, které mohou být použity k sorpčním měřením, patří plynová chromatografie s kapalnou stacionární fází, (GLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), spektrometrie (např. GC/hmotová spektrometrie, HPLC/hmotová spektrometrie) a počítání scintilací v roztoku (pro izotopově značené látky). Bez ohledu na použitou analytickou metodu se za přiměřené považují výtěžky od 90 % do 110 % nominální hodnoty. Má-li se provést detekce a vyhodnocení poté, co došlo k rozdělení, musí být meze stanovitelnosti analytické metody alespoň o dva řády nižší než nominální koncentrace.

Charakteristiky a meze stanovitelnosti analytické metody použitelné pro provedení studií adsorpce hrají významnou roli při určení zkušebních podmínek a při celém experimentálním provedení zkoušky. Tato metoda sleduje obecný experimentální postup a obsahuje doporučení a pokyny pro alternativní řešení, pokud analytická metoda a laboratorní vybavení přinášejí omezení.

▼ B

1.8.2. Výběr optimálních poměrů půda/roztok

Výběr vhodných poměrů půda/roztok pro sorpční studie závisí na distribučním koeficientu K_d a na požadovaném relativním stupni adsorpce. Změna koncentrace látky v roztoku je určující pro statistickou správnost měření v důsledku formy adsorpční rovnice a omezení analytické metodiky při stanovování koncentrace chemické látky v roztoku. V obecné praxi je tedy užitečné určit několik fixních poměrů, pro něž je adsorbovaný podíl vyšší než 20 %, a přednostně > 50 % (62), a dbát na to, aby byla koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi dostatečně vysoká pro její přesné změření. To je zvláště důležité u vysokých adsorbovaných podílů.

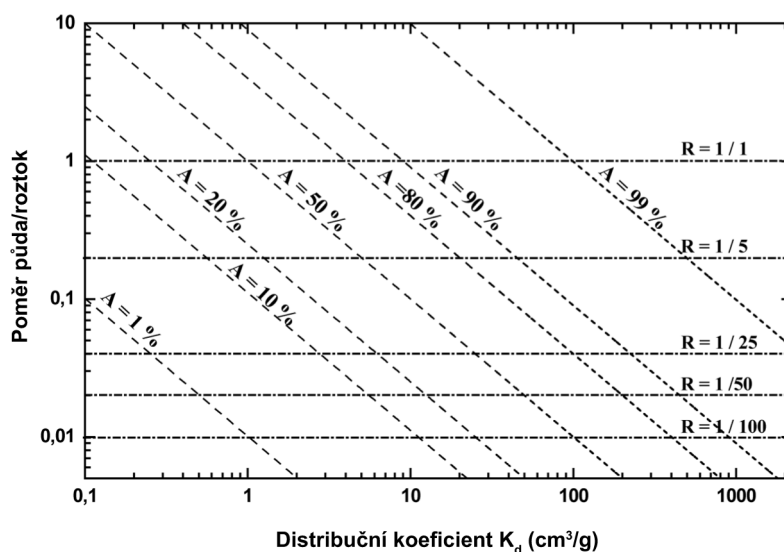
Vyhovující přístup k výběru vhodných poměrů půda/voda je založen na odhadu hodnoty K_d buď předběžnými studiemi, nebo zavedenými metodami odhadu (dodatek 3). Vhodný poměr lze poté vybrat na základě grafického znázornění závislosti poměru půda/roztok na K_d pro pevné hodnoty adsorpce (obrázek 1). V tomto grafickém vyjádření se předpokládá, že je adsorpční rovnice lineární ⁽¹⁾. Použitelný poměr se získá upravením rovnice pro K_d (4) do tvaru rovnice (1):

$$\frac{V_0}{m_{\text{půda}}} = \left(\frac{m_0}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

nebo do její logaritmické formy za předpokladu, že $R = m_{\text{půda}}/V_0$

$$\text{a } A_{\text{eq}} \% / 100 = \frac{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}} \% / 100)}{(1 - A_{\text{eq}} \% / 100)} \right] \quad (2)$$



Obrázek 1 Vztah mezi poměry půda/roztok a hodnotou K_d při různých podílech adsorbované zkoušené látky

⁽¹⁾ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

▼ B

Na obrázku 1 jsou uvedeny požadované poměry půda/roztok jako funkce K_d pro různé úrovně adsorpce. Například při poměru půda/roztok 1:5 a při K_d 20 by došlo přibližně k 80 % adsorpci. Má-li dojít při téže hodnotě K_d k 50 % adsorpci, musí být použit poměr 1:25. Tento přístup k výběru vhodných poměrů půda/roztok umožňuje pružně vyhovět experimentálním potřebám.

Obtížněji se řeší oblasti, kde se chemická látka adsorbuje silně nebo velmi slabě. Je-li adsorpce nízká, doporučuje se poměr půda/roztok 1:1, třebaže u některých vysloveně organických druhů půdy může být k získání suspence nezbytný nižší poměr. Musí být přitom věnována péče analytické metodice měření malých změn koncentrace roztoku, jinak bude adsorpční měření nepřesné. Na druhé straně se může při velmi vysokých distribučních koeficientech K_d dospět až k poměru půda/roztok 1:100, má-li v roztoku zůstat významné množství chemické látky. Je však třeba dbát na dobré promíchání a musí být ponechána dostatečná doba k tomu, aby systém dosáhl rovnováhy. Jiným přístupem k řešení těchto extrémních případů, kdy chybí vhodná analytická metodika, je předpověď hodnoty K_d za použití techniky odhadu založené například na hodnotách P_{ov} (dodatek 3). Může být užitečný zvláště u slabě adsorbovaných nebo polárních chemických látek s $P_{ov} < 20$ a u lipofilních/silně adsorbovaných chemických látek $P_{ov} > 10^4$.

1.9. **PROVEDENÍ ZKOUŠKY**1.9.1. **Zkušební podmínky**

Všechny experimenty se provádějí při teplotě okolí a pokud možno při konstantní teplotě od 20 °C do 25 °C.

Podmínky odstředování by měly umožnit odstranit z roztoku částice větší než 0,2 μm . Tato velikost patří nejmenším částicím považovaným za pevné částice a je hranicí mezi pevnými a koloidními částicemi. Návod ke stanovení podmínek odstředování je uveden v dodatku 4.

Nezaručuje-li odstředivka, že částice větší než 0,2 μm , budou odstraněny, může být použita kombinace odstředování a filtrace přes 0,2 μm filtry. Tyto filtry musí být z vhodného inertního materiálu, aby na nich nedošlo k žádným ztrátám zkoušené látky. V každém případě by mělo být ověřeno, že při filtraci nedochází k žádným ztrátám zkoušené látky.

1.9.2. **Stupeň 1 – předběžná studie**

Účel provedení předběžné studie byl již uveden v oddíle Rozsah. Návodem pro provedení takové studie je dále navržený experiment.

1.9.2.1. *Výběr optimálních poměrů půda/roztok*

Použijí se dva půdní druhy a tři poměry půda/roztok (šest experimentů). Jeden půdní druh s vysokým obsahem organického uhlíku a nízkým obsahem jílu a druhý půdní druh s nízkým obsahem organického uhlíku a vysokým obsahem jílu. Jsou navrženy tyto poměry půda/roztok:

— 50 g půdy a 50 cm^3 vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/1),

▼B

- 10 g půdy a 50 cm³ vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/5),
- 2 g půdy a 50 cm³ vodného roztoku zkoušené látky (poměr 1/25).

Minimální množství půdy, se kterým lze experiment provést, závisí na laboratorním vybavení a na účinnostních charakteristikách použitých analytických metod. Doporučuje se však použít alespoň 1 g, a přednostně 2 g, aby zkouška poskytla spolehlivé výsledky.

Jeden kontrolní vzorek obsahující pouze zkoušenou látku v 0,01 M CaCl₂ (bez půdy) se podrobí naprosto stejnému postupu jako zkušební systémy, a to s cílem ověřit stálost zkoušené látky v roztoku CaCl₂ a její eventuální adsorpci na povrchu zkušebních nádob.

Se stejným množstvím půdy a celkem 50 cm³ 0,01 M CaCl₂ (bez zkoušené látky) se provede slepý pokus stejným postupem. Účelem je kontrola hodnot pozadí během analýzy s cílem najít rušící látky nebo rozeznat kontaminované půdy.

Všechny experimenty včetně kontrolních a slepých pokusů se provedou alespoň dvojmo. Celkový počet vzorků, které by měly být pro studii připraveny, lze vypočítat s ohledem na metodiku, podle které bude postupováno.

Metody pro předběžnou studii a hlavní studii jsou obecně stejné, případné výjimky jsou uvedeny.

Vzorky vysušené na vzduchu se den před experimentem uvedou přes noc (12 hodin) do rovnováhy protřepáváním s 45 cm³ 0,01 M CaCl₂. Poté se určitým objemem zásobního roztoku zkoušené látky upraví konečný objem na 50 cm³. Tento objem přidaného zásobního roztoku: a) by neměl být vyšší než 10 % konečného objemu 50 cm³ vodné fáze, aby byl charakter roztoku před ustavením rovnováhy změněn co nejméně; a b) měl by vést k počáteční koncentraci zkoušené látky v kontaktu s půdou (C₀) alespoň o dva řády vyšší než je mez stanovitelnosti analytické metody; tento práh zabezpečuje možnost provést přesné měření i při vysoké adsorpci (> 90 %) a později stanovit adsorpční izotermy. Doporučuje se rovněž, aby počáteční koncentrace látky (C₀) pokud možno nepřekračovala polovinu hodnoty rozpustnosti látky.

Příklad výpočtu koncentrace zásobního roztoku látky (C_{zás}) je uveden níže. Předpokládá se mez stanovitelnosti 0,01 μg/cm³ a 90 % adsorpcce; počáteční koncentrace zkoušené látky v kontaktu s půdou by tedy měla být přednostně 1 μg/cm³ (o dva řády vyšší, než je mez stanovitelnosti). Za předpokladu, že bude přidán maximální doporučený objem zásobního roztoku, tj. 5 k 45 cm³ 0,01 M CaCl₂ pro ustavení rovnováhy, (tj. 10 % přídavek zásobního roztoku v celkovém objemu vodné fáze 50 cm³) by měla být koncentrace zásobního roztoku 10 μg/cm³; tj. o tři řády vyšší než mez stanovitelnosti analytické metody.

pH vodné fáze se měří před kontaktem s půdou a po něm, neboť hraje významnou roli v celém adsorpčním procesu, zvláště u ionizovatelných látek.

▼ B

Směs se protřepává, dokud se neustaví adsorpční rovnováha. Doba nezbytná k dosažení rovnováhy v půdě silně kolísá v závislosti na chemické látce a půdě; zpravidla stačí 24 hodin (77). V předběžné studii lze vzorky odebírat postupně v průběhu 48hodinového míchání (například 4, 8, 24, 48 hodin). Čas analýzy by však měl být volen pružně s ohledem na pracovní plán laboratoře.

Existují dvě možnosti analýzy zkoušené látky ve vodném roztoku: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Je třeba zdůraznit, že ačkoli je paralelní metoda experimentálně pracnější, je matematické zpracování jejích výsledků jednodušší (dodatek 5). Volba metodiky, podle které se bude postupovat, se však ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit dostupné laboratorní vybavení a zdroje.

a) Paralelní metoda: připraví se tolik vzorků s se stejným poměrem půda/roztok, kolik je časových intervalů, v nichž se má provést studium adsorpční kinetiky. Po centrifugaci a popřípadě po filtraci se z první zkušební nádoby odebere pokud možno úplně vodná fáze a měří se např. po 4 hodinách; vodná fáze druhé zkušební nádoby se změří po 8 hodinách, vodná z fáze třetí zkušební nádoby po 24 hodinách atd.

b) Sériová metoda: pro každý poměr půda/roztok se připraví pouze dva vzorky. V definovaných časových intervalech se směs zcentrifuguje a fáze se oddělí. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Následuje-li po centrifugaci filtrace, měla by mít laboratoř zařízení pro filtraci malých podílů vodné fáze. Doporučuje se, aby celkový objem odebraného podílu nepřesahoval 1 % celkového objemu roztoku, aby se významně nezměnil poměr půda/roztok a aby se během zkoušky nesnížilo množství rozpuštěné látky, které je k dispozici pro adsorpci.

Procento adsorpce A_t se pro každý čas (t_i) vypočte z nominální počáteční koncentrace a naměřené koncentrace v čase odebrání vzorku (t_i), po korekci na hodnoty slepého pokusu. Sestrojí se závislost A_t na čase (obrázek 1 v dodatku 5), aby se určilo dosažení rovnovážného plató⁽¹⁾. Rovněž se vypočte hodnota K_d při rovnováze. Na základě této hodnoty K_d se z obrázku 1 vyberou vhodné poměry půda/roztok tak, aby adsorpce dosahovala více než 20 % a přednostně více než 50 % (61). Všechny použitelné rovnice a zásady pro sestrojování závislostí jsou uvedeny v oddíle Údaje a jejich předkládání a v dodatku 5.

1.9.2.2. Stanovení rovnovážné adsorpční doby a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze

Jak již bylo uvedeno, závislosti A_t nebo C_{aq}^{ads} na čase umožňují odhadnout určit dosažení adsorpční rovnováhy a množství zkoušené látky adsorbované při rovnováze. Příklady těchto závislostí jsou na obrázcích 1 a 2 v dodatku 5. Rovnovážná doba je doba nezbytná k tomu, aby bylo v systému dosaženo plató.

⁽¹⁾ Závislosti koncentrace zkušební látky ve vodné fázi C_{aq}^{ads} na čase by mohly být rovněž použity k určení dosažení rovnovážného plató (viz obrázek 2 v dodatku 5).

▼ B

Nevyskytuje-li se u určité půdy plató, nýbrž je pozorován stálý nárůst, může to být způsobeno komplikujícími faktory, jako jsou biologický rozklad a pomalá difuze. Biologický rozklad lze prokázat opakováním experimentu se sterilizovaným vzorkem půdy. Není-li ani v tomto případě dosaženo plató, měl by experimentátor pátrat po jiných jevech, ke kterým by mohlo při studiích docházet; může tak učinit vhodnou změnou experimentálních podmínek (teploty, doby protřepávání, poměrů půda/roztok). Ponechává se na rozhodnutí experimentátora, zda bude pokračovat ve zkušebním postupu i přesto, že rovnováhy případně nebude dosaženo.

1.9.2.3. *Adsorpce na stěnách zkušební nádoby a stálost zkoušené látky*

Některé informace o adsorpci zkoušené látky na povrchu zkušební nádoby a rovněž o stálosti zkoušené látky lze odvodit z analýzy kontrolních vzorků. Pozoruje-li se úbytek větší, než odpovídá obvyklé chybě analytické metody, může docházet k abiotickému rozkladu a/nebo adsorpci na povrchu zkušební nádoby. Tyto dva jevy lze rozlišit důkladným omytím stěn nádoby známým objemem vhodného rozpouštědla a analýzou výplachu na zkoušenou látku. Není-li zjištěna adsorpce na povrchu zkušební nádoby, ukazuje úbytek na abiotickou nestálost zkoušené látky. Je-li zjištěna adsorpce, je nezbytné změnit materiál zkušebních nádobek. Údaje o adsorpci na povrchu zkušebních nádobek získaná v tomto experimentu však nelze přímo extrapolovat na experimenty půdou a roztoky. Přítomnost půdy bude mít na tuto adsorpci vliv.

Další informace o stálosti zkoušené látky lze odvodit z hmotnostní bilance výchozí látky provedené v průběhu času. To znamená, že se na zkoušenou látku analyzují vodná fáze, extrakty půdy a stěny zkušební nádoby. Rozdíl mezi hmotností přidané zkoušené látky a součtem hmotností zkoušené látky ve vodné fázi, v extraktech půdy a na povrchu zkušební nádoby je roven hmotnosti, které se rozložila, vytékala nebo se neextrahovala. Má-li být provedena hmotnostní bilance, mělo by být v době experimentu dosaženo adsorpční rovnováhy.

Hmotnostní bilance se provede u obou druhů půd a pro jeden poměr půda/roztok u každé půdy, u něhož je úbytek při rovnováze větší než 20 % a nejlépe větší než 50 %. Je-li experiment ukončen analýzou posledního vzorku po 48 hodinách, fáze se oddělí centrifugací a popřípadě i filtrací. Oddělí se pokud možno veškerá vodná fáze a k půdě se přidá vhodné extrakční rozpouštědlo (extrakční koeficient alespoň 95 %) pro extrakci zkoušené látky. Doporučují se alespoň dvě extrakce za sebou. Stanoví se množství zkoušené látky v půdě a v extraktech ze zkušební nádoby a vypočítá se hmotnostní bilance (rovnice 10, Údaje a jejich předkládání). Je-li nižší než 90 %, považuje se zkoušená látka za nestálou v časovém měřítku zkoušky. Studie však může pokračovat, zohlední-li se nestálost zkoušené látky; v takovém případě se doporučuje, aby byly v hlavní studii analyzovány obě fáze.

▼ B1.9.2.4. *Stupeň 2 – adsorpční kinetika při jedné koncentraci zkoušené látky*

Použije se pět druhů půd vybraných z tabulky 1. Je výhodné zahrnout přitom některé nebo všechny půdy z předběžné studie. V tomto případě nemusí být stupeň 2 opakován pro půdy použité v předběžné studii.

Rovnovážná doba, poměr půda/roztok, hmotnost půdního vzorku, objem vodné fáze v kontaktu s půdou a koncentrace zkoušené látky v roztoku se volí na základě výsledků předběžné studie. Analýzy se provádějí přednostně po 2, 4, 6, 8 (eventuálně také po 10) a 24 hodinách kontaktu s půdou; protřepávání může být prodlouženo maximálně na 48 hodin u chemických látek, u nichž je pro dosažení rovnováhy podle výsledků předběžných studií nezbytný delší čas. Doby lze však volit pružně.

Každý experiment (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede alespoň dvakrát, aby bylo možné odhadnout rozptyl výsledků. S každým experimentem se provede jeden slepý pokus. Provede se s půdou a s 0,01 M roztokem CaCl_2 bez zkoušené látky a se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejněmu zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01 M roztoku CaCl_2 (bez půdy), který slouží jako pojistka proti nečekaným výsledkům.

Procento absorpce se vypočte pro každý čas A_t a pro každý interval $A_{\Delta t}$ (podle potřeby) a vynese se proti času. Rovněž se vypočtou distribuční koeficient K_d při rovnováze a adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku K_{ou} (pro nepolární organické chemické látky).

Výsledky zkoušky adsorpční kinetiky

Lineární model K_d vyjadřující vlastní pohyblivost chemických látek v půdě je obecně dostatečně přesný (35, 78). Například chemické látky s $K_d \leq 1 \text{ cm}^3/\text{g}$ jsou obecně považovány za kvalitativně mobilní. Podobně bylo MacCallem et al. (16) vyvinuto klasifikační schéma mobility založené na hodnotách K_{ou} . Kromě toho existují klasifikační schémata vymývatelnosti založená na vztahu mezi K_{ou} a DT-50⁽¹⁾ (32, 79).

Podle analýzy chyb (61) nelze z poklesu koncentrace ve vodné fázi přesně určit hodnoty K_d nižší než $0,3 \text{ cm}^3/\text{g}$, a to ani při nejpriznivějším (z hlediska správnosti) poměru půda/roztok, tj. při poměru 1:1. V takovém případě se doporučuje analýza obou fází – půdy i roztoku.

⁽¹⁾ DT-50: doba rozkladu 50 % zkoušené látky.

▼ B

S ohledem na výše uvedené poznámky se doporučuje pokračovat ve studii adsorpčního chování chemické látky v půdě a její případné mobility stanovením Freundlichových adsorpčních isotherm pro tyto systémy, u nichž je přesné stanovení K_d možné provést způsobem, kterým se postupuje v této zkušební metodě. Přesné stanovení je možné, je-li součin hodnoty K_d a poměru půda/roztok $> 0,3$ při měření založeném na poklesu koncentrace ve vodné fázi (nepřímá metoda), nebo je-li součin $> 0,1$ při analýze obou fází (přímá metoda) (61).

1.9.2.5. *Stupeň 3 – adsorpční isothermy a desorpční kinetika/desorpční isothermy*

1.9.2.5.1. Adsorpční isothermy

Použije se pět koncentrací zkoušené látky, přednostně v rozsahu dvou řádů; při volbě koncentrací se zohlední rozpustnost ve vodě a výsledná rovnovážná koncentrace ve vodné fázi. Při studii se u každé půdy použije tentýž poměr půda/roztok. Adsorpční zkouška se provede výše uvedenou metodou pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou po uplynutí doby, která je nezbytná pro dosažení rovnováhy a která byla stanovena dříve ve stupni 2. Stanoví se rovnovážné koncentrace v roztoku a adsorbované množství se vypočte z úbytku zkoušené látky v roztoku nebo přímou metodou. Adsorbovaná hmotnost na jednotku hmotnosti půdy se vynese jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky (viz oddíl Údaje a jejich předkládání)

Výsledky experimentu pro stanovení adsorpčních isotherm

Z dosud navržených matematických modelů adsorpčních isotherm se k popisu adsorpčních procesů používá Freundlichova isotherma nejčastěji. Podrobnější informace o interpretaci a významu adsorpčních modelů jsou uvedeny v literatuře (41, 45, 80, 81, 82).

Poznámka: Je třeba poznamenat, že hodnoty K_F (Freundlichovy adsorpční koeficienty) lze pro různé látky porovnávat pouze tehdy, jsou-li tyto hodnoty vyjádřeny ve stejných jednotkách (83).

1.9.2.5.2. Desorpční kinetika

Účelem tohoto experimentu je vyšetřit, zda je chemická látka adsorbována v půdě vratně nebo nevratně. Tato informace je důležitá, neboť desorpční proces hraje také důležitou roli v chování chemické látky v půdě. Desorpční údaje jsou kromě toho užitečným vstupem pro počítačové modelování vyluhování a pro simulaci vyplavování rozpuštěných látek. Je-li studie desorpce žádoucí, doporučuje se, aby byla níže popsána studie provedena na každém systému, na kterém bylo v předchozí studii adsorpční kinetiky možné provést přesné stanovení K_d .

Podobně jako u studie adsorpční kinetiky existují dvě volby, jak postupovat při studium desorpční kinetiky: a) paralelní metoda a b) sériová metoda. Volba metodiky, podle které se bude postupovat, se ponechává na experimentátorovi, který bude muset zvážit laboratorní vybavení a zdroje, které jsou k dispozici.

▼B

- a) Paralelní metoda: pro každou půdu zahrnutou do studie desorpce se připraví tolik vzorků se stejným poměrem půda/roztok, kolik bude časových intervalů, v nichž se má studovat desorpční kinetika. Zvolí se přednostně stejné časové intervaly jako v experimentu při studium adsorpční kinetiky; celkový čas se však může prodloužit podle potřeby, aby bylo v systému dosaženo desorpční rovnováhy. S každým experimentem (s jednou půdou a s jedním roztokem) se provede slepý pokus s půdou a s 0,01 M roztokem CaCl_2 bez zkoušené látky a se stejnou hmotností a objemem jako v experimentu. Stejnému zkušebnímu postupu se podrobí kontrolní vzorek zkoušené látky v 0,01 M roztoku CaCl_2 (bez půdy). Všechny směsi půdy s roztokem se protřepávají do ustavení adsorpční rovnováhy (jak byla určena dříve ve stupni 2). Poté se fáze oddělí centrifugací a vodná fáze se co nejlépe odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01 M CaCl_2 bez zkoušené látky a nová směs se opět protřepává. Vodná fáze první zkušební nádoby se co nejlépe odebere a změří například po 2 hodinách, vodná fáze druhé zkušební nádoby se změří po 4 hodinách, vodná fáze třetí zkušební nádoby se změří po 6 hodinách atd., až do dosažení desorpční rovnováhy.
- b) Sériová metoda: po experimentu pro stanovení adsorpční kinetiky se směs zcentrifuguje a vodná fáze se co nejlépe odebere. Objem odebraného roztoku se nahradí stejným objemem 0,01 M CaCl_2 bez zkoušené látky. Nová směs se protřepává až do ustavení desorpční rovnováhy. Během této doby se ve stanovených časových intervalech směs centrifuguje, aby se oddělily fáze. Malý podíl vodné fáze se ihned analyzuje na zkoušenou látku; v experimentu se poté pokračuje s původní směsí. Objem každého jednotlivého podílu by měl být menší než 1 % celkového objemu. Ke směsi se přidá stejné množství čerstvého 0,01 M roztoku CaCl_2 , aby se zachoval poměr půda/roztok, a v protřepávání se pokračuje až do dalšího časového intervalu.

Procento desorpce se vypočte pro každý čas (D_t) a pro každý interval ($D_{\Delta t}$) (podle potřeb studie) a vynesou se do grafu proti času. Rovněž se vypočte hodnota desorpčního koeficientu K_{des} při rovnováze. Všechny použité rovnice jsou uvedeny v oddíle Údaje a jejich předkládání a v dodatku 5.

Výsledky studia desorpční kinetiky

Společný graf závislosti procenta desorpce D_t a adsorpce A_t na čase umožní odhadnout vratnost adsorpčního procesu. Je-li desorpční rovnováha dosažena v čase menším než dvojnásobek doby potřebné pro dosažení adsorpční rovnováhy a je-li celková desorpce vyšší než 75 % adsorbovaného množství, považuje se adsorpce za vratnou.

1.9.2.5.3. Desorpční isothermy

Freundlichovy desorpční isothermy se určují v půdách použitých ke stanovení adsorpčních isotherm. Zkouška desorpce se provede způsobem popsáním v oddíle Desorpční kinetika, pouze s tím rozdílem, že se vodná fáze analyzuje pouze jednou, a to při desorpční rovnováze. Vypočte se množství desorbované zkoušené látky. Množství zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě po dosažení desorpční rovnováhy se vynesou do grafu jako funkce rovnovážné koncentrace zkoušené látky v roztoku (viz oddíl Údaje a jejich předkládání a dodatek 5).

▼ B**2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

Analytické údaje se uvedou ve formě tabulky (viz dodatek 6). Uvedou se jednotlivá měření a vypočtené průměrné hodnoty. Předloží se grafy adsorpčních isotherm. Výpočty se provedou níže uvedeným způsobem.

Pro účely zkoušky se předpokládá, že hmotnost 1 cm³ vodného roztoku je 1 g. Poměr půda/roztok může být vyjádřen stejným číslem pro rozměr hmotnost/hmotnost i pro rozměr hmotnost/objem.

2.1. ADSORPCE

Adsorpce A_{t_i} je definována jako procentuální podíl látky z množství látky na začátku zkoušky, která se za zkušebních podmínek adsorbovala v půdě. Je-li zkoušená látka stálá a neadsorbuje se významně na stěnách nádoby, vypočte se A_{t_i} pro každý čas z rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_p^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

kde:

A_{t_i} = procento adsorpce v čase t_i (%);

$m_p^{\text{ads}}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě v čase t_i (μg);

m_0 = hmotnost zkoušené látky v nádobce na začátku zkoušky (μg).

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta adsorpce A_{t_i} pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Distribuční koeficient K_d je poměr mezi množstvím látky v půdě a hmotnostní koncentrací látky ve vodném roztoku za zkušebních podmínek a při dosažení adsorpční rovnováhy.

$$K_d = \frac{C_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{půda}}} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

kde:

$C_p^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg/g),

$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze (μg/cm). Tato koncentrace se stanoví analyticky a zohlední se hodnoty ze slepých pokusů,

$m_p^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{\text{půda}}$ = množství půdní fáze vyjádřené v suché hmotnosti půdy (g),

V_0 = počáteční objem vodné fáze v kontaktu s půdou (cm³).

Vztah mezi A_{eq} a K_d je dán rovnicí:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{půda}}} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

▼ B

kde:

A_{eq} = procento adsorpce při adsorpční rovnováze, %.

Vztah adsorpčního koeficientu normalizovaného na obsah organického uhlíku K_{ou} , distribučního koeficientu K_d a obsahu organického uhlíku v půdním vzorku je tento:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

kde:

$\%ou$ = procentuální obsah organického uhlíku v půdním vzorku (g/g).

Koeficient K_{ou} je jedinou veličinou, která charakterizuje rozdělení hlavně anorganických nepolárních látek mezi organický uhlík v půdě nebo sediment a vodu. Adsorpce těchto chemických látek koreluje s obsahem organických látek v pevném sorbujičím materiálu (7); hodnoty K_{ou} závisí na specifických charakteristikách huminových podílů, jejichž sorpční kapacita se značně liší podle původu, vzniku atd.

2.1.1. Adsorpční isothermy

Rovnice Freundlichových adsorpčních isotherm vyjadřují vztah mezi množstvím adsorbované zkoušené látky a koncentrací zkoušené látky v roztoku při rovnováze (rovnice 8).

Údaje se zpracovávají jako v oddíle Adsorpce a pro každou zkušební nádobku se vypočte množství zkoušené látky adsorbované v půdě po adsorpční zkoušce ($C_p^{ads}(eq)$, jinde označeno jako x/m). Předpokládá se, že rovnováhy bylo dosaženo a že $C_p^{ads}(eq)$ představuje rovnovážnou hodnotu:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_p^{ads}(eq)}{m_{půda}} = \frac{[C_0 - C_{vod}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{půda}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (7)$$

Freundlichova adsorpční rovnice má tento tvar (8):

$$C_p^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{vod}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (8)$$

nebo v lineární formě:

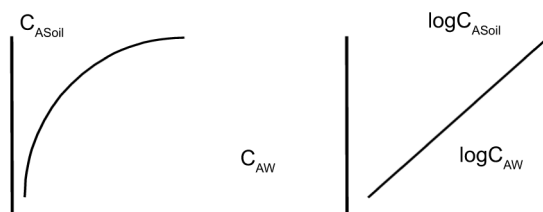
$$\log C_p^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{vod}^{ads}(eq) \quad (9)$$

kde:

K_F^{ads} = Freundlichův adsorpční koeficient; jeho rozměr je cm^3/g pouze tehdy, je-li $1/n = 1$; ve všech ostatních případech se směrnice $1/n$ zavádí do rozměru K_F^{ads} ($\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n}/\text{g}$);

n = regresní konstanta; $1/n$ se zpravidla pohybuje v rozmezí od 0,7 do 1,0, což znamená, že jsou sorpční údaje často nelineární.

Rovnice (8) a (9) se znázorní graficky a hodnoty K_F^{ads} a $1/n$ se vypočítají regresní analýzou podle rovnice 9. Vypočte se rovněž korelační koeficient r^2 této logaritmické rovnice. Příklady takových znázornění jsou uvedeny na obrázku 2.

▼ **B**

Obrázek 2 Freundlichovy adsorpční závislosti, normální a linearizovaná

2.1.2. Hmotnostní bilance

Hmotnostní bilance (MB) je definována jako procentuální podíl látky z nominálního množství látky na začátku zkoušky, který lze znovu analyticky stanovit po adsorpční zkoušce.

Zpracování údajů se bude lišit podle toho, zda je rozpouštědlo neomezeně mísitelné s vodou. U rozpouštědel mísitelných s vodou mohou být údaje ke stanovení množství látky získané extrakcí rozpouštědlem zpracována stejným způsobem jako v oddíle Desorpce. Je-li rozpouštědlo mísitelné s vodou omezeně, musí být stanoveno množství znovu získané látky.

Hmotnostní bilance pro adsorpci se vypočte takto; předpokládá se, že (m_E) se odpovídá součtu množství zkoušených látek extrahovaných organickým rozpouštědlem z půdy a z povrchu zkušební nádoby:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{vod}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

kde:

MB = hmotnostní bilance (%),

m_E = celková hmotnost zkoušené látky extrahované z půdy a ze stěn zkušební nádoby ve dvou stupních (μg),

C_0 = počáteční hmotnostní koncentrace zkušební roztoku v kontaktu s půdou ($\mu\text{g}/\text{cm}$),

V_{rec} = objem supernatantu vyzískaný po dosažení adsorpční rovnováhy (cm^3).

2.2. DESORPCE

Desorpce (D) je definována jako procentuální podíl z dříve adsorbovaného množství zkoušené látky, který se za zkušebních podmínek desorbuje:

$$D_{t_i} = \frac{m_{vod}^{des}(t_i)}{m_p^{ads}(eq)} \cdot 100 (\%) \quad (11)$$

kde:

D_{t_i} = procento desorpce v čase t_i (%),

▼ B

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy v čase t_i (μg),

$m_{\text{páda}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg).

Podrobné informace o způsobu výpočtu procenta adsorpce D_t pro paralelní a sériovou metodu jsou uvedeny v dodatku 5.

Zdánlivý desorpční koeficient (K_{des}) je za zkušebních podmínek poměr mezi množstvím zkoušené látky, která zůstala v půdě, a hmotnostní koncentrací desorbované látky ve vodném roztoku po dosažení desorpční rovnováhy:

$$K_{\text{des}} = \frac{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})} \frac{V_{\text{T}}}{m_{\text{páda}}} (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (12)$$

kde:

K_{des} = desorpční koeficient (cm^3/g),

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = celková hmotnost zkoušené látky desorbované z půdy při desorpční rovnováze (μg),

V_{T} = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během zkoušky desorpční kinetiky (cm^3).

Návod pro výpočet hodnoty $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ je uveden v dodatku 5 v oddíle Desorpce.

Poznámka:

Provede-li se předcházející adsorpční zkouška paralelní metodou, je objem V_{T} v rovnici 12 roven V_0 .

2.2.1. Desorpční isothermy

Freundlichovy desorpční isothermy vyjadřují vztah mezi množstvím zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě a koncentrací zkoušené látky v roztoku při desorpční rovnováze (rovnice 16).

Pro každou zkušební nádobku se množství zkoušené látky, které zůstalo při desorpční rovnováze adsorbované v půdě, vypočte takto:

$$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \frac{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})}{m_{\text{páda}}} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ je definována takto:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{r}}} - m_{\text{vod}}^{\text{A}} (\mu\text{g}) \quad (14)$$

kde:

$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky, která zůstala adsorbovaná v půdě při desorpční rovnováze ($\mu\text{g}/\text{g}$),

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = analyticky stanovená hmotnost látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze (μg),

▼ B

$m_{\text{vod}}^{\text{A}}$ = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg),

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg);

$$m_{\text{vod}}^{\text{A}} = m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{r}^{F} = objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby ke stanovení zkušební látky při desorpční rovnováze (cm^3),

V_{R} = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku CaCl_2 (cm^3).

Freundlichova desorpční rovnice je (16):

$$C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (16)$$

nebo v lineární formě:

$$\log C_{\text{p}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

kde:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = Freundlichův desorpční koeficient,

n = regresní konstanta,

$C_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi při desorpční rovnováze ($\mu\text{g}/\text{cm}$).

Rovnice 16 a 17 se znázorní graficky a hodnoty $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ a $1/n$ se vypočítají regresní analýzou z rovnice 17.

Poznámka:

Je-li Freundlichův adsorpční nebo desorpční exponent $1/n$ roven 1, bude Freundlichova adsorpční nebo desorpční konstanta ($K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ a $K_{\text{F}}^{\text{des}}$) rovna adsorpční resp. desorpční rovnovážné konstantě (K_{d} a K_{des}) a závislosti C_{p} na C_{vod} budou lineární. Nejsou-li exponenty rovny 1, závislosti C_{p} na C_{vod} budou nelineární a adsorpční a desorpční konstanty se budou podél isotherm lišit.

2.2.2. Protokol o zkoušce

Protokol o zkoušce by měl obsahovat tyto informace:

- úplná identifikace použitých půdních vzorků včetně:
- zeměpisných parametrů lokality (zeměpisné šířky, zeměpisné délky),
- údaje odběru vzorku,

▼B

- využití půdy (např. zemědělská půda, lesní půda atd.),
- hloubky odběru vzorků,
- obsahu písku/prachových částic/jílu,
- pH (v 0,01 M CaCl₂),
- obsahu organického uhlíku,
- obsahu organického materiálu,
- obsahu dusíku,
- poměru C/N,
- kationtové výměnné kapacity (mmol/kg),
- všech informací týkajících se sběru a uchování vzorků,
- všech významných informací pro interpretaci adsorpce/desorpce zkoušené látky,
- odkazu na metody reference použité pro stanovení jednotlivých parametrů,
- podle potřeby informace o zkoušené látce,
- teplota při experimentu,
- podmínky centrifugace,
- analytický postup použitý při analýze zkoušené látky,
- odůvodnění jakéhokoli použití solubilizačního činidla při přípravě zásobního roztoku zkoušené látky,
- vysvětlení korekcí provedených ve výpočtech, je-li to důležité,
- údaje podle formuláře (dodatek 6) a grafická znázornění,
- všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků zkoušky.

3. LITERATURA

- 1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.
- 2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.
- 3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
- 4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995 (June 1995).
- 5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

- 6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
- 7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (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, str. 83–122.
- 14) Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, str. 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), 29–35.
- 16) McCall P.J., Laskowski D.A., Swann R.L., and Dishburger H. J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.
- 17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, 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, 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, 901–932.

▼B

- 21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, str. 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, 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, 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, 961–971.
- 25) Osgerby J.M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, 247–258.
- 26) Guth J.A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden“. Schr. Reihe Ver. Wass. - Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, 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), str. 135-172, Plenum Press, NY.
- 28) Helling C.S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 35, 732–210.
- 29) Hamaker J.W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49–143.
- 30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, 37–44.
- 31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, str. 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), 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, 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, 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, str. 80–101,
- 36) Lambert S.M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, 572–576.

▼B

- 37) Hance R.J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. *J. Agri. Food Chem.*, 17, 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, 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, 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, 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: 222–234.
- 43) Karickhoff S.W., (1981) „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. *Chemosphere* 10, 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, 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, str. 49–143.
- 46) Deli J., and Warren G.F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. *Weed Sci.* 19: 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, 454–457.
- 48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in *Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies*, p.75, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- 49) Pionke H.B., and Deangelis R.J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- 50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- 51) Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- 52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

- 53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- 54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- 55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.
- 56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- 57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- 58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) „Precision in pesticide adsorption measurements“. *Soil Sci. Am. Proc.*, 34, 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.*, 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, 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, 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), 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), 227–231.
- 66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), 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), 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.), str.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

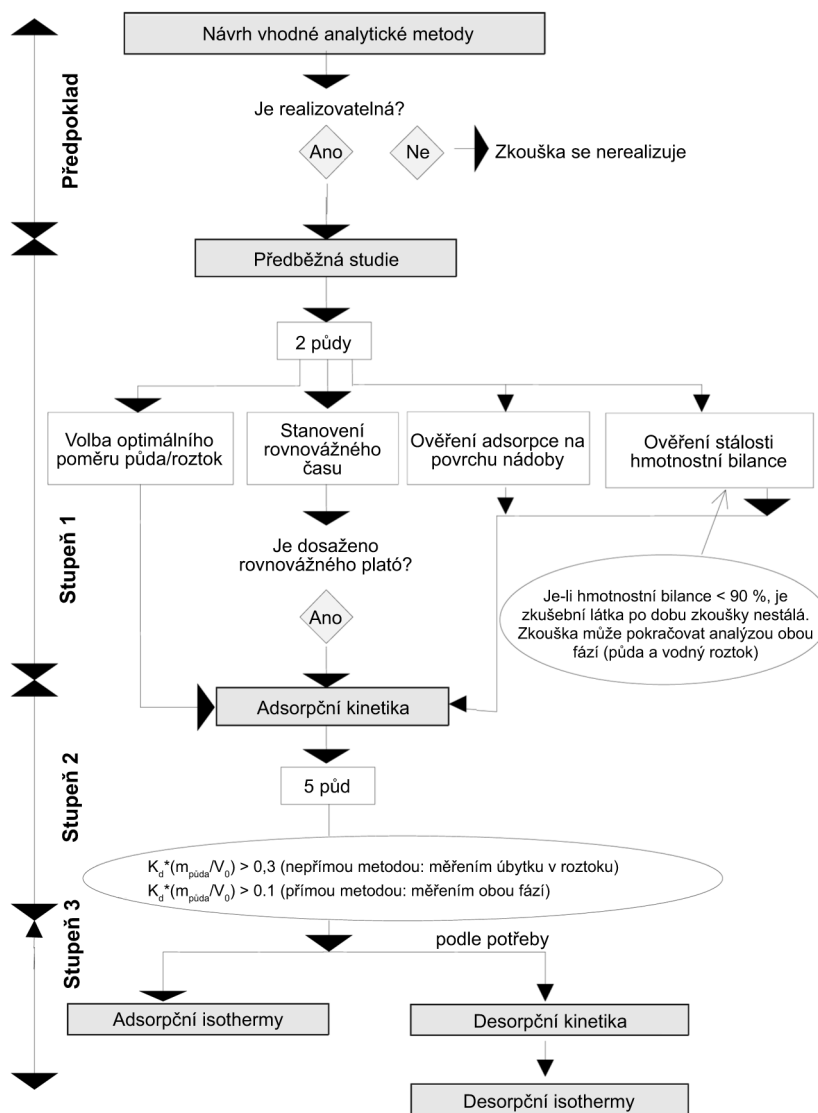
▼B

- 70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. *Science*, Vol. 206, 831–832.
- 71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, 38–42.
- 72) Karickhoff S.W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. *Chemosphere*, Vol. 10(8), 833–846.
- 73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité – reactivité. *Revue de l'Agric.*“, 34 (4), 319–322.
- 74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. *Chemosphere*, 32(12), 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), 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), 2341–2352.
- 77) Hance, R.J., (1967), „The speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. *Weed Research*, Vol. 7, str. 29–36.
- 78) Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
- 79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, str. 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, 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.*, 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: 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, U.K.
- 84) Guth, J.A., (1985), „Adsorption/desorption“, in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1–3, Canterbury, UK.
- 85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26: 305 (1962).

▼ B

DODATEK 1

Schéma zkoušky





DODATEK 2

VLIV SPRÁVNOSTI ANALYTICKÉ METODY A ZMĚNY KONCENTRACE NA SPRÁVNOST VÝSLEDKŮ ADSORPČNÍ STUDIE

Z následující tabulky (84) je zřejmé, že je-li rozdíl mezi počáteční hmotností zkoušené látky ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) a její rovnovážnou hmotností v roztoku ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$) velmi malý, je důsledkem 5 % chyby měření rovnovážné koncentrace 50 % chyba ve výpočtu hmotnosti zkoušené látky adsorbované v půdě ($m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) a 52,4 % chyba ve výpočtu K_d .

Hmotnost půdy $m_{\text{půda}} = 10 \text{ g}$
 Objem roztoku $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg)	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg)	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R_{\ddagger}	K_d^*	R_{\ddagger}
PRO A = 9 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ nebo $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	100	1,000	skutečná hodnota	10	1,00	skutečná hodnota	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
PRO A = 55 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ nebo $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	50,0	0,500	skutečná hodnota	60,0	6,00	skutečná hodnota	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
PRO A = 99 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ nebo $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	1,100	0,011	skutečná hodnota	108,9	10,89	skutečná hodnota	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{v}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{v}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{půda}}}, K_d = \frac{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{v}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{půda}}}$$

$m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky v půdě při rovnováze, μg ;

$m_{\text{v}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze, μg ;

$C_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky v půdě při rovnováze, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{v}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = množství zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = analytická chyba stanovení $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R_{\ddagger} = vypočtená chyba způsobená analytickou chybou R.



DODATEK 3

METODY ODHADU K_D

1. Metody odhadu umožňují předpovědět K_d na základě korelací například s hodnotami P_{ow} (12, 39, 63–68), s údaji o rozpustnosti ve vodě (12, 19, 21, 39, 68–73) nebo s údaji o polaritě získanými při použití HPLC s obrácenou fází (74–76). Jak je ukázáno v tabulkách 1 a 2, vypočtou se z takových rovnic hodnoty K_{ou} nebo K_{om} a poté nepřímo hodnoty K_d z rovnic:

$$K_{ou} = K_d \cdot \frac{100}{\%ou} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%ou} (\text{cm}^3 \text{g}^{-1})$$

2. Koncepce těchto korelací je založena na dvou předpokladech: 1) adsorpce látky nejvíce ovlivňuje organický materiál v půdě a 2) interakce jsou převážně nepolární. V důsledku toho tyto korelace: 1) nejsou použitelné pro polární látky (nebo jsou použitelné jen do určité míry) a 2) nejsou použitelné v případech, kdy je obsah organického materiálu v půdě velmi malý (12). Kromě toho, ačkoli byla zjištěna uspokojivá korelace mezi P_{ov} a adsorpcí (19), nelze totéž říci o vztahu mezi rozpustností ve vodě a rozsahem adsorpce (19, 21); dosud si tyto studie protřečují.
3. Některé příklady korelace mezi adsorpčním koeficientem a rozdělovacím koeficientem mezi oktanol a vodu a rovněž rozpustností ve vodě jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1

Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozdělovacím koeficientem mezi oktanol a vodu; další příklady jsou uvedeny v literatuře (12, 68)

Látky	Korelace	Autoři
Substituované močoviny	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{o/v}$	Briggs (1981) (39)
Chlorované aromatické	$\log K_{ou} = -0,779 + 0,904 \log P_{o/v}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{o/v}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromatické uhlovodíky	$\log K_{ou} = -2,53 + 1,15 \log P_{o/v}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabulka 2

Příklady korelací mezi adsorpčním distribučním koeficientem a rozpustností ve vodě; další příklady jsou uvedeny v literatuře (68, 69)

Sloučeniny	Korelace	Autoři
Různé pesticidy	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_v$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Chlorované alifatické a aromatické látky	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_v$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
1-Naftol	$\log K_{ou} = 4,273 - 0,686 \log S_v \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Cyklické, alifaticko-aromatické látky	$\log K_{ou} = -1,405 - 0,921 \log S_v - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Různé sloučeniny	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_v$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼ **B**

DODATEK 4

VÝPOČTY PRO URČENÍ PODMÍNEK CENTRIFUGACE

1. Centrifugační doba se za předpokladu, že jsou částice kulové, vypočte podle této rovnice:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_p - \rho_{\text{vod}})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Pro zjednodušení nejsou parametry uvedeny v základních jednotkách SI (ale v jednotkách soustavy CGS).

kde:

ω = úhlová rychlost (= $2 \pi(\text{rpm})/60$), rad/s,

rpm = počet otáček za minutu,

η = viskozita roztoku, $\text{g} \cdot \text{s}^{-1}/\text{cm}$,

r_p = poloměr částic, cm,

ρ_p = hustota půdy, g/cm^3 ,

ρ_{vod} = hustota roztoku, g/cm^3 ,

R_t = vzdálenost od středu rotoru odstředivky k hladině roztoku v centrifugační kyvetě, cm,

R_b = vzdálenost od středu rotoru odstředivky ke dnu kyvety, cm,

$R_b - R_t$ = výška sloupce směsi půda/roztok v kyvetě, cm.

Všeobecně se v praxi k zajištění úplného oddělení volí dvojnásobek vypočteného času.

2. Rovnici (1) lze dále zjednodušit, jestliže se považují viskozita (η) a hustota (ρ_{vod}) roztoku rovny viskozitě a hustotě vody při 25 °C; tedy, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{s}^{-1}/\text{cm}$ a $\rho_{\text{vod}} = 1,0 \text{g}/\text{cm}^3$.

Centrifugační doba je tedy dána rovnicí (2):

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

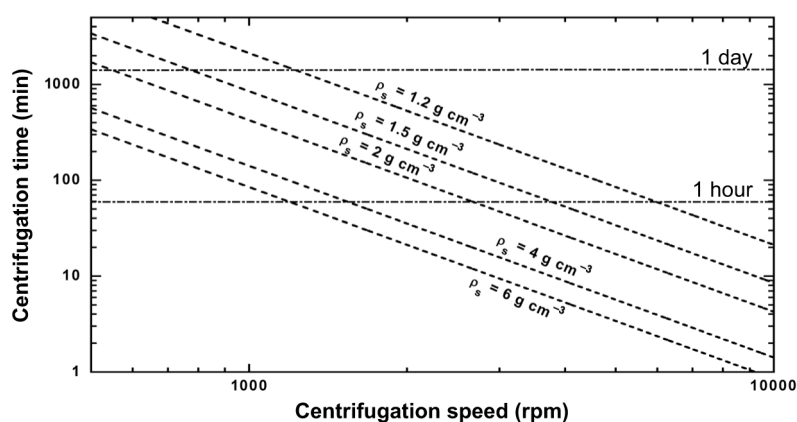
3. Z rovnice 2 je zřejmé, že při určení podmínek centrifugace k dosažení separace částic o určité velikosti (v našem případě o poloměru 0,1 μm), doby (t) počtu otáček za minutu (rpm), jsou důležité: 1) hustota půdy a 2) výška sloupce směsi v centrifugační kyvetě ($R_b - R_t$), tj. vzdálenost, kterou částice půdy urazí mezi hladinou v kyvetě a jejím dnem; výška sloupce směsi v kyvetě bude při fixním stanoveném objemu samozřejmě záviset na druhé mocnině poloměru kyvety.
4. Na obrázku 1 jsou znázorněny změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (rpm) pro různé hustoty půdy (ρ_s) (obrázek 1a) a pro různé výšky sloupce směsi v centrifugačních kyvetách (obrázek 1b). Z obrázku 1a je zřejmý vliv hustoty půdy; např. při obvyklých 3 000 ot/min. je centrifugační doba přibližně 240 minut pro hustotu půdy 1,2 g/cm^3 , ale pouze 50 minut pro 2,0 g/cm^3 . Podobně je podle obrázku 1b při obvyklých 3 000 ot/min. centrifugační doba přibližně 50 minut pro výšku sloupce směsi 10 cm a pouze 7 minut pro výšku sloupce 1 cm. Je však důležité nalézt optimální poměr mezi centrifugací, která vyžaduje co nejmenší výšku sloupce, a snadnou manipulaci experimentátora při oddělování fází po centrifugaci.

▼B

5. Kromě toho je při určování experimentálních podmínek při separaci fází půda/roztok důležité zvažovat možnou přítomnost třetí „pseudofáze“, koloidu. Koloidní částice s velikostí menší než $0,2 \mu\text{m}$, mohou mít značný vliv na celý mechanismus adsorpce látky v půdní suspensi. Při centrifugaci, jak je popsána výše, zůstanou koloidní částice ve vodné fázi a analyzují se společně s vodnou fází. Informace o jejich vlivu se tedy ztratí.

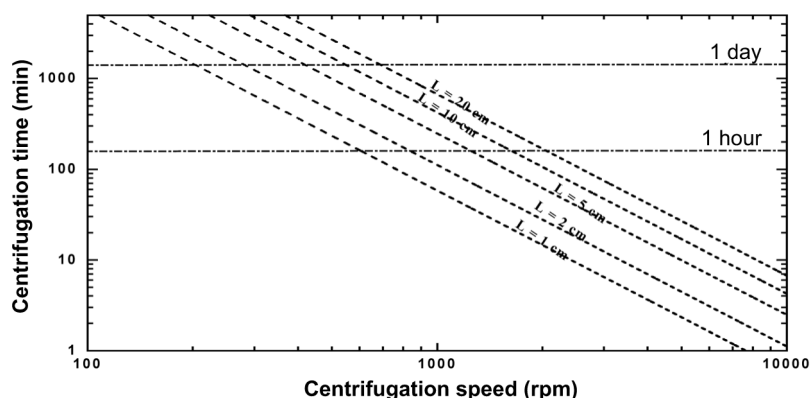
Má-li laboratoř, která studii provádí, zařízení pro ultracentrifugaci nebo ultrafiltraci, mohly by být adsorpce/desorpce látky v půdě studovány hlouběji včetně informací o adsorpci látky na koloidních částicích. v takovém případě by k oddělení tří fází – půdy, koloidních částic a roztoku měla být použita ultracentrifugace při $60\,000 \text{ ot/min}$. nebo ultrafiltrace na filtru o porositě $100\,000 \text{ Da}$. Protokol o zkoušce by měl být také odpovídajícím způsobem pozměněn, mají-li být analyzovány všechny tři fáze.

Obrázek 1a



Změny centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot/min) pro různé hustoty půdy (ρ_p). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}/\text{cm}$ a $\rho_{\text{vod}} = 1,0 \text{ g/cm}^3$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Obrázek 1b



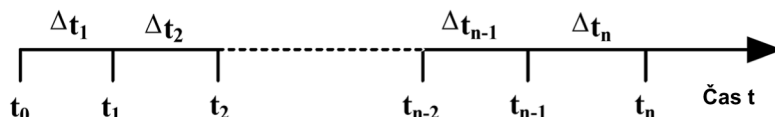
Změna centrifugační doby (t) v závislosti na centrifugační rychlosti (ot/min) pro různé výšky sloupce směsi v centrifugační kyvetě ($R_b - R_t$) = L ; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{s}^{-1}/\text{cm}$, $\rho_{\text{vod}} = 1,0 \text{ g/cm}^3$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $\rho_p = 2,0 \text{ g/cm}^3$.

▼ B

DODATEK 5

VÝPOČET ADSORPCE A (%) A DESORPCE D (%)

Časové schéma postupu je toto:



U všech výpočtů se předpokládá, že zkoušená látka je stálá a že se významně neadsorbuje na stěnách nádoby.

ADSORPCE A (%)a) *Paralelní metoda*

Procento adsorpce se vypočte pro každou zkušební nádobku (i) pro každý čas (t_i), podle této rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Veličiny v této rovnici lze vypočítat takto:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_p^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

kde:

A_{t_i} = procento adsorpce (%) v čase t_i ,

$m_p^{\text{ads}}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky v půdě v čase t_i , kdy je prováděna analýza (μg)

m_0 = hmotnost zkoušené látky v nádobce na začátku zkoušky (μg),

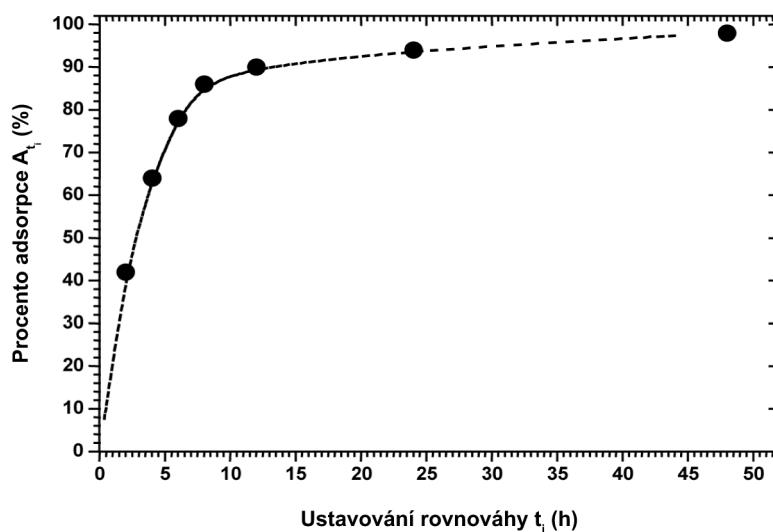
C_0 = počáteční hmotnostní koncentrace zkušebního roztoku v kontaktu s půdou ($\mu\text{g}/\text{cm}$),

▼ **B**

$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$ = hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi v čase t_i , kdy je prováděna analýza ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$); tato koncentrace se stanoví analyticky, přičemž se vezmou v úvahu hodnoty ze slepých pokusů,

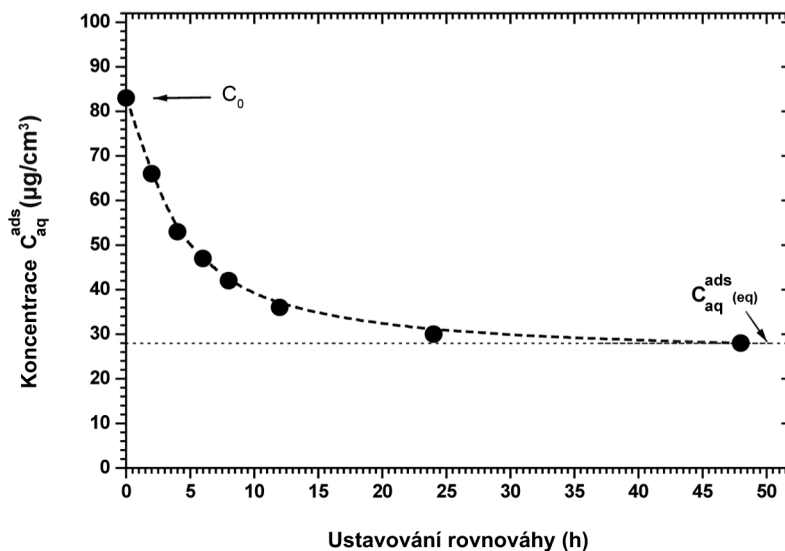
V_0 = počáteční objem zkušební roztoku v kontaktu s půdou (cm^3).

Hodnoty procenta adsorpce A_{t_i} nebo $C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$ se vynesou do grafu proti času a zjistí se doba potřebná k ustavení sorpční rovnováhy. Příklady takových výnosů jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2.



Obrázek 1

Ustavování adsorpční rovnováhy



Obrázek 2

Závislost hmotnostní koncentrace látky ve vodné fázi (C_{aq}) na čase

▼ Bb) *Sériová metoda*

V následujících rovnicích je zohledněno, že se při studii adsorpce provádějí měření zkoušené látky v malých podílech vodné fáze v určitých časových intervalech.

— Pro každý časový interval se hmotnost látky adsorbované v půdě vypočte takto:

— pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) \quad (4)$$

— pro druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (5)$$

— pro třetí časový interval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (6)$$

— pro n ty časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot V_a^A}{V_a^A} \right) \quad (7)$$

— Procento adsorpce v každém časové intervalu $A_{\Delta t_i}$ se vypočte za použití rovnice:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

zatímco procento adsorpce A_{t_i} v čase t_i je dáno rovnicí:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

Hodnoty procenta adsorpce A_{t_i} nebo $A_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou do grafu proti času a určí se čas, kdy se ustavila sorpční rovnováha.

— V čase ustavení rovnováhy t_{eq} :

— je hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě:

$$m_p^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼ B

— hmotnost zkoušené látky v roztoku:

$$m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_p^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— a procento adsorpce při rovnováze:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Výše uvedené parametry jsou definovány takto:

$m_p^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_p^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_p^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = hmotnost látky adsorbované v půdě v časovém intervalu $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ respectively (μg);

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$ = hmotnost látky naměřené v podílu v_a^A v okamžiku t_1, t_2, t_n respectively (μg);

$m_p^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze (μg),

$m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg),

v_a^A = objem podílu, ve kterém je látka stanovována (cm^3)

$A_{\Delta t_i}$ = procento adsorpce odpovídající časovému intervalu Δt_i (%),

A_{eq} = procento adsorpce při adsorpční rovnováze (%).

DESORPCE D (%)

Časem t_0 v němž začíná experiment pro studium desorpční kinetiky, je okamžik, kdy je co největší objem roztoku zkoušené látky (po dosažení adsorpční rovnováhy) nahrazen stejným objemem 0,01 M roztoku CaCl_2 .

a) Paralelní metoda

V čase t_i se změní hmotnost zkoušené látky ve vodné fázi odebrané ze zkušební nádoby i (V_r^i) a desorbovaná hmotnost se vypočte z rovnice:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{\text{vod}}^A \quad (13)$$

Při desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{\text{eq}}$, a tedy $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$.

Hmotnost zkoušené látky desorbované v časovém intervalu (Δt_i) je dána rovnicí:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{vod}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Procento desorpce se vypočte takto:

včase t_i z rovnice:

▼ B

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (15)$$

a v časovém intervalu (Δt_i) z rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{p}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (16)$$

kde:

D_{t_i} = procento desorpce v čase t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = procento desorpce v časovém intervalu Δt_i (%);

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované během časového intervalu Δt_i (μg);

$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)$ = hmotnost zkoušené látky desorbované během časového intervalu Δt_i (μg);

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)$ = hmotnost zkoušené látky analyticky stanovená v čase t_i v roztoku o objemu V_r^i , který byl odebrán k analýze (μg);

$m_{\text{vod}}^{\text{A}}$ = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg);

$$m_{\text{vod}}^{\text{A}} = m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = hmotnost zkoušené látky v roztoku při adsorpční rovnováze (μg);

V_{R} = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku CaCl_2 (cm^3);

V_r^i = objem roztoku odebraného ze zkušební nádoby (i) ke stanovení zkoušené látky v experimentu pro studium desorpční kinetiky (cm^3).

Hodnoty procenta desorpce D_{t_i} nebo $D_{\Delta t_i}$ (podle potřeb studie) se vynesou proti času a stanoví se doba, po níž se ustavila desorpční rovnováha.

b) *Sériová metoda*

V následujících rovnicích je zohledněno, že adsorpce, která předcházela, byla prováděna měřením zkoušené látky v malých podílech (v_a^{A}) vodné fáze (sériová metoda v bodu 1.9 Provedení zkoušky). Předpokládá se, že a) objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po experimentu pro studium adsorpční kinetiky byl nahrazen stejným objemem 0,01 M roztoku CaCl_2 (V_{R}) a b) celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (V_{T}) zůstává konstantní během pokusu na získání desorpční kinetiky a je vyjádřena rovnicí:

$$V_{\text{T}} = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

▼ B

V čase t_i :

- Hmotnost zkoušené látky se změří v malých podílech (v_a^D) a desorbovaná hmotnost se vypočte z této rovnice:

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{vod}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- Při desorpční rovnováze platí, že $t_i = t_{\text{eq}}$ a tedy $m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\text{eq})$.

- Procento desorpce D_{t_i} se vypočte z této rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (20)$$

V časovém intervalu (Δt_i):

Pro každý časový interval se desorbované množství látky vypočte takto:

- pro první časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_m^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{vod}}^A \text{ and } m_p^{\text{des}}(t_1) = m_p^{\text{vod}}(\text{eq}) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

- pro druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right) - m_{\text{vod}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T} \right)$$

a

$$m_p^{\text{des}}(t_2) = m_p^{\text{ads}}(\text{eq}) - [m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

- pro n-tý časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_m^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{\text{vod}}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right] \text{ a}$$

$$m_p^{\text{des}}(t_n) = m_p^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Procento desorpce v každém časovém intervalu $D_{\Delta t_i}$ se nakonec vypočte z této rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (24)$$

zatímco procento desorpce D_{t_i} v čase t_i je dáno rovnicí:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{vod}}^{\text{des}}(j)}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{vod}}^{\text{des}}(t_i)}{m_p^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (25)$$

▼ B

přičemž jsou použité veličiny definovány takto:

$m_p^{\text{des}}(\Delta t_1), m_p^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_p^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = hmotnost látky, která zůstala adsorbovaná v půdě po časových intervalech $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ (μg);

$m_p^{\text{des}}(\Delta t_1), m_p^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_p^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = hmotnost látky desorbované v časových intervalech $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ resp. (μg);

$m_p^{\text{des}}(t_1), m_p^{\text{des}}(t_2), \dots, m_p^{\text{des}}(t_n)$ = hmotnost látky naměřená v podílu (v_a^D) v časových intervalech t_1, t_2, \dots, t_n , resp. (μg);

V_T = celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedené sériovou metodou (cm^3);

m_{vod}^A = hmotnost látky zbylé z adsorpční rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze (μg);

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = objem supernatantu odebraného ze zkušební nádoby po dosažení adsorpční rovnováhy a nahrazeného stejným objemem 0,01 M roztoku CaCl_2 (cm^3);

v_a^D = objem alikvotu odebraného k analýze ze zkušební nádoby (i) během experimentu pro studium desorpční kinetiky provedené sériovou metodou (cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼ B

	Symbol	Jednotky	Doba ustavo- vání rovnováhy	Doba ustavo- vání rovnováhy	Doba ustavo- vání rovnováhy	Doba ustavo- vání rovnováhy	Doba ustavo- vání rovnováhy	Doba ustavo- vání rovnováhy	Doba ustavo- vání rovnováhy
Po protřepávání a centrifugaci									
NEPŘÍMÁ METODA									
Paralelní metoda									
Koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi, po korekci na slepý pokos	$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(t_i)$	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$							
Sériová metoda									
Naměřená hmotnost zkoušené látky v podílu	$m_{\text{m}}^{\text{ads}}(t_i)$	μg							
PŘÍMÁ METODA									
Hmotnost zkoušené látky adsor- bované v půdě	$m_{\text{p}}^{\text{ads}}(t_i)$	μg							
Výpočet adsorpce									
Adsorpce	A_{t_i}	%							
	$A_{\Delta t_i}$	%							
Střední hodnota									
Adsorpční koeficient	K_{d}	cm^3/g							
Střední hodnota									
Adsorpční koeficient	K_{ou}	cm^3/g							
Střední hodnota									

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): %

Teplota: °C

Adsorpční zkouška: slepý pokus a kontrolní vzorky

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrolní vzorek	
Zkušební nádobka č.								
Navážka půdy		g					0	0
Množství vody v navážce půdy (vypočtené)		cm^3					—	—
Přidaný objem 0,01 M roztoku CaCl_2		cm^3						
Přidaný objem zásobního roztoku zkoušené látky		cm^3	0	0				
Celkový objem vodné fáze (vypočtený)		cm^3					—	—

▼ B

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrolní vzorek	
Počáteční koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi		$\mu\text{g}/\text{cm}^3$						

Po protřepávání a centrifugaci

Koncentrace ve vodné fázi		$\mu\text{g}/\text{cm}^3$						
---------------------------	--	---------------------------	--	--	--	--	--	--

Poznámka: Podle potřeby lze přidat sloupce.

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): %

Teplota: °C

Hmotnostní bilance

	Symbol	Jednotky				
Zkušební nádobka č.						
Navážka půdy	—	g				
Půda: suchá hmotnost	$m_{\text{půda}}$	g				
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	ml				
Objem 0,01 M roztoku CaCl_2 použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		ml				
Objem zásobního roztoku		cm^3				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	V_0	cm^3				
Počáteční koncentrace zkušební roztoku	C_0	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$				
Doba ustavování rovnováhy	—	h				

Po protřepávání a centrifugaci

Koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze, po korekci na slepý pokus	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}} (\text{eq})$	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$				
Rovnovážná doba	t_{eq}	h				

První zředění rozpouštědlem

Odebraný objem vodné fáze	V_{rec}	cm^3				
Přidaný objem rozpouštědla	ΔV	cm^3				

První extrakce rozpouštědlem

Signál při analýze rozpouštědla	S_{E1}	var.				
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E1}	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$				

▼ B

	Symbol	Jednotky					
Hmotnost látky extrahované z půdy a stěn nádoby	m_{E1}	μg					
Druhé zředění rozpouštědlem							
Odebraný objem rozpouštědla	V_{rozp}	cm^3					
Přidaný objem rozpouštědla	V'	cm^3					
Druhá extrakce rozpouštědlem							
Signál při analýze rozpouštědlové fáze	S_{E2}	var.					
Koncentrace zkoušené látky v rozpouštědle	C_{E2}	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$					
Hmotnost látky extrahované z půdy a stěn nádoby	m_{E2}	μg					
Celková hmotnost zkoušené látky extrahované ve dvou stupních	m_E	μg					
Hmotnostní bilance	MB	%					

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): %

Teplota: °C

Adsorpční isothermy

	Symbol	Jednotky							
Zkušební nádobka č.									
Navážka půdy	—	g							
Půda: suchá hmotnost	E	g							
Objem vody v navážce půdy (vypočtený)	V_{vp}	cm^3							
Objem 0,01 M roztoku CaCl_2 použitého k uvedení do rovnováhy s půdou		cm^3							
Přidaný objem zásobního roztoku		cm^3							
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou (vypočtený)	V_0	cm^3							
Koncentrace roztoku	C_0	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$							
Doba ustavování rovnováhy	—	h							

Po protřepávání a centrifugaci

Koncentrace látky ve vodné fázi, po korekci na slepý pokus	$C_{\text{vod}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$\mu\text{g}/\text{cm}^3$							
--	--	---------------------------	--	--	--	--	--	--	--

▼ B

	Symbol	Jednotky							
Teplota		°C							
Adsorbovaná hmotnost na jednotku množství půdy	$C_p^{ads}(eq)$	µg/g							

Regresní analýza:

hodnota:

hodnota 1/n:

regresní koeficient r^2 :

Zkoušená látka:

Zkušební půda:

Obsah sušiny v půdě (105 °C, 12 hodin): %

Teplota: °C

Použitá metodika analýzy: Nepřímá Paralelní Sériová

Desorpční zkouška

	Symbol	Jednotky	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Číslo zkušební nádoby z adsorpčního experimentu						
Hmotnost látky adsorbované v půdě při adsorpční rovnováze	$m_p^{ads}(eq)$	µg				
Odebraný objem vodné fáze nahrazený 0,01 M CaCl ₂	V_R	cm ³				
Celkový objem vodné fáze v kontaktu s půdou	PM	V_0	cm ³			
	SM	V_T	cm ³			
Hmotnost látky zbylé z rovnováhy v důsledku neúplné výměny objemu vodné fáze	m_{vod}^A	µg				

Desorpční kinetika

Naměřená hmotnost látky desorbované z půdy v čase t_i	$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Objem roztoku odebraný ze zkušební nádoby (i) pro měření zkoušené látky	PM	V_f^i	cm ³			
	SM	v_a^D	cm ³			
Hmotnost látky desorbované z půdy v čase t_i (vypočtená)	$m_{vod}^{des}(t_i)$	µg				
Hmotnost látky desorbované z půdy během časového intervalu (vypočtená)	$m_{vod}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

Procento desorpce

Desorpce v čase t_i	D_{t_i}	%				
-----------------------	-----------	---	--	--	--	--

▼B

	Symbol	Jednotky	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Desorpce v časovém intervalu	$D_{\Delta t_i}$	%				
Zdánlivý desorpční koeficient	K_{des}					

PM: paralelní metoda

SM: sériová metoda

▼B**C.19. ODHAD ADSORPČNÍHO KOEFICIENTU (K_{ou}) PRO PŮDY A ČISTÍRENSKÉ KALY POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE (HPLC)****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG121 (2000).

1.1. ÚVOD

Sorpční chování látek v půdách a v čistírenských kalech může být popsáno parametry experimentálně stanovenými zkušební metodou C.18. Důležitým parametrem je adsorpční koeficient, který je definován jako poměr koncentrace látky v půdě nebo kalu a koncentrace látky ve vodné fázi při rovnováze. Adsorpční koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíku v půdě K_{ou} je užitečným ukazatelem schopnosti chemické látky vázat se na organické látky v půdě a v čistírenském kalu a umožňuje porovnat různé chemické látky. Tento parametr lze odhadnout z korelace s rozpustností ve vodě a s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Experimentální metoda popsaná v této zkoušce používá k odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} v půdě a v čistírenských kalech vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (8). Tyto odhady jsou spolehlivější než odhady z výpočtů metodikou QSAR (9). Jako metoda odhadu nemůže plně nahradit šaržovitou rovnovážnou metodu použitou v metodě C.18. Odhady K_{ou} však mohou být užitečné pro volbu vhodných parametrů pro adsorpční/desorpční studie podle zkušební metody C.18, a to výpočtem K_d (distribučního koeficientu) nebo K_f (Freundlichova adsorpčního koeficientu) z rovnice 3 (viz bod 1.2).

1.2. DEFINICE

K_d : Distribuční koeficient je definován jako poměr rovnovážných koncentrací C rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému skládajícím se ze sorbentu (půda nebo čistírenský kal) a vodné fáze; je bezrozměrný, jsou-li koncentrace v obou fázích vyjádřeny na hmotnostním základě. Je-li koncentrace ve vodné fázi vyjádřena na základě hmotnost/objem, je jednotkou ml/g. K_d se může měnit s vlastnostmi sorbentu a může záviset na koncentraci.

$$K_d = \frac{C_{p\u00fada}}{C_{vod}} \text{ nebo } \frac{C_{kal}}{C_{vod}} \quad (1)$$

kde:

$C_{p\u00fada}$ = koncentrace zkoušené látky v půdě při rovnováze ($\mu\text{g/g}$);

C_{kal} = koncentrace zkoušené látky v kalu při rovnováze ($\mu\text{g/g}$);

C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$).

▼ B

K_f: Freundlichův adsorpční koeficient je definován jako koncentrace zkoušené látky v půdě nebo v čistírenském kalu (x/m), je-li rovnovážná koncentrace C_{vod} ve vodné fázi rovna jedné; vyjadřuje se v $\mu\text{g/g}$ sorbentu. Hodnota se může měnit s vlastnostmi sorbentu.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{\text{vod}} \quad (2)$$

kde:

x/m = množství zkoušené látky x (μg) adsorbované při rovnováze na určitém množství sorbentu m (g);

$1/n$ = směrnice Freundlichovy adsorpční isothermy;

C_{vod} = koncentrace zkoušené látky ve vodné fázi při rovnováze ($\mu\text{g/ml}$).

$$\text{Při } C_{\text{vod}} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{ou}: Distribuční koeficient (K_d) nebo Freundlichův adsorpční koeficient (K_f) normalizovaný na obsah organického uhlíku (f_{ou}) v sorbentu; zejména u neionizovatelných chemických látek je přibližným ukazatelem míry adsorpce látky na sorbentu a umožňuje provést porovnání různých chemických látek. V závislosti na rozměru K_d a K_f , K_{ou} může být bezrozměrný nebo může být jeho jednotkou ml/g nebo $\mu\text{g/g}$ organického materiálu.

$$K_{\text{ou}} = \frac{K_d}{f_{\text{ou}}} \text{ (bezrozměrný nebo v ml/g)} \text{ nebo } \frac{K_f}{f_{\text{ou}}} \text{ (}\mu\text{g/g)} \quad (3)$$

Vztah mezi K_{ou} a K_d není vždy lineární a hodnoty K_{ou} se mohou pro jednotlivé půdy měnit, avšak jejich změny jsou značně omezeny ve srovnání s hodnotami K_d nebo K_f .

Adsorpční koeficient (K_{ou}) lze odečíst pomocí kapacitního faktoru (k') z kalibrační křivky $\log k'$ versus $\log K_{\text{ou}}$ pro vybrané referenční sloučeniny.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kde:

t_R = retenční časy zkoušené a referenční látky v HPLC (min)

t_0 = mrtvý čas HPLC (min) (viz bod 1.8.2).

P_{o/v}: Rozdělovací koeficient oktanol/voda je definován jako poměr koncentrací rozpuštěné látky v oktanolu a ve vodě; je bezrozměrný.

$$P_{\text{o/v}} = \frac{C_{\text{oktanol}}}{C_{\text{voda}}} (= K_{\text{o/v}}) \quad (5)$$

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Před použitím metody by měly být známy strukturální vzorec, čistota a disociační konstanta (pokud existuje). Užitečné jsou informace o rozpustnosti ve vodě a v organických rozpouštědlech, o rozdělovacím koeficientu oktanol-voda a o hydrolýze.

▼B

Mají-li se korelovat naměřené retenční údaje z HPLC pro zkoušenou látku s jejím adsorpčním koeficientem, musí být sestrojen kalibrační graf $\log K_{ou}$, K_{ou} versus $\log k'$. Použije se minimálně šest referenčních bodů, alespoň po jednom nad a pod očekávanou hodnotou pro zkoušenou látku. Správnost metody se významně zlepší, budou-li použity referenční látky, které mají podobnou strukturu jako zkoušená látka. Nejsou-li takové údaje k dispozici, ponechává se na uživateli, aby vybral vhodné kalibrační látky. V takovém případě by měla být vybrán obecnější soubor strukturně heterogenních látek. Látky a jejich hodnoty K_{ou} , které mohou být použity, jsou uvedeny v dodatku, a to v tabulce 1 pro čistírenský kal a v tabulce 3 pro půdu. Volba jiných kalibračních látek by měla být zdůvodněna.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

HPLC se provádí na analytických kolonách plněných komerčně dostupnou kyanopropylovou stacionární fází obsahující lipofilní a polární skupiny. Použije se mírně polární stacionární fáze na silikagelové matici:

— O — Si	— CH ₂ — CH ₂ — CH ₂	— CN
silikagel	nepolární spojka	polární skupina

Podstata zkušební metody je obdobná jako ve zkušební metodě A.8 (rozdělovací koeficient, metoda HPLC). Při průchodu kolonou s mobilní fází zkoušená látka interaguje se stacionární fází. V důsledku distribuce mezi mobilní a stacionární fází se postup zkoušené látky zpomaluje. Dvojití složení stacionární fáze s polárními a nepolárními místy umožňuje interakci polárních a nepolárních skupin molekuly podobně jako v organickém materiálu v půdě nebo v matici čistírenského kalu. To umožňuje stanovit vztah mezi retenčním časem v koloně a adsorpčním koeficientem na organickém materiálu.

pH má významný vliv na sorpční chování zejména u polárních látek. U zemědělských půd nebo nádrží s čistírenskými kaly se pH normálně pohybuje od pH 5,5 do 7,5. U ionizovatelných látek se ve vhodném pufru provedou dvě zkoušky, a to jak s ionizovanou formou, tak s neionizovanou formou, avšak pouze v případě, že v rozmezí pH 5,5 až 7,5 je ionizováno alespoň 10 % zkoušené sloučeniny.

Vzhledem k tomu, že se k hodnocení použije pouze vztah mezi retencí na koloně HPLC a adsorpčním koeficientem, není nutná žádná kvantitativní metoda, nýbrž pouze stanovení retenčního času. Je-li k dispozici vhodný soubor referenčních látek a lze-li užít standardní experimentální podmínky, poskytuje metoda rychlý a účinný způsob odhadu adsorpčního koeficientu K_{ou} .

1.5. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Metoda HPLC je použitelná pro chemické látky (isotopově značené i neznačené), pro něž je k dispozici vhodný detekční systém (např. spektrofotometr, detektor radioaktivity) a jež jsou po dobu experimentu dostatečně stálé. Může být zvláště užitečná pro chemické látky, jejichž studium je v jiných experimentálních systémech obtížné (pro těkavé látky, látky, které nejsou rozpustné ve vodě v koncentraci, kterou lze analyticky měřit, pro látky s vysokou afinitou k povrchu inkubačních systémů). Metoda může být použita pro směsi, které dávají nerozlišitelné eluční pásy. v takovém případě se stanoví horní a dolní meze hodnot $\log K_{ou}$ pro sloučeniny přítomné ve směsi.

▼B

Nečistoty mohou někdy působit problémy při interpretaci výsledků HPLC, ale ty nejsou příliš důležité, neboť zkoušené látky lze jasně analyticky identifikovat a oddělit od nečistot.

Metoda je validována pro látky uvedené v tabulce 1 v dodatku a byla rovněž použita u řady jiných chemických látek z těchto chemických tříd:

- aromatické aminy (např. trifluralin, 4-chloranilin, 3,5-dinitroanilin, 4-methylanilin, N-methylanilin, 1-naftylamin),
- estery aromatických kyseliny (např. methyl-benzoát, ethyl-3,5-dinitrobenzoát),
- aromatické uhlovodíky a deriváty (např. toluen, xylen, ethylbenzen, nitrobenzen),
- estery aryloxyfenoxypropanové kyseliny (např. diklofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl),
- benzimidazolové a imidazolové fungicidy (např. karbendazim, fuberidazol, triazoxid),
- amidy karboxylových kyseliny (např. 2-chlorbenzamid, N,N-dimethylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-methylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),
- chlorované uhlovodíky (např. endosulfan, DDT, hexachlorbenzen, kvintozen, 1,2,3-trichlorbenzen),
- organofosforové insekticidy (např. azinfosmethyl, disulfoton, fenamifos, isofenfos, pyrazofos, sulprofos, triazofos),
- fenoly (např. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlorfenol, 2,4,6-trichlorfenol, 1-naftol),
- deriváty fenylmočoviny (např. isoproturon, monolinuron, pencykuron),
- pigmentová barviva (např. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),
- polyaromatické uhlovodíky (např. acenaften, naftalen),
- 1,3,5-triazinové herbicidy (např. prometryn, propazin, simazin, terbutryn),
- triazolové deriváty (např. tebukonazol, triadimefon, tradimenol, triapenthenol).

Metoda není použitelná pro látky, které reagují s eluentem nebo stacionární fází. Rovněž není použitelná pro látky, které interagují specifickým způsobem s anorganickými složkami (např. tvoří klastrové komplexy s minerály jílu). Metoda nemusí fungovat pro povrchově aktivní látky, anorganické sloučeniny a pro středně silné nebo silné organické kyseliny a zásady. Lze stanovit hodnotu log K_{ou} od 1,5 do 5,0. Ionizovatelné látky musí být měřeny s pufovanou mobilní fází, avšak je třeba dbát na to, aby se předešlo srážení složek pufru nebo zkoušené látky.

▼ B

1.6. KRITÉRIA JAKOSTI

1.6.1. **Správnost**

Obvykle lze adsorpční koeficient zkoušené látky stanovit v rozmezí +/- 0,5 řádu hodnoty stanovené šaržovitou rovnovážnou metodou (viz tabulka 1 v dodatku). Vyšší správnosti lze dosáhnout, pokud jsou použité referenční látky strukturně příbuzné se zkoušenou látkou.

1.6.2. **Opakovatelnost**

Stanovení se provedou alespoň dvakrát. Hodnoty $\log K_{ou}$ získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí $\pm 0,1$.

1.6.3. **Reprodukovatelnost**

Dosud získané zkušenosti s použitím metody potvrzují její validitu. Ověřování metody HPLC za použití 48 látek (převážně pesticidů), u nichž byly k dispozici spolehlivé údaje o K_{ou} v půdě, vedlo ke korelačnímu koeficientu $R = 0,95$ (10, 11).

Pro zlepšení a validaci metody bylo proveden mezilaboratorní srovnávací test za účasti 11 laboratoří (12). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2 v dodatku.

1.7. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.7.1. **Předběžný odhad adsorpčního koeficientu**

Rozdělovací poměr oktanolvoda P_{ov} ($= K_{ov}$) a do určité míry i rozpustnost ve vodě lze použít jako indikátory rozsahu adsorpce zejména u neionizovaných látek, a mohou tedy být použity pro jeho předběžné určení. Pro různé skupiny chemických látek byla publikována řada užitečných korelací (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

1.7.2. **Přístroje a pomůcky**

Nezbytným vybavením je kapalinový chromatograf vybavený bezpulzním čerpadlem a vhodným detekčním zařízením. Doporučuje se používat nástříkový ventil se vstříkovací smyčkou. Použije se komerční fáze s vázanými kyanopropylovými skupinami na silikagelu (např. Hypersil a Zorbax CN). Mezi nástříkem a analytickou kolonou může být umístěna předkolona ze stejného materiálu. Kolony od různých dodavatelů se mohou podstatně lišit, pokud jde o účinnost. Jako vodítka by měly být dosaženy následující kapacitní faktory: $\log k' > 0,0$ pro $\log K_{ou} = 3,0$ a $\log k' > -0,4$ pro $\log K_{ou} = 2,0$ při použití směsi methanol/voda 55/45 % jako mobilní fáze.

1.7.3. **Mobilní fáze**

Bylo testováno několik mobilních fází a doporučují se tyto dvě mobilní fáze:

— methanol/voda (55/45 % obj.),

— methanol/0,01 M citrátový pufr pH 6,0 (55/45 % obj.).

▼ B

K přípravě elučního rozpouštědla se použije methanol a voda nebo citrátový pufr, vše čistoty pro HPLC. Směs se před použitím odplyní. Měla by být provedena isokratická eluce. Nevyhovuje-li směs methanol/voda, lze vyzkoušet směsi jiných organických rozpouštědel s vodou, např. směsi ethanol/voda nebo acetonitril/voda. U ionizovatelných sloučenin se doporučuje použití pufru ke stabilizaci pH. Je nezbytné dbát na to, aby se zamezilo srážení solí a narušení kolony, ke kterému dochází u některých směsi organické fáze s pufrům.

Nesmí být použity žádné přísady, jako jsou iontově párová činidla, neboť mohou ovlivnit sorpční vlastnosti stacionární fáze. Takové změny mohou být nevratné. Z tohoto důvodu musí být experimenty s použitím přísad prováděny na zvláštních kolonách.

1.7.4. **Rozpuštěné látky**

Zkoušené a referenční látky se rozpustí v mobilní fázi.

1.8. **PROVEDENÍ ZKOUŠKY**

1.8.1. **Zkušební podmínky**

Teplota během měření se zaznamenává. Pro zajištění konstantních podmínek během kalibrace a předběžných měření a během měření zkoušené látky se velmi doporučuje použití kolony s regulací teploty.

1.8.2. **Stanovení mrtvého času t_0**

Pro stanovení mrtvého času lze použít dvě různé metody (viz také bod 1.2).

1.8.2.1. *Stanovení mrtvého času t_0 pomocí homologické řady*

Je ověřeno, že tato metoda poskytuje spolehlivé a standardizované hodnoty t_0 . Podrobnosti viz zkušební metoda A.8 Rozdělovací koeficient (oktanol/voda) metodou HPLC.

1.8.2.2. *Stanovení mrtvého času t_0 pomocí inertních látek, které nejsou v koloně zadržovány*

Tato technika je založena na nástřiku roztoků formamidu, močoviny nebo dusičnanu sodného. Měření se provedou alespoň dvakrát.

1.8.3. **Stanovení retenčních časů t_R**

Referenční látky se vyberou tak, jak je uvedeno v bodu 1.3. Pro stanovení jejich retenčních časů mohou být nástřiknuty jako směsný standard, pokud je potvrzeno, že retenční čas žádného referenčního standardu není ovlivňován přítomností ostatních referenčních standardů. Kalibrace by měla být prováděna pravidelně, alespoň dvakrát denně, aby se objasnily neočekané změny účinnosti kolony. Nástřiky pro kalibraci by měly být prováděny přednostně před nástřikem zkoušené látky a po něm, aby se potvrdilo, že nedošlo ke změně retenčních časů. Zkoušené látky se nástřiknou odděleně v co nejmenších množstvích (aby se kolona nepřetížila) a stanoví se jejich retenční časy.

▼B

S cílem zvýšit důvěryhodnost měření musí být provedena alespoň dvě stanovení. Hodnoty $\log K_{ou}$ získané z jednotlivých měření by měly ležet v rozmezí $\pm 0,25$.

1.8.4. **Hodnocení**

Kapacitní faktory k' se vypočtou z mrtvého času t_0 a retenčních časů t_R vybraných referenčních látek podle rovnice 4 (viz bod 1.2). Hodnoty $\log k'$ referenčních látek se poté vynesou proti jejich hodnotám $\log K_{ou}$ z experimentů šaržovitou rovnovážnou metodou uvedeným v tabulkách 1 a 3 v dodatku. Z tohoto grafu se poté s použitím hodnoty $\log k'$ zkoušené látky určí její hodnota $\log K_{ou}$. Je-li z vlastních výsledků zřejmé, že hodnota $\log K_{ou}$ leží mimo obor kalibrační křivky, zkouška se opakuje s vhodnějšími referenčními látkami.

2. **ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ**

Zpráva musí obsahovat tyto informace:

- identifikace zkoušené látky a referenčních látek, jejich čistota a podle potřeby hodnoty pK_a ,
- popis zařízení a pracovních podmínek, např. typ a rozměry analytické kolony a předkolony, detekční zařízení, mobilní fáze (poměr složek a pH), rozmezí teploty během měření,
- mrtvý čas a použitá metoda jeho stanovení,
- množství zkoušené látky a referenčních látek zavedených do kolony,
- retenční časy referenčních sloučenin použitých ke kalibraci,
- charakteristiky proložené regresní křivky ($\log k'$ versus $\log K_{ou}$) a graf regresní křivky,
- průměrné retenční údaje a odhad hodnoty $\log K_{ou}$ zkoušené sloučeniny,
- chromatogramy.

3. **LITERATURA**

- 1) W.J. Lyman, W.F. Reehl, D.H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, chapt. 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, 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, 227–231.
- 5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, 297–312.

▼B

- 6) C.T. Chiou, L.J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, *Science*, 106, 831–832.
- 7) S.W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, 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), 121–128.
- 9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), 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), 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, 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), 1373–1384.



DODATEK

Tabulka 1

Srovnání hodnot K_{ou} pro půdy a čistírenské kaly a hodnot vypočtených screeningovou metodou s HPLC ⁽¹⁾, ⁽²⁾

Látka	Číslo CAS	log K_{ou} pro čistírenské kaly	log K_{ou} pomocí HPLC		log K_{ou} pro půdy	log K_{ou} pomocí HPLC	
Atrazin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fenthion	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenanthren	85-01-8	4,35	3,72	^{0,63}	4,09	3,52	0,57
Fenylbenzoát	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-Dichloranilin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

⁽¹⁾ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121–128.

⁽²⁾ W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107–119.

Tabulka 2

Výsledky mezilaboratorního srovnávacího testu provedeného za účelem zlepšení a validace metody HPLC (11 zúčastněných laboratoří) ⁽¹⁾

Látka	Číslo CAS	log K_{ou}	K_{ou}	log K_{ou}
		(OECD 106)	HPLC	
Atrazin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuron	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapenthenol	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuron	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fenthion	55-38-9	3,31	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), 1373–1384.



Tabulka 3

Referenční látky doporučené pro screeningovou metodu s HPLC na základě adsorpčních údajů pro půdu

Referenční látka	Číslo CAS	Logaritmy středních hodnot K_{ou} z šaržovitě rovnovážné metody	Počet hodnot K_{ou}	Logaritmus směrodatné odchylky	Zdroj
Acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobenzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N,N-Dimethylbenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-Methylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Methyl-benzoát	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrazin	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-Nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Anilin	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-Dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triazoxide	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftalen	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Methiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-Trichlorbenzen	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
γ -HCH (lindan)	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fenthion	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
alfa-Endosulfan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diklofop-methyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenanthren	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (směs)	26850-47-5	4,89	4	4,46	(a)
	12270-13-2				
DDT	50-29-3	5,63	1	—	(b)

(a) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01044 (1994).

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285–304

(c) Údaje poskytnuté průmyslem.

▼B**C.20. ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI U *DAPHNIA MAGNA*****1. METODA**

Tato zkouška toxicity pro reprodukci je replikou metody OECD TG 211 (1998).

1.1. ÚVOD

Hlavním cílem zkoušky je posoudit účinky chemických látek na reprodukční schopnost druhu *Daphnia magna*.

1.2. DEFINICE A JEDNOTKY

Rodičovské organismy: dafnie samičího pohlaví, které jsou přítomné na začátku zkoušky a jejich reprodukční schopnost je předmětem studie.

Potomstvo: mladé dafnie pocházející z rodičovských organismů v průběhu zkoušky.

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (lowest observed effect concentration, LOEC): nejnižší zkušební koncentrace, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na reprodukci a na mortalitu rodičovských organismů (na hladině významnosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolní skupinou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí mít škodlivé účinky stejné nebo větší, než účinky pozorované při LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (no observed effect concentration NOEC): zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC, která při srovnání s kontrolní skupinou nemá pro danou expoziční dobu statisticky významný účinek (při $p < 0,05$).

EC_x: koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve vodě, která pro danou expoziční dobu vede k x % snížení reprodukce dafnií *Daphnia magna*.

Vnitřní míra růstu populace: míra růstu populace, v níž je zahrnuta reprodukční schopnost a mortalita specifická z hlediska stáří (20, 21, 22). V ustáleném stavu bude nulový. Pro rostoucí populaci bude kladný a pro snižující se populaci bude záporný. Je zřejmé, že při záporném růstu nelze druh zachovat a nakonec dojde k jeho vyhybnutí.

Mez detekovatelnosti: nejnižší koncentrace, v níž lze látku detekovat, nikoli však stanovit.

Mez stanovitelnosti: nejnižší koncentrace, v níž lze látku kvantitativně naměřit.

Mortalita: organismus se zaznamená jako mrtvý, je-li nepohyblivý, tj. není-li schopen plavat nebo není-li u končetin nebo zadečku pozorován pohyb do 15 sekund po lehkém zatřepání zkušební nádobou. (Použije-li se jiná definice, musí být uvedena společně s odkazem na literaturu.)

▼ B

1.3. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Mladé samičí dafnie (rodičovské organismy) na začátku zkoušky mladší než 24 hodin se exponují zkoušené látce přidané do vody v určitém rozsahu koncentrací. Zkouška trvá 21 dní. Na konci zkoušky se odhadne celkový počet vylíhnutých živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který přežil do konce zkoušky. To znamená, že nedospělé dafnie pocházející z dospělých dafnií, které v průběhu zkoušky uhynuly, se z odhadů vyloučí. Reprodukční schopnost rodičovských organismů lze vyjádřit jiným způsobem (např. jako počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu za den, a to od prvního dne, kdy bylo potomstvo pozorováno), který se však uvede doplňkově vedle celkového počtu nedospělých dafnií pocházejících z jedné rodičovské dafnie živé na konci zkoušky. Reprodukční schopnost organismů exponovaných zkoušené látce se porovná s reprodukční schopností kontrolní skupiny (kontrolních skupin) s cílem stanovit nejnižší koncentraci s pozorovanými účinky (LOEC), a tím i koncentraci bez pozorovaných účinků (NOEC). Kromě toho se údaje pokud možno analyzují pomocí regresního modelu s cílem odhadnout koncentraci, která vyvolává x % snížení reprodukční schopnosti, (tj. EC₅₀, EC₂₀ nebo EC₁₀).

Musí být rovněž uvedeno přežití rodičovských organismů a okamžik vylíhnutí prvních potomků. Zkoumány mohou být také jiné účinky vyvolané látkou, které mají vliv na charakteristiky, jako jsou růst (např. vliv na délku) a popřípadě vnitřní míra růstu populace

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Měly by být k dispozici výsledky zkoušky akutní toxicity (viz metoda C.2, část I) provedené u *Daphnia magna*. Výsledky mohou být užitečné pro volbu vhodného rozsahu zkušebních koncentrací ve zkouškách toxicity pro reprodukci. Měly by být známy rozpustnost zkoušené látky ve vodě a tlak jejích par a měla by být k dispozici spolehlivá analytická metoda kvantitativního stanovení látky ve zkušebních roztocích, a to s doloženým výtěžkem a mezi stanovitelnosti.

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturní vzorec, čistota látky, stálost na světle, stálost v podmínkách zkoušky pKa, P_{0/v} a výsledky zkoušky snadné biologické rozložitelnosti (viz metoda C.4).

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být u kontrolní skupiny (kontrolních skupin) splněna tato kritéria reprodukční schopnosti:

- mortalita rodičovských organismů (dafnií samičího pohlaví) nesmí na konci zkoušky překročit 20 %,
- střední hodnota počtu živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu živého na konci zkoušky je ≥ 60 .

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. Přístroje a pomůcky

Zkušební nádoby nebo jiné přístroje a pomůcky, které přijdou do styku se zkušebními roztoky, by měly být skleněné nebo z jiného chemicky inertního materiálu. Zkušebními nádobami jsou obvykle skleněné kádinky.

Kromě toho bude nezbytné některé nebo veškeré toto zařízení:

- přístroj pro měření koncentrace kyslíku (s mikroelektrodou nebo jiným vhodným vybavením na měření koncentrace rozpuštěného kyslíku ve vzorcích malého objemu),

▼ B

- vhodný přístroj pro regulaci teploty,
- pH-metr,
- vybavení pro stanovení tvrdosti vody,
- zařízení pro stanovení celkového organického uhlíku (TOC) ve vodě nebo zařízení pro stanovení chemické spotřeby kyslíku (COD),
- vhodné zařízení pro ovládání režimu osvětlení a pro měření intenzity světla.

1.6.2. Testovací organismy

Ke zkoušce se použije druh *Daphnia magna* Straus. Jiné druhy dafnií mohou být použity, pokud splňují příslušná kritéria validity (kritérium validity týkající se reprodukční schopnosti kontrolních skupin by mělo být relevantní pro daný druh dafnií). Použijí-li se jiné druhy dafnií, musí být jasně identifikovány a jejich použití musí být zdůvodněno.

Klon by měl být identifikován přednostně uvedením genotypu. Výzkum (1) ukázal, že reprodukční schopnost klonu A (který pochází z institutu IRCHA ve Francii) (3) stabilně splňuje kritérium validity, jímž je ≥ 60 potomků na přeživší rodičovský organismus při kultivaci za podmínek popsaných v této metodě. Jiné klony jsou však přijatelné, splňuje-li kultura dafnií prokazatelně kritéria validity pro tuto zkoušku.

Na začátku zkoušky musí být dafnie nejvýše 24 hodin staré a nesmí pocházet z první generace potomků. Musí pocházet ze zdravé kultury (tj. nesmí vykazovat známky stresu, např. zvýšenou mortalitu, přítomnost jedinců samčího pohlaví a efipií, zpoždění produkce prvních potomků, přítomnost jinak zbarvených jedinců atd.). Organismy z kmenové kultury musí být chovány v podmínkách podobných těm, které mají být použity při zkoušce (osvětlení, teplota, médium, krmení a počet dafnií na jednotku objemu). Liší-li se kultura média pro dafnie, které má být použito při zkoušce, od média používaného k rutinní kultivaci dafnií, doporučuje se zařadit před zkouškou obvykle třítydenní aklimatizační období (tj. v délce odpovídající jedné generaci), aby nedošlo u rodičovských organismů ke stresu.

1.6.3. Zkušební médium

Doporučuje se, aby bylo v této zkoušce použito přesně definované médium. Tím se lze vyhnout použití přísad (např. mořských řas, extraktu z půdy atd.), které je obtížné charakterizovat, a zvýšit tak vyhlídky mezilaboratorní standardizace. Elendtova média M4 (4) a M7 byla shledána pro tento účel jako vyhovující. Jiná média (např. (5, 6)) jsou však přijatelná, splňuje-li reprodukční schopnost kultury dafnií prokazatelně kritéria validity pro tuto zkoušku.

Použije-li se médium, které obsahuje nestanovené přísady, měly by být tyto přísady jasně specifikovány a v protokolu o zkoušce se uvedou informace o složení, a to zejména o obsahu organického uhlíku, neboť může přispívat k dodávané potravě. Doporučuje se, aby byl stanoven celkový organický uhlík (TOC) a/nebo chemická spotřeba kyslíku (COD) výchozího preparátu organické přísady a aby byl odhadnut výsledný příspěvek k TOC nebo COD ve zkušebním médiu. Doporučuje se, aby byly úrovně TOC v médiu (tj. před přidáním řas) nižší než 2 mg/l (7).

▼ B

Při zkoušení látek obsahujících kovy je důležité si uvědomit, že vlastnosti zkušebního média (např. tvrdost, chelatační schopnosti) mohou mít vliv na toxicitu látky. Z tohoto důvodu je žádoucí, aby bylo médium přesně definováno. V současnosti jsou však jedinými přesně definovanými médii, o nichž je známo, že jsou vhodná pro dlouhodobou kultivaci kultury druhu *Daphnia magna*, Elendtova média M4 a M7. Obě média obsahují chelatační činidlo EDTA. Práce (2) ukázaly, že provádí-li se zkouška v médiích M4 a M7, je „zdánlivá toxicita“ kadmia zpravidla nižší než v médiu, které neobsahuje EDTA. Média M4 a M7 se tedy nedoporučují pro zkoušení látek obsahujících kovy a neměla by se používat ani jiná média obsahující činidla známá svou chelatační schopností. V případě látek obsahujících kovy se doporučuje používat jiné médium, například rekonstituovanou tvrdou sladkou vodu podle ASTM (7), která neobsahuje EDTA a do níž je přidán extrakt z řas (8). Tato kombinace rekonstituované tvrdé sladké vody podle ASTM a extraktu z řas je také vhodná pro dlouhodobou kultivaci druhu *Daphnia magna* (2) a pro zkoušení na tomto druhu, přestože stále vykazuje slabé chelatační účinky způsobené organickými složkami přidaného extraktu z řas.

Na začátku zkoušky a v jejím průběhu by měla být koncentrace rozpuštěného kyslíku vyšší než 3 mg/l. pH by mělo být v rozmezí 6 až 9 a zpravidla by se nemělo v žádné zkoušce měnit o více než 1,5. Doporučuje se tvrdost nad 140 mg/l (jako CaCO₃). Ve zkouškách při této a vyšší tvrdosti reprodukční schopnost prokazatelně vyhovovala kritériím validity (9, 10).

1.6.4. Zkušební roztoky

Zkušební roztoky o zvolených koncentracích se obvykle připraví ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky se připraví nejlépe rozpuštěním látky ve zkušebním médiu.

Pro přípravu vhodně koncentrovaného zásobního roztoku může být někdy nezbytné použití organických rozpouštědel nebo dispergátorů, měla by však být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat. Ke vhodným rozpouštědlům patří aceton, ethanol, methanol, dimethylsulfoxid, dimethylformamid a triethylenglykol. Ke vhodným dispergátorům patří Cremophor RH40, 0,01 % methylcelulosa a HCO-40. V žádném případě by však neměl obsah zkoušené látky ve zkušebních roztocích vést k překročení její rozpustnosti ve zkušebním médiu.

K přípravě zásobního roztoku, který lze přesně dávkovat do vody, se použijí rozpouštědla. Při doporučené koncentraci rozpouštědla v konečném zkušebním médiu (tj. $\leq 0,1$ ml/l) nejsou výše uvedené rozpouštědla toxická a nezvyšují rozpustnost látky ve vodě.

Dispersanty mohou usnadnit přesné dávkování a dispergaci. Při doporučené koncentraci v konečném zkušebním médiu ($\leq 0,1$ ml/l) nejsou výše uvedené dispergátory toxické a nezvyšují rozpustnost látky ve vodě.

▼ B

1.7. USPOŘÁDÁNÍ ZKOUŠKY

Expozice se rozvrhne pro jednotlivé zkušební nádoby a veškerá další manipulace se zkušebními nádobami se provádějí náhodně. Nedo-držení této zásady může vést k jednostrannému vychýlení, které může být považováno za účinek koncentrace. Je-li například s experimentálními jednotkami manipulováno v pořadí varianty nebo v pořadí koncentrací, mohl nějaký časově podmíněný efekt, např. únava obsluhy nebo jiné pochybení, vést k vyšším účinkům při vyšších koncentracích. Mohou-li být výsledky ovlivněny počátečními podmínkami zkoušky nebo okolními podmínkami, jako je např. umístění v laboratoři, mělo by být dále zváženo blokové uspořádání zkoušky.

1.8. POSTUP

1.8.1. **Podmínky expozice**1.8.1.1. *Délka expozice*

Zkouška trvá 21 dní.

1.8.1.2. *Nasazování*

Rodičovské organismy se umístí po jednom do zkušebních nádob s 50 až 100 ml média.

V některých případech může být nezbytné použít větší objemy, aby bylo možné splnit požadavky analytické metody použité pro stanovení koncentrace zkoušené látky, třebaže je sdružování paralelních vzorků k chemické analýze rovněž přípustné. Jsou-li použity objemy větší než 100 ml, může být nezbytné zvýšit dávky podávané dafniím, aby se zajistila odpovídající dostupnost potravy a splnila kritéria validity. U průtokových zkoušek mohou být z technických důvodů zvážena jiná uspořádání (např. čtyři skupiny po 10 organismech ve větším zkušebním objemu), avšak jakékoli změny uspořádání zkoušky musí být uvedeny.

1.8.1.3. *Počet organismů*

U semistatických zkoušek se nasadí jednotlivě alespoň 10 organismů pro každou zkušební koncentraci a alespoň 10 organismů jednotlivě do kontrolních skupin.

U průtokových zkoušek se ukázalo vhodným rozdělit pro každou koncentraci 40 organismů do čtyř skupin po 10 organismech (1). Může být použit menší počet testovacích organismů, přičemž se doporučuje na jednu koncentraci rozdělit minimálně 20 organismů do dvou nebo více paralelních skupin o stejném počtu organismů (např. čtyři paralelní skupiny po pěti dafniích). Je třeba poznamenat, že u zkoušek, při nichž se organismy nasazují jako skupiny, nebude možné vyjádřit reprodukční schopnost jako počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který přežil do konce zkoušky, v případě, že rodičovský organismus uhynie. V takovém případě se reprodukční schopnost vyjádří jako „celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu přítomného na začátku zkoušky“.

1.8.1.4. *Krmení*

U semistatických zkoušek se dafnie krmí přednostně denně, nejméně však třikrát týdně (tj. s výměnou média). Odchyly od této praxe (např. u průtokových zkoušek) se uvedou v protokolu.

▼ B

Potrava rodičovských organismů během zkoušky by měla sestávat přednostně z živých jednobuněčných řas jednoho nebo více těchto druhů: *Chlorella* sp., *Selenastrum capricornutum* (nyní *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) a *Scenedesmus subspicatus*. Dodávaná potrava by měla vycházet z množství organického uhlíku (C) dodávaného na jeden rodičovský organismus. Výzkum (12) ukázal, že u druhu *Daphnia magna* je množství potravy obsahující od 0,1 do 0,2 mg C na dafnii za den dostatečné na to, aby bylo dosaženo požadovaného potomstva nezbytného pro splnění kritérií validity. Potrava může být dodávána buď ve stejných dávkách po celou dobu zkoušky, nebo podle požadavku v nižších dávkách na začátku zkoušky a poté ve zvyšujících se dávkách s ohledem na růst rodičovských organismů. V takovém případě by mělo množství potravy po celou dobu obsahovat doporučené množství 0,1 až 0,2 mg C na dafnii za den.

Použije-li se k určení požadovaného množství potravy zástupný ukazatel, jako je počet jednobuněčných řas nebo absorbance ve viditelném světle (z praktických důvodů, neboť měření obsahu uhlíku je časově náročné), musí každá laboratoř vytvořit vlastní nomogram vztahu zástupného ukazatele a obsahu uhlíku v kultuře řas (viz dodatek 2 s návodem na vytvoření nomogramu). Nomogramy by měly být ověřovány jednou ročně a častěji v případě, že se změni podmínky kultivace řas. Absorbance ve viditelném světle byla shledána lepším zástupným ukazatelem celkového obsahu uhlíku než počet buněk (13).

Dafniím by měla být dodávána koncentrovaná suspence řas, aby se minimalizoval objem kultivačního média řas uváděný do zkušební nádoby. Zkoncentrování řas lze dosáhnout centrifugací a následnou resuspensí v destilované vodě, v deionizované vodě nebo v kultivačním médiu dafnií.

1.8.1.5. *Osvětlení*

16 hodin světla při intenzitě nepřekračující 15 až 20 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6. *Teplota*

Teplota testovacího média by měla být v rozmezí 18–22 °C. V žádné zkoušce by však teplota neměla v těchto mezích kolísat o více než 2 °C (např. 18 až 20, 19 až 21 nebo 20 až 22 °C). Pro účely sledování teploty může být vhodné použít další zkušební nádobu.

1.8.1.7. *Provzdušňování*

Zkušební nádoby nesmí být během zkoušky provzdušňovány.

1.8.2. **Zkušební koncentrace**

Zpravidla se použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu s faktorem nepřekračujícím 3,2 a přiměřený počet paralelních zkušebních skupin v rámci každé zkušební koncentrace (viz bod 1.8.1.3). Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. Látky by neměly být zkoušeny při koncentracích vyšších, než je jejich rozpustnost ve zkušebním médiu.

▼B

Při volbě rozsahu koncentrací měly být zohledněny tyto zásady:

- i) je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejnižší zkušební koncentrace dostatečně nízká, aby nebyla plodnost při této koncentraci významně nižší, než je plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se sníženou nejnižší koncentrací;
- ii) je-li cílem získat LOEC/NOEC, musí být nejvyšší zkušební koncentrace dostatečně vysoká, aby byla plodnost při této koncentraci významně nižší, než je plodnost v kontrolní skupině. V opačném případě bude muset být zkouška opakována se zvýšenou nejvyšší koncentrací;
- iii) má-li být pro účinky na reprodukci odhadnuta EC_X , doporučuje se, aby byl použit dostatečný počet koncentrací s cílem zjistit EC_X s přijatelným intervalem spolehlivosti. Je-li znám odhad EC_{50} pro účinky pro reprodukci, doporučuje se, aby byla nejvyšší zkušební koncentrace vyšší než tato EC_{50} . Jinak sice bude stále možné odhadnout EC_{50} , interval spolehlivosti však bude velmi široký a nemusí být možné uspokojivé posouzení přiměřenosti navrženého modelu;
- iv) do rozsahu zkušebních koncentrací by pokud možno neměly spadat koncentrace, které mají statisticky významný účinek na přežití dospělců, neboť by mohl být změněn charakter zkoušky z pouhé zkoušky toxicity pro reprodukci na kombinovanou zkoušku toxicity pro reprodukci a mortality, která vyžaduje daleko složitější statistickou analýzu.

Předchozí znalost toxicity zkoušené látky (např. ze zkoušek akutní toxicity nebo z orientačních studií) by měla pomoci při volbě vhodných zkušebních koncentrací.

Použije-li se k usnadnění přípravy zásobního roztoku rozpouštědlo nebo dispergátor (viz bod 1.6.4), neměla by být jeho konečná koncentrace ve zkušební nádobě vyšší než 0,1 ml/l a měla by být ve všech zkušebních nádobách stejná.

1.8.3. **Kontrolní skupiny**

Kromě zkušební série se nasadí jedna série kontrolních skupin pro kontrolu zkušebního média a podle potřeby jedna série kontrolních skupin obsahujících rozpouštědlo nebo dispergátor. Použije-li se rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být jejich koncentrace stejná jako koncentrace v nádobách se zkoušenou látkou. Použije se vhodný počet paralelních skupin (viz oddíl 1.8.1.3).

V dobře vedených zkouškách by měl být variační koeficient středního počtu živých potomků připadajících na rodičovský organismus v kontrolní skupině (kontrolních skupinách) zpravidla $\leq 25\%$, a měl být uveden v návrzích zkoušek s oddělenými jedinci.

1.8.4. **Obnovování zkušebního média**

Četnost obnovování média bude záviset na stálosti zkoušené látky, médium se však obnovuje alespoň třikrát týdně. Není-li podle předběžných zkoušek stálosti (viz bod 1.4) koncentrace zkoušené látky po maximální dobu mezi obnoveními média (tj. po tři dny) stálá (tj. nepohybuje-li se v intervalu 80–120 % nominální koncentrace nebo klesá-li pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), mělo by být zvaženo častější obnovování média nebo průtoková zkouška.

▼ B

Při obnovování média v semistatických zkouškách se připraví druhá série zkušebních nádob a rodičovské organismy se do nich přenesou např. skleněnou pipetou o vhodném průměru. Objem média přeneseného s dafniemi by měl být co nejmenší.

1.8.5. Pozorování

Výsledky pozorování prováděných během zkoušky se zaznamenávají do přehledu údajů (viz příklady v dodatcích 3 a 4). Jsou-li požadována další měření (viz body 1.3 a 1.8.8), může být nezbytné provádět další pozorování.

1.8.6. Potomstvo

Potomstvo pocházející z každého rodičovského organismu se od jeho prvního výskytu nejlépe denně vybírá a počítá, aby nespotebovávalo potravu určenou pro dospělého jedince. Pro účely této metody je třeba počítat pouze živé potomstvo, avšak přítomnost nevylihnutých vajíček nebo mrtvého potomstva se zaznamenává.

1.8.7. Mortalita

Mortalita rodičovských organismů se zaznamenává přednostně denně, a měla by být stanovována alespoň při počítání potomstva.

1.8.8. Další parametry

Třebaže je tato metoda navržena hlavně k posouzení účinků na reprodukci, mohou však být i jiné účinky kvantifikovány v míře dostatečné pro statistickou analýzu. Zvláště měření růstu jsou žádoucí, neboť poskytují informaci o možných subletálních účincích, které mohou být užitečnější než samotná měření reprodukce; doporučuje se na konci zkoušky změřit délku rodičovských organismů (tj. délku těla bez zadečkového hrotu). Mezi další parametry, které lze měřit nebo vypočítávat, patří doba do vylíhnutí prvních plůdků (a následně dalších potomků), počet a velikost potomků na jeden organismus, počet nevylihnutých plůdků, přítomnost jedinců samčího pohlaví nebo efipii a vnitřní míra růstu populace.

1.8.9. Četnost analytických stanovení a měření

Koncentrace kyslíku, teplota, tvrdost a pH se měří alespoň jednou týdně před obnovením média a po něm, v kontrolních nádobách a u nejvyšší zkušební koncentrace.

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky stanovují v pravidelných intervalech.

U semistatických zkoušek (s obnovováním média), u nichž se má zkušební koncentrace pohybovat v rozmezí ± 20 % nominálních hodnot (tj. od 80 do 120 % – viz body 1.4 a 1.4.8), se doporučuje analyzovat alespoň nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace ihned po jejich přípravě a při obnovování, a to jednou během prvního týdne zkoušky (tj. analýzy se provedou na vzorku z téhož roztoku – při jeho přípravě a při obnovování). Tato stanovení se poté opakují alespoň v týdenních intervalech.

▼B

U zkoušek, u nichž se nepředpokládá, že se bude koncentrace zkoušené látky pohybovat v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, je nezbytné analyzovat všechny zkušební koncentrace, a to ihned po jejich přípravě a při obnovování. U zkoušek, u nichž není naměřená počáteční koncentrace zkoušené látky v rozsahu ± 20 % nominální koncentrace, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počátečních koncentrací), by mohla být stanovení ve 2. a 3. týdnu zkoušky omezena na nejvyšší a nejnižší zkušební koncentrace. Ve všech případech je stanovení koncentrací zkoušené látky před obnovou třeba provést pro každou koncentraci pouze u jedné paralelní nádoby.

U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek (v tomto případě se však neprovádí měření „starých“ roztoků). Doporučuje se však zvýšit počet odběrů v prvním týdnu (např. tři sady měření) pro ujištění, že jsou zkušební koncentrace stálé. V těchto typech zkoušky se průtok ředící vody a zkoušené látky kontroluje denně.

Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, mohou být výsledky založeny na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, vyjádří se výsledky jako časově vážené průměry (viz dodatek 5).

2. ÚDAJE A JEJICH PŘEDKLÁDÁNÍ

2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Účelem této zkoušky je stanovit účinek zkoušené látky na celkový počet živých potomků pocházejících z jednoho rodičovského organismu, který přežil do konce zkoušky. Celkový počet potomků na rodičovský organismus se vypočte pro každou zkušební nádobu (tj. pro každou paralelní nádobu). Jestliže v kterékoli paralelní nádobě rodičovský organismus během zkoušky uhynie nebo se zjistí, že jde o samečka, vyloučí se nádoba z experimentu. Analýza se poté provede se zmenšeným počtem paralelních nádob.

Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC vztahujících se k účinkům chemické látky na reprodukční schopnosti je nezbytné vypočítat střední hodnotu reprodukční schopnosti pro všechny paralelní nádoby pro každou koncentraci a celkový residuální rozptyl, a to lze provést analýzou rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání. Užitečné mohou být Dunnettův nebo Williamsův test (14, 15, 16, 17). Je nezbytné ověřit, že je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Doporučuje se provést ověření raději graficky než formálním testem významnosti (18); vhodnou alternativou je Bartlettův test. Není-li tento předpoklad splněn, měla by být před provedením ANOVA zvážena transformace údajů za účelem homogenizace rozptylu, nebo by měla být provedena vážená ANOVA. Vypočte se a uveďte se velikost účinku zjistitelná pomocí ANOVA (tj. nejmenší významný rozdíl).

▼ B

Pro odhad koncentrace, která způsobuje 50 % snížení reprodukční schopnosti (tj. EC_{50}), se údaji proloží vhodná křivka (vhodné křivky), jako např. logistická křivka, a to statistickou metodou, např. metodou nejmenších čtverců nebo nelineární metodou nejmenších čtverců. Křivka by měla být parametrizována tak, aby bylo možné přímo odhadnout EC_{50} a její směrodatnou odchylku. To značně usnadní výpočet intervalů spolehlivosti pro hodnotu EC_{50} . Pokud nejsou dobré důvody pro upřednostnění jiných intervalů spolehlivosti, uvede se oboustranný 95 % interval spolehlivosti. Metoda proložení by měla pokud možno umožnit posouzení závažnosti nedostatků proložení. To lze provést graficky nebo rozdělením reziduálního součtu čtverců na složku „chyby v proložení“ a „náhodné chyby“ a provedením testu významnosti chyby v proložení. Vzhledem k tomu, že u expozic, jejichž důsledkem je vyšší reprodukční schopnost, je větší rozptyl počtu vylíhnutých potomků než u expozic vedoucích k nejnižší reprodukční schopnosti, je třeba promyslet vážení pozorovaných hodnot s cílem zohlednit různé rozptyly u různě exponovaných skupin (18).

Při analýze údajů z rozhodujícího okružního testu (2) byl použit tento model prokládající logistickou křivku; lze však použít i jiné modely:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

kde:

Y = celkový počet živých potomků na rodičovský organismus, který přežil do konce zkoušky (vypočteno pro každou nádobu);

x = koncentrace látky;

c = očekávaný počet potomků při $x = 0$;

x_0 = EC_{50} v populaci;

b = směrnice.

Tento model bude pravděpodobně vhodný pro velký počet situací, budou však existovat zkoušky, pro něž bude nevhodný. Jak bylo výše doporučeno, je třeba ověřit validitu modelu. V některých případech může být vhodnější model předpokládající hormesi, u něhož vedou nižší koncentrace k vyšším účinkům (19).

Lze rovněž odhadnout další koncentrace s určitým účinkem, např. EC_{10} nebo EC_{20} , může být však třeba použít jinou parametrizaci modelu, než je použita pro odhad EC_{50} .

2.2. PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace

2.2.1. Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a příslušné fyzikálně-chemické vlastnosti,

▼ B

— údaje o chemické identifikaci včetně údaje o čistotě.

2.2.2. Testovací druhy:

— klon (byl-li geneticky popsán), dodavatel nebo zdroj (je-li znám) a použité kultivační podmínky. Byl-li použit jiný druh než *Daphnia magna*, musí to být uvedeno a zdůvodněno.

2.2.3. Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (např. semistatická nebo průtoková metoda, objem, velikost obsádky v počtu dafnií na litr),

— fotoperioda a intenzita světla,

— uspořádání zkoušky (např. počet paralelních nádob, počet rodičovských organismů na jednu paralelní nádobu),

— podrobnosti o použitém kultivačním médiu,

— byly-li použity, přidané organické materiály včetně složení, zdroje, metody přípravy, TOC/COD výchozích preparátů, odhad výsledného TOC/COD ve zkušebním médiu,

— podrobné informace o krmení, zejména množství (v mg C na dafnii za den) a plán (např. typ krmiva, včetně specifického názvu (druhu) u řas a kmene, je-li znám, a kultivační podmínky),

— metoda přípravy zásobních roztoků a četnost obnovování (jsou-li použity, uvedou se rozpouštědlo nebo dispergátor a jejich koncentrace).

2.2.4. Výsledky:

— výsledky případných předběžných studií stálosti zkoušené látky,

— nominální zkušební koncentrace a výsledky všech analýz pro stanovení koncentrace zkoušené látky ve zkušebních nádobách (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 4); uvede se také výtěžek metody a mez stanovitelnosti,

— kvalita vody ve zkušebních nádobách (tj. pH, teplota, koncentrace rozpuštěného kyslíku a TOC a/nebo COD a dále podle potřeby tvrdost) (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 3),

— celkový počet živých potomků na každý rodičovský organismus (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 3),

— počet uhynulých rodičovských organismů a den, kdy k úhynu došlo (viz příklad formuláře pro přehled údajů v dodatku 3),

— variační koeficient reprodukční schopnosti kontrolních skupin (založený na celkovém počtu živých potomků na rodičovský organismus, který přežil do konce zkoušky),

— křivka závislosti celkového počtu živých potomků na rodičovský organismus, který přežil do konce zkoušky (pro každou paralelní nádobu), na koncentraci zkoušené látky,

— nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) na reprodukci včetně popisu použitých statistických metod a údaje o velikosti účinku, který mohl být detekován, a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC) na reprodukci; je-li k dispozici, uvede se LOEC/NOEC pro mortalitu rodičovských organismů,

▼B

- je-li k dispozici, ECx pro reprodukci a interval spolehlivosti, dále graf křivky modelu použitého pro její výpočet, směrnice křivky závislosti dávka-reakce a její směrodatná odchylka,
- jiné pozorované biologické účinky a jiná měření: uvedou se jakékoli jiné biologické účinky, které byly pozorovány nebo změřeny (např. růst rodičovských organismů) včetně přiměřeného zdůvodnění,
- zdůvodnění jakékoli odchylky od této zkušební metody.

3. **LITERATURA**

- 1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20–21 March 1993.
- 2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No.6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.
- 3) Baird D.J., Barber J., Bradley M.C., Soares A.M.V.M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21, 257–265.
- 4) Elendt B.P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 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, 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 str.
- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) str. 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, 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), 185–196.
- 11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. *Biologice Prace*, 36, 209.
- 12) Sims I.R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 2053–2058.

▼B

- 13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. *Arch. Hydrobiol.*, 128, 459–466.
- 14) Dunnett C.W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096–1121.
- 15) Dunnett C.W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482–491.
- 16) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, 103–117.
- 17) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, 510–531.
- 18) Draper N.R. and Smith H. (1981). *Applied Regression Analysis*, second edition, Wiley, 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, 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*. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, str. 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, 1156–1166.



DODATEK I

PŘÍPRAVA PŘESNĚ DEFINOVANÝCH ELENDTOVÝCH MÉDIÍ
M7 A M4

Aklimatizace na Elendtova media M4 a M7

Některé laboratoře narazily na obtíže při přímém přenosu dafnií do médií M4 (1) a M7. Určitého úspěchu však bylo dosaženo postupnou aklimatizací, tj. s přenesením z vlastního média do 30 % Elendtova média, poté do 60 % Elendtova média a nakonec do 100 % Elendtova média. Délky doby aklimatizace mohou být nepochybně jeden měsíc.

PŘÍPRAVA

Stopové prvky

Ve vodě vhodné čistoty, např. v deionizované nebo destilované vodě nebo ve vodě přečištěné reverzní osmosou, se nejprve připraví samostatné zásobní roztoky (I) jednotlivých stopových prvků. z těchto oddělených zásobních roztoků (I) se připraví jeden zásobní roztok (II) obsahující všechny stopové prvky (směsný roztok), tj.:

Zásobní roztoky I (jednotlivá látka)	Množství přidané do vody mg/l	Koncentrace (vzhledem k médiu M4) násobek	Kombinovaný zásobní roztok II se připraví přidáním následujícího množ- ství zásobního roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
H ₃ BO 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 · 6 H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	5 000	2 000	—	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1 991	2 000	—	—

Jak roztok Na₂EDTA, tak roztok FeSO₄ se připraví samostatně, spojí se a ihned se autoklávuji. Získají se:

2 litry roztoku Fe-EDTA		1 000	20,0	5,0
-------------------------	--	-------	------	-----

▼ B**Média M4 a M7**

Média M4 a M7 se připraví ze zásobního roztoku II, makroživin a vitaminů tímto způsobem:

	Množství přidané do vody mg/l	Koncentrace (vzhledem k médiu M4) násobek	Množství zásobního roztoku přidané za účelem přípravy média ml/l	
			M4	M7
Zásobní roztok II obsahující kombinaci stopových prvků		20	50	50

Zásobní roztok makroživin (jednotlivá látka)

CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombinovaný vitaminový zásobní roztok	—	10 000	0,1	0,1

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se připraví přidáním 3 vitaminů do 1 litru vody takto:

Thiaminhydrochlorid	750	10 000	—	—
Kyanokobalamin (B ₁₂)	10	10 000	—	—
Biotin	7,5	10 000	—	—

Kombinovaný vitaminový zásobní roztok se uskládá zmrazený v malých alikvotních dílech. Vitaminy se do média přidávají krátce před použitím.

Poznámky: Aby nedošlo při přípravě kompletního média k vysrážení solí, přidají se podíly zásobních roztoků do asi 500–800 ml deionizované vody a objem se poté doplní na 1 litr.

Poznámky: Poprvé byly informace o médiu M4 uvedeny v práci Elenđt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultra-structural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25–33.

▼B

DODATEK 2

ANALÝZA CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKU (TOC)
A VYTVOŘENÍ NOMOGRAMU PRO OBSAH TOC v KRMIVU NA
BÁZI ŘAS

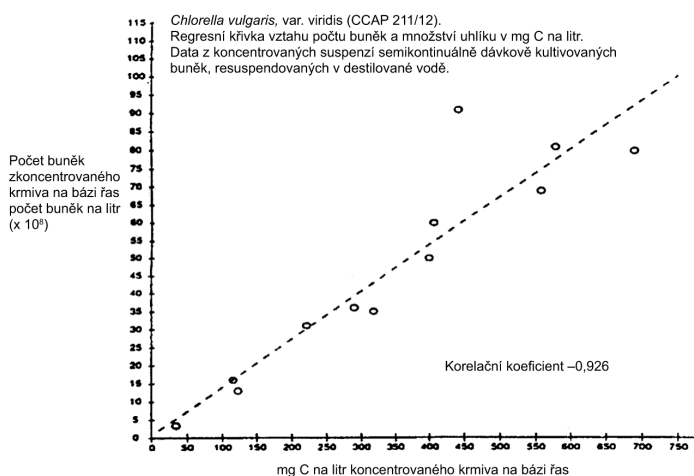
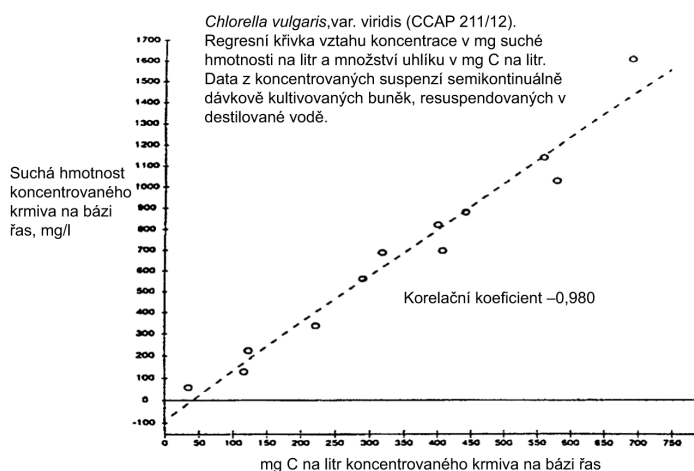
Je známo, že obsah uhlíku v krmivu na bázi řas se obvykle neměří přímo, ale stanoví se z korelací (tj. z nomogramů) se zástupnými ukazateli, jako jsou počet buněk řas nebo absorbance ve viditelném světle.

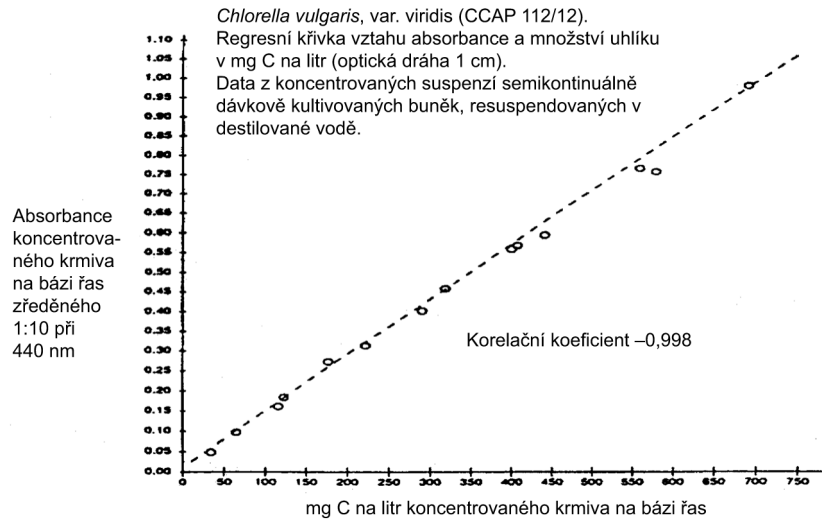
TOC by měl být stanoven spíše vysokoteplotní oxidací než pomocí UV nebo persíranovou metodou. (Viz: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB.)

Pro účely vytvoření nomogramu se řasy oddělí od růstového média centrifugací a poté se resuspendují v destilované vodě. Zástupný ukazatel a koncentrace TOC se měří v každém vzorku třikrát. Proveďte se analýza slepého pokusu s destilovanou vodou a jeho koncentrace TOC se odečte od koncentrace TOC ve vzorku s řasami.

Nomogram by měl být lineární v požadovaném rozsahu koncentrací uhlíku. Příklady jsou uvedeny níže.

Poznámka: Tyto příklady nelze pro účely přepočtu použít; je důležité, aby si laboratoře připravily vlastní nomogramy.



▼ B

DODATEK 3

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU ÚDAJŮ PRO ZAZNAMENÁNÍ OBNOVY MÉDIA, SLEDOVANÝCH FYZIKÁLNĚCHEMICKÝCH ÚDAJŮ, KRMENÍ, REPRODUKČNÍ SCHOPNOSTI DAFNÍ A MORTALITY DospělCŮ

Experiment č.:	Datum zahájení:			Klon:			Médium:					Typ krmiva:					Zkoušená látka					Nominální koncentrace:				
Den	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21				
Obnovení média (zaškrtněte)																										
pH (¹)																									nové	
																									staré	
O ₂ mg/l (¹)																									nové	
																									staré	
Teplota (°C) (¹)																									nové	
																									staré	
Podání krmiva (zaškrtněte)																										
Počet živých potomků (²)																										Celkem
Nádoba 1																										
2																										
3																										
4																										
5																										

▼**B**

Experiment č.:	Datum zahájení:			Klon:			Médium:			Typ krmiva:			Zkoušená látka			Nominální koncentrace:								
Den	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																								Celkem
Kumulativní mortalita dospělců ⁽³⁾																								

- (1) Uvede se, ve které nádobě bylo měření provedeno.
 (2) Do příslušné buňky se zaznamenají nevylihnuté plůdky jako „AB“ (*aborted broods*).
 (3) Do příslušné buňky se zaznamená mortalita dospělců jako „M“

▼B

DODATEK 4

PŘÍKLAD FORMULÁŘE PŘEHLEDU ÚDAJŮ PRO ZAZNAMENÁNÍ VÝSLEDKŮ CHEMICKÉ ANALÝZYa) **Naměřené koncentrace**

Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

b) **Naměřené koncentrace vyjádřené v procentech nominální koncentrace**

Nominální koncentrace	Vzorek z týdne 1		Vzorek z týdne 2		Vzorek z týdne 3	
	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium	Čerstvé médium	Staré médium

▼ **B**

DODATEK 5

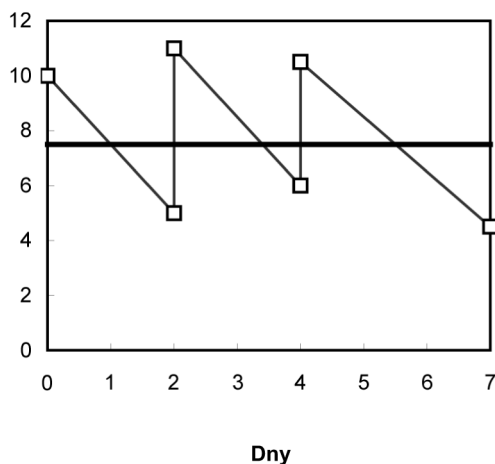
VÝPOČET ČASOVĚ VÁŽENÉ STŘEDNÍ HODNOTY

Časově vážená střední hodnota

Vzhledem k tomu, že mezi výměnami média může koncentrace zkoušené látky klesat, je nezbytné zvážit, jaká koncentrace bude považována za reprezentativní pro rozsah koncentrací, jimž byly dospělé dafnie vystaveny. Výběr by měl být založen na biologických i statistických úvahách. Vychází-li se například z toho, že reprodukce je ovlivňována hlavně maximální koncentrací, již byl organismus vystaven, měla by být použita maximální koncentrace. Považuje-li se však za významnější akumulované nebo dlouhodobé působení toxické látky, má větší opodstatnění průměrná koncentrace. v takovém případě je vhodným průměrem časově vážená střední koncentrace, neboť zohledňuje časové změny okamžité koncentrace.

Obrázek 1:

Příklad časově vážené střední hodnoty



Na obrázku 1 je znázorněn příklad (zjednodušené) zkoušky trvající sedm dní s obnovou média v den 0, 2 a 4.

Tenká klikatá čára znázorňuje koncentraci v kterémkoli okamžiku. Má se za to, že pokles koncentrace sleduje proces exponenciálního rozkladu buněk.

Šest vyznačených bodů představuje koncentrace naměřené na začátku a na konci období mezi obnoveními média.

Silná plná čára vyznačuje hodnotu časově vážené střední hodnoty.

Časově vážená střední hodnota je vypočtena tak, aby se plocha pod čarou pro časově váženou střední hodnotu rovnala ploše pod čarou průběhu koncentrace. Výpočet pro výše uvedený příklad je ilustrován v tabulce 1.



Tabulka 1

Výpočet časově vážené střední hodnoty

Obnovení média č.	Dny	Konc0	Konc1	Ln(Konc0)	Ln(Konc1)	Plocha
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Celkový počet dnů: 7					Celková plocha	50,091
					ČV střední hodnota	7,156

Dny se rozumí počet dnů mezi obnoveními média.

Konc0 je naměřená koncentrace na začátku období mezi obnoveními média.

Konc1 je naměřená koncentrace na konci období mezi obnoveními média.

Ln(Konc0) je přirozený logaritmus *Konc0*.

Ln(Konc1) je přirozený logaritmus *Konc1*.

Plocha je plocha pod exponenciální křivkou pro každé období mezi obnoveními média.

Vypočte se z rovnice:

$$Area = \frac{Konc_0 - Konc_1}{Ln(Konc_0) - Ln(Konc_1)} \times Days$$

Časově vážená střední hodnota (ČV *střední hodnota*) se vypočte jako podíl *celkové plochy* a *celkového počtu dnů*.

Pro zkoušku toxicity pro reprodukci na daňních se tabulka pochopitelně rozšíří tak, aby pokrývala 21 dnů.

Je zřejmé, že provádí-li se měření pouze na začátku a na konci období mezi obnoveními média, není možné potvrdit, že je proces rozkladu skutečně exponenciální. Jiná křivka by vedla k jinému způsobu výpočtu „plochy“. Exponenciální rozklad však není nepřijatelný a jemu odpovídající křivka je pravděpodobně nejideálnější, chybí-li jiné informace.

Je však nezbytné postupovat opatrně, není-li v médiu na konci období mezi jeho obnoveními zjištěno žádné množství zkoušené látky. Není-li možné odhadnout, jak rychle látka z roztoku zmizela, není možné získat realistickou plochu pod křivkou, a není tedy možné získat rozumnou časově váženou střední hodnotu.

▼B**C.21. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI DUSÍKU****1. METODA**

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 216 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování dlouhodobých účinků chemických látek po jednorázové expozici na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci dusíku. Tato zkouška je v zásadě založena na doporučení Evropské a středozemní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) (1). Bylo však přihlédnuto i k jiným doporučením, např. doporučením německého ústavu Biologische Bundesanstalt (2), agentury US Environmental Protection Agency (3), společnosti SETAC (4) a Mezinárodní organizace pro normalizaci (5). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoda na semináři OECD o výběru půd a sedimentů v Belgirate v Itálii v roce 1995 (6). Doporučení pro odběr, zpracování a skladování půdních vzorků vychází ze směrnice ISO (7) a z doporučení semináře v Belgirate. Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek bude zřejmě nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci dusíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci dusíku, tak zkouška na transformaci uhlíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC₅₀ pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé narušení těchto biochemických procesů může porušit koloběh živin a tak mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace dusíku v aerobních povrchových půdách. Tato metoda rovněž umožňuje odhadnout účinky látek na transformaci uhlíku půdní mikroflórou. K tvorbě dusičnanů dochází po rozpadu vazeb uhlík-dusík. Pokud je tedy u zkušebních a kontrolních půd zjištěna stejná rychlost tvorby dusičnanů, je vysoce pravděpodobné, že hlavní schéma odbourávání uhlíku je neporušené a funkční. Substrát zvolený pro zkoušku (prášková vojtěšková moučka) má příznivý poměr uhlíku a dusíku (obvykle od 12/1 do 16/1). Je tedy snížen nedostatek uhlíku v průběhu zkoušky, a dojde-li k poškození populace mikroorganismů chemickou látkou, může k jejich obnově dojít opět do 100 dnů.

▼ B

Zkouška, z níž vychází tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známá. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Použití zkoušky však není omezeno pouze na agrochemikálie. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení údajů lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se tedy stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci dusíku. Data z těchto zkoušek se použijí k sestavení křivky závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x , kde x je procentuální účinek.

1.2. DEFINICE

Transformace dusíku: konečný rozklad dusíkaté organické látky mikroorganismy cestou amonifikace a nitrifikace na příslušný konečný anorganický produkt – dusičnan.

EC_x (Účinná koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x -procentní inhibici transformace dusíku na dusičnan.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50 % inhibici transformace dusíku na dusičnan.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Nejsou uvedeny.

1.4. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Do proseté půdy se vpraví prášková rostlinná moučka a na půdu se poté aplikuje zkoušená látka, nebo se půda ponechá nedotčená (jako kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentraci na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy vyluhují vhodným rozpouštědlem a stanoví se obsah dusičnanů. Rychlost tvorby dusičnanů v exponovaných vzorcích se porovnává s rychlostí v kontrolních vzorcích a vypočte se procentuální odchylka hodnot experimentálních vzorků od kontrolních vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou 25 % nebo větší, v měření se pokračuje až do 100 dnů. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a množství vzniklých dusičnanů v experimentálních a kontrolních vzorcích se měří po 28denní inkubaci. Výsledky zkoušek s více koncentracemi se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

1.5. VALIDITA ZKOUŠKY

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi koncentracemi dusičnanů v kontrolní a exponovaných vzorcích, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

▼B

1.6. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.6.1. **Zkušební zařízení**

Při zkoušce se použijí nádoby z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, který bude odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace celého množství půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí hermeticky uzavíratelné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Použije se standardní laboratorní vybavení, které zahrnuje:

- třepačku: mechanickou třepačku nebo rovnocenné vybavení,
- odstředivku (3 000 g) nebo filtrační zařízení (za použití filtračního papíru bez dusičnanů),
- měřicí zařízení pro stanovení dusičnanů s vhodnou citlivostí a reprodukovatelností.

1.6.2. **Výběr a počet půd**

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

- obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %,
- pH: 5,5–7,5,
- obsah organického uhlíku: 0,5–1,5 %,
- stanoví se mikrobiální biomasa (8, 9) a její uhlík by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejhorší případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. V důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností však může být použití další půdy nezbytné, např. při zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo elektrostaticky nabitě půdy.

▼B**1.6.3. Odběr a skladování vzorků půd****1.6.3.1. Odběr**

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými obilovinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo podmáčení (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba, může maximální hloubka odběru nepatrně překračovat 20 cm (např. až 25 cm).

Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

1.6.3.2. Skladování

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, je možné ji skladovat v temnu při 4 ± 2 °C maximálně po dobu tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při -18 °C až -22 °C. Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

1.6.4. Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku**1.6.4.1. Předběžná inkubace**

Pokud byla půda skladována (viz oddíl 1.6.3.2), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

▼ B1.6.4.2. *Fyzikálně-chemické charakteristiky*

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysoušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

1.6.4.3. *Obohacení organickým substrátem*

Půda by měla být obohacena vhodným organickým substrátem, např. zelenou travní moučkou s vojtěškou (hlavní složka: *Medicago sativa*) s poměrem C/N od 12/1 do 16/1. Doporučená dávka vojtěškové moučky je 5 g vojtěšky na kilogram půdy (vztaženo na sušinu).

1.6.5. **Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu**

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1–0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikroflóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální rozptýlení zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaženo na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba pokud možno zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látka se např. nastříkne do půdy na více místech).

1.6.6. **Zkušební koncentrace**

Při zkoušení agrochemikálií se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které se v reálných podmínkách dostane do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sypanou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi maximální předpokládané koncentrace v životním prostředí (Predicted Environmental Concentration, PEC) a jejich pětinašobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinašobek maximální jednorázově aplikované dávky. U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. v rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovené hodnoty EC_x values.

▼ B

1.7. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.7.1. **Podmínky expozice**1.7.1.1. *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při mísení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

1.7.1.2. *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

1.7.1.3. *Podmínky zkoušky a její trvání*

Test probíhá v temnu při pokojové teplotě 20 ± 2 °C. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovnávají rychlosti tvorby dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství dusičnanů v exponovaných a kontrolních vzorcích a vypočítají se hodnoty EC_x .

▼ B**1.7.2. Odběry vzorků a analýzy půd****1.7.2.1. Intervaly odběru vzorků**

Při zkoušení agrochemikálií se obsah dusičnanů ve vzorcích analyzuje v 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah dusičnanů se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jeho konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nutné, lze provést další průběžné měření, např. v 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení hodnoty EC_x chemické látky. Podle potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít ve zprávě jako výchozí koncentraci dusičnanů v půdě.

1.7.2.2. Analýza vzorků půd

Pro každý čas odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví obsah dusičnanů. Dusičnany se extrahují ze vzorků třepáním s vhodným extrakčním roztokem, např. s 0,1 M roztokem chloridu draselného. Doporučuje se použít 5 ml roztoku KCl na gram sušiny půdy. Při optimální extrakci by měly být nádoby s půdou a extrakčním roztokem naplněny nejvýše z jedné poloviny. Směsi se extrahují třepáním při 150 ot./min. po dobu 60 minut. Směsi se odstředí nebo zfiltrují a kapalná fáze se analyzuje na dusičnany. Kapalný extrakt zbavený pevných částic lze před analýzou skladovat při 20 ± 5 °C) po dobu šesti měsíců.

2. ÚDAJE**2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství vytvořených dusičnanů v každém duplikátním vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Rychlost přeměny dusíku se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem při 5 % hladině významnosti). Množství vzniklých dusičnanů se vyjádří v mg dusičnanů na kg sušiny půdy za den. Rychlost tvorby dusičnanů se pro každou expozici porovná s rychlostí získanou pro kontrolní vzorky a vypočte se odchylka od kontrolních vzorků v procentech.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství dusičnanů v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Množství dusičnanů (tj. množství dusičnanů v mg na kg sušiny půdy) zjištěná v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. Z těchto údajů se pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se zanesou do grafu proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x. Standardními metodami (10, 11, 12) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti (p = 0,95) pro vypočtené hodnoty EC_x.

Zkoušené látky s vysokým obsahem dusičnanů mohou přispívat k množství dusičnanu vytvořeného při zkoušce. Pokud se zkouší vysoké koncentrace těchto látek (např. chemikálie, u nichž se očekává opakované použití), musí být součástí zkoušky vhodné kontrolní vzorky (tj. půda a zkoušená látka bez rostlinné moučky). Data z těchto kontrol musí být zohledněna při výpočtech EC_x.

▼ B

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při jakémkoli odběru po 28 dnech rozdíl rychlosti tvorby dusičnanů při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti tvorby v kontrolách roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci dusíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10} .

3. ZPRÁVY

Protokol o zkoušce musí obsahovat následující informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

- zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka),
- informace a historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.),
- způsob využití (např. zemědělská půda, les atd.),
- hloubka odběru vzorků (cm),
- obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny),
- pH (ve vodě),
- obsah organického uhlíku (v % sušiny),
- obsah dusíku (v % sušiny),
- výchozí koncentrace dusičnanů (mg dusičnanů na kg sušiny),
- kapacita výměny kationů (mmol/kg),
- mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku,
- odkaz na metody použité pro stanovení jednotlivých parametrů,
- všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd,
- podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,
- případně údaje o chemické identifikaci, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Substrát:

- zdroj substrátu,
- složení (tj. vojtěšková moučka, zelená travní moučka s vojtěškou),
- obsah uhlíku, dusíku (v % sušiny),
- velikost síta (mm).

▼ B

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem,
- počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací,
- podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky do půdy,
- inkubační teplota,
- vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu,
- použitá metoda inkubace půdy (tj. inkubace souhrnného vzorku, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy),
- počet duplikátních vzorků,
- doby odběrů vzorků,
- metoda použitá pro extrakci dusičnanů z půdy.

Výsledky:

- postup analýzy a zařízení použité pro stanovení dusičnanů,
- jednotlivé naměřené hodnoty obsahu dusičnanů a jejich průměrné hodnoty ve formě tabulky,
- rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd,
- podle potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,
- procentuální odchylka v rychlosti tvorby dusičnanů pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivosti a graf křivky závislosti odpovědi na dávce,
- statistické zpracování výsledků.
- všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

4. LITERATURA

- 1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).
- 3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- 4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- 5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality – Biological Methods*.

▼B

- 6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.
- 7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- 9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99–113.
- 11) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- 12) Finney, D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

▼B**C.22. PŮDNÍ MIKROORGANISMY: ZKOUŠKA NA TRANSFORMACI UHLÍKU****1. METODA**

Tato metoda je replikou metody OECD TG 217 (2000).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda popisuje laboratorní postup pro vyšetřování možných dlouhodobých účinků jednorázové expozice přípravkům na ochranu rostlin a popřípadě jiným chemickým látkám na aktivitu půdních mikroorganismů při transformaci uhlíku. Tato zkouška je v zásadě založena na doporučení Evropské a středozemní organizace ochrany rostlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) (1). Bylo však přihlédnuto k jiným doporučením, např. doporučením německého ústavu Biologische Bundesanstalt (2), agentury US Environmental Protection Agency (3) a společnosti SETAC (4). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoda na semináři OECD o výběru půd a sedimentů v Belgirate v Itálii v roce 1995 (5). Doporučení pro odběr, zpracování a skladování půdních vzorků je založeno na směrnici ISO (6) a na doporučeních ze semináře v Belgirate.

Při posuzování a hodnocení toxických vlastností zkoušených látek bude zřejmě nezbytné stanovit účinky na aktivitu půdních mikroorganismů, např. jsou-li požadovány údaje o vedlejších účincích přípravků na ochranu rostlin na půdní mikroflóru nebo očekává-li se expozice půdních mikroorganismů chemickým látkám jiným než přípravkům na ochranu rostlin. Cílem zkoušky na transformaci uhlíku je zjistit účinky takových chemických látek na půdní mikroflóru. Pokud se zkoušejí agrochemikálie (např. přípravky na ochranu rostlin, hnojiva, chemické přípravky pro lesnictví), provádí se jak zkouška na transformaci uhlíku, tak zkouška na transformaci dusíku. Pokud se zkoušejí jiné chemické látky než agrochemikálie, postačuje zkouška na transformaci dusíku. Nacházejí-li se však u těchto chemických látek hodnoty EC_{50} pro transformaci dusíku v rozpětí hodnot pro komerčně dostupné inhibitory nitrifikace (např. nitrapyrin), lze pro získání dalších informací provést zkoušku na transformaci uhlíku.

Půdy se skládají z živých a neživých složek, které se vyskytují ve formě složitých a heterogenních směsí. Mikroorganismy hrají důležitou roli v rozkladu a transformaci organických látek v úrodných půdách, přičemž různé druhy přispívají k různým aspektům úrodnosti půdy. Jakékoli dlouhodobé narušení těchto biochemických procesů může porušit koloběh živin a tak mít vliv na úrodnost půdy. K transformaci uhlíku a dusíku dochází u všech úrodných půd. Ačkoliv se populace mikroorganismů odpovědných za tyto procesy u jednotlivých půd liší, jedná se v podstatě o totéž schéma transformace.

▼ B

Popsaná zkušební metoda slouží ke zjištění dlouhodobých nepříznivých účinků látky na proces transformace uhlíku v aerobních povrchových půdách. Zkouška je citlivá na změny ve velikosti a aktivitě mikrobiální populace, která je odpovědná za transformaci uhlíku, neboť tyto populace budou vystaveny jak chemickému stresu, tak nedostatku uhlíku. Použijí se písčité půdy s nízkým obsahem organického materiálu. Tyto půdy se exponují zkoušené látce a inkubují za podmínek, které umožňují rychlý mikrobiální metabolismus. Za těchto podmínek se zdroje snadno dostupného uhlíku rychle vyčerpají. To způsobí nedostatek uhlíku, který vede nejen k odumření mikrobiálních buněk, ale také indukuje klidové stadium a/nebo tvorbu sporů. Pokud se zkouška provádí déle než 28 dnů, lze souhrn těchto reakcí měřit v kontrolních vzorcích (neexponovaná půda) jako postupnou ztrátu metabolicky aktivní mikrobiální biomasy (7). Pokud je biomasa v půdě s nedostatkem uhlíku za podmínek zkoušky ovlivněna přítomností chemické látky, pravděpodobně se nevrátí do téhož stavu jako kontrolní vzorek. Porušení stavu způsobené zkoušenou látkou kdykoliv během zkoušky tedy často přetrvává až do konce zkoušky.

Zkouška, z níž vychází tato zkušební metoda, byla zprvu vyvinuta pro látky, u nichž lze předvídat množství, které pronikne do půdy. Příkladem jsou přípravky na ochranu rostlin, u nichž je polní aplikační dávka známa. U agrochemikálií postačuje provést zkoušku se dvěma úrovněmi dávky, které odpovídají předpokládané nebo odhadované aplikační dávce. U agrochemikálií lze zkoušet účinné složky nebo přípravky v komerční úpravě. Zkouška však není omezena na chemické látky, jejichž koncentraci v životním prostředí lze předpovědět. Změnou množství zkoušené látky aplikované na půdu a způsobu vyhodnocení údajů lze zkoušku využít také pro chemické látky, u nichž není známo, v jakém množství proniknou do půdy. U jiných chemických látek než agrochemikálií se proto stanovuje účinek řady koncentrací na transformaci uhlíku. Údaje z těchto zkoušek se použijí k sestrojení křivky závislosti odezvy na dávce a k výpočtu hodnot EC_x , kde x je procentuální účinek.

1.2. DEFINICE

Transformace uhlíku: rozklad organického materiálu působením mikroorganismů, jehož výsledkem je konečný produkt – anorganický oxid uhličitý.

EC_x (Účinná koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k x % inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

EC_{50} (Medián účinné koncentrace): koncentrace zkoušené látky v půdě, která vede k 50 % inhibici transformace uhlíku na oxid uhličitý.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Žádné.

▼B1.4. **PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY**

Prosetá půda se buď exponuje zkušební látce, nebo se ponechá neexponovaná (kontrola). Při zkoušení agrochemikálií se doporučuje provést zkoušku s nejméně dvěma koncentracemi zvolenými tak, aby byly v určitém vztahu k nejvyšší předpokládané koncentraci na poli. Po 0, 7, 14 a 28 dnech inkubace se vzorky exponované a kontrolní půdy smísí s glukosou a po následujících 12 hodinách se měří respirační rychlost vyvolaná glukosou. Respirační rychlost se vyjádří jako uvolněný oxid uhličitý (v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu) nebo jako spotřebovaný kyslík (v mg kyslíku na kg půdy za hodinu). Průměrná respirační rychlost u exponovaných vzorků půd se porovná s rychlostí u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních vzorků. Všechny zkoušky musí probíhat alespoň 28 dnů. Jsou-li 28. den rozdíly mezi experimentální a kontrolní půdou rovné 25 % nebo větší, v měření se pokračuje ve 14denních intervalech nejdéle do 100 dnů. Při zkoušení jiných chemických látek než agrochemikálií se do vzorků půdy přidá řada koncentrací zkoušené látky a respirační rychlost vyvolaná glukosou (tj. průměrné množství uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku) se změří po 28 dnech. Výsledky zkoušek s řadou koncentrací se analyzují za použití regresního modelu a vypočtou se hodnoty EC_x (tj. EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10}). Viz definice.

1.5. **VALIDITA ZKOUŠKY**

Vyhodnocení výsledků zkoušek u agrochemikálií se provádí s relativně malými rozdíly (tj. průměrná hodnota ± 25 %) mezi uvolněným oxidem uhličitým nebo spotřebovaným kyslíkem u kontrolních a exponovaných vzorků, takže velké kolísání u kontrolních vzorků může vést k nesprávným výsledkům. Rozdíly mezi jednotlivými kontrolními vzorky by proto měly být menší než ± 15 %.

1.6. **POPIS METODY**1.6.1. **Zkušební zařízení**

Při zkoušce se použijí nádoby z chemicky inertního materiálu. Měly by mít vhodný objem, který bude odpovídat postupu použitému pro inkubaci půdy, tzn. buď inkubace celého množství půdy, nebo inkubace jednotlivých vzorků půdy (viz oddíl 1.7.1.2). Je třeba, aby během zkoušky došlo k co nejmenším ztrátám vody a aby byla umožněna výměna plynů (např. tím, že se nádoby zakryjí perforovanou polyethylenovou fólií). Při zkoušení těkavých látek se použijí hermeticky uzavíratelné nádoby. Měly by být tak velké, aby přibližně jedna čtvrtina jejich objemu byla zaplněna vzorkem půdy.

Pro stanovení respirace vyvolané glukosou jsou nezbytné inkubační systémy a přístroje pro měření uvolňovaného oxidu uhličitého nebo spotřeby kyslíku. Příklady takových systémů lze nalézt v literatuře (8, 9, 10, 11).

1.6.2. **Výběr a počet půd**

Použije se jedna půda. Půda by měla mít tyto charakteristiky:

— obsah písku: nejméně 50 % a nejvýše 75 %,

▼B

— pH: 5,5–7,5,

— obsah organického uhlíku: 0,5–1,5 %,

— stanoví se mikrobiální biomasa (12, 13) a její obsah uhlíku by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě.

Ve většině případů představuje půda s těmito charakteristikami nejhorší případ, neboť adsorpce zkoušené chemické látky je minimální a její dostupnost pro mikroorganismy je maximální. v důsledku toho je zpravidla zkoušení s dalšími půdami zbytečné. Za určitých okolností však může být použití další půdy nezbytné, např. při zamýšleném hlavním použití zkoušené látky na určité druhy půd, jako jsou kyselé lesní půdy nebo elektrostaticky nabitě půdy.

1.6.3. Odběr a skladování vzorků půd

1.6.3.1. Odběr

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Mezi těmito informacemi musí být přesná poloha, vegetace, údaje o ošetřování přípravky na ochranu rostlin, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo náhodná kontaminace. Pro odběr půdy by mělo být zvoleno místo, které umožňuje dlouhodobé používání. Vhodnými místy jsou trvalé pastviny, pole s jednoletými obilovinami (kromě kukuřice) nebo hustě oseté plochy zeleného hnojení. Místa vybraná pro odběr vzorků by neměla být minimálně jeden rok před odběrem ošetřována přípravky na ochranu rostlin. Rovněž by neměla být alespoň šest měsíců použita organická hnojiva. Použití minerálních hnojiv je přípustné pouze tehdy, je-li to nezbytné pro plodiny, a vzorky půdy by neměly být odebírány dříve než po třech měsících po aplikaci. Neměly by být používány půdy s hnojivy, o nichž je známo, že mají biocidní účinky (např. kyanamid vápenatý).

Vzorky by neměly být odebírány při dlouhých obdobích sucha nebo podmáčení (delších než 30 dnů) nebo po nich. Vzorky orných půd se odebírají z hloubky 0 až 20 cm. U luk (pastvin) nebo jiných půd, u nichž po delší dobu (alespoň po jedno vegetační období) nebyla prováděna orba, může maximální hloubka odběru nepatrně překračovat 20 cm (např. až 25 cm). Vzorky půd by měly být přepravovány v takových nádobách a za takové teploty, aby bylo zaručeno, že se původní vlastnosti půdy významně nezmění.

1.6.3.2. Skladování

Upřednostňuje se použití čerstvě odebrané půdy. Pokud je skladování půdy v laboratoři nevyhnutelné, je možné ji skladovat v temnu při 4 ± 2 °C maximálně po dobu tří měsíců. Během skladování půd musí být zajištěny aerobní podmínky. Pokud jsou půdy odebírány z oblastí, v nichž jsou po dobu alespoň tří měsíců v roce zmrzlé, lze zvážit šestiměsíční skladování při –18 °C. Před každým experimentem se stanoví mikrobiální biomasa skladovaných půd a uhlík pocházející z biomasy by měl tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku v půdě (viz oddíl 1.6.2).

▼B**1.6.4. Zacházení s půdou a její příprava pro zkoušku****1.6.4.1. Předběžná inkubace**

Pokud byla půda skladována (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3), doporučuje se provést předběžnou inkubaci v délce 2 až 28 dnů. Teplota a vlhkost půdy během předběžné inkubace by měly být podobné podmínkám při zkoušce (viz oddíly 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

1.6.4.2. Fyzikálně-chemické charakteristiky

Z půdy se ručně odstraní velké kusy (např. kameny, části rostlin atd.) a poté se za vlhka, aniž je půda nadměrně vysoušena, prosejí částice o velikosti 2 mm a menší. Vlhkost vzorku půdy se upraví destilovanou nebo deionizovanou vodou na hodnotu 40 % až 60 % maximální vodní kapacity.

1.6.5. Příprava zkoušené látky pro aplikaci na půdu

Zkoušená látka se obvykle aplikuje pomocí nosiče. Nosičem může být voda (u látek rozpustných ve vodě) nebo inertní tuhá látka, např. jemný křemičitý písek (velikost zrna: 0,1–0,5 mm). Jiné kapalné nosiče než voda (např. organická rozpouštědla jako aceton, chloroform) by neměly být používány, neboť mohou zničit mikroflóru. Použije-li se jako nosič písek, může být obalen zkoušenou látkou rozpuštěnou nebo rozptýlenou ve vhodném rozpouštědle. V takovém případě se rozpouštědlo před smísením s půdou odstraní odpařením. Pro optimální rozptýlení zkoušené látky v půdě se doporučuje použít 10 g písku na kilogram půdy (vztaženo na sušinu). Do kontrolních vzorků se aplikuje pouze odpovídající množství vody a/nebo písku.

Při zkoušení těkavých chemických látek je třeba zabránit ztrátám při aplikaci a pokusit se o homogenní rozptýlení látky v půdě (látka se např. nastříkne do půdy na více místech).

1.6.6. Zkušební koncentrace

Při zkoušení přípravků na ochranu rostlin nebo jiných chemických látek, u nichž lze předpovědět koncentraci v životním prostředí, se použijí alespoň dvě koncentrace. Nižší koncentrace by měla odpovídat přinejmenším maximálnímu očekávanému množství látky, které se v reálných podmínkách dostane do půdy, zatímco vyšší koncentrace by měla být násobkem nižší koncentrace. Výpočet koncentrace zkoušené látky přidávané do půdy se provede za předpokladu rovnoměrného zapravení do hloubky 5 cm a pro sypnou hustotu půdy 1,5. U agrochemikálií, které se aplikují přímo do půdy, nebo u chemikálií, u nichž lze množství, které se dostane do půdy, předpovědět, jsou doporučenými zkušebními koncentracemi maximální předpokládané koncentrace v životním prostředí (Predictable Environmental Concentration, PEC) a jejich pětinásobky. U látek, které se zpravidla aplikují do půdy několikrát za sezónu, se zkušební koncentrace odvodí ze součinu PEC a očekávaného maximálního počtu aplikací. Horní koncentrace by však neměla překročit desetinásobek maximální jednorázově aplikované dávky.

U jiných látek než agrochemikálií se použije geometrická řada nejméně pěti koncentrací. v rozpětí těchto zkušebních koncentrací by se měly nacházet stanovené hodnoty EC_x.

▼B

1.7. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.7.1. Podmínky expozice

1.7.1.1. *Expozice a kontrola*

Při zkoušení agrochemikálií se půda rozdělí na tři díly o stejné hmotnosti. Dva díly se smísí s nosičem obsahujícím látku a třetí díl se smísí pouze s nosičem (kontrola). Doporučuje se, aby byla zkouška provedena s minimálně třemi duplikátními vzorky exponovaných i neexponovaných půd. Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se půda rozdělí na šest dílů o stejné hmotnosti. Pět vzorků se smísí s nosičem obsahujícím zkoušenou látku a šestý vzorek se smísí pouze s nosičem bez chemické látky. Doporučuje se použít tři duplikátní vzorky exponované i neexponované půdy. Je třeba věnovat pozornost homogennímu rozptýlení zkoušené látky v exponovaných vzorcích půdy. Při mísení by nemělo docházet k hutnění nebo shlukování půdy.

1.7.1.2. *Inkubace vzorků půd*

Inkubaci vzorků půd lze provést dvěma způsoby: se souhrnným vzorkem exponované půdy a souhrnným vzorkem neexponované půdy, nebo se sériemi jednotlivých stejně velkých dílčích vzorků jak exponované, tak neexponované půdy. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků. Pokud se inkubují souhrnné vzorky, připraví se velká množství exponované a neexponované půdy a během zkoušky se podle potřeby odebírají dílčí vzorky k analýze. Výchozí množství připravené pro exponované vzorky a kontrolní vzorky závisí na velikosti dílčích vzorků, počtu duplikátních vzorků použitých pro analýzu a na předpokládaném počtu intervalů, v nichž se odeberou vzorky. Půdy inkubované jako souhrnný vzorek se před odběrem dílčích vzorků důkladně promísí. Pokud se inkubují série jednotlivých vzorků půd, rozdělí se souhrnný vzorek exponované půdy a souhrnný vzorek neexponované půdy na požadovaný počet dílčích vzorků a ty se použijí podle potřeby. U experimentů, kdy lze předpokládat více než dva intervaly odběru, by měl být připraven dostatečný počet dílčích vzorků s ohledem na všechny duplikátní vzorky a všechny intervaly odběru. Alespoň tři duplikátní vzorky zkušební půdy měly být inkubovány za aerobních podmínek (viz oddíl 1.7.1.1). U všech zkoušek by měly být použity vhodné nádoby s dostatečným prostorem pod víkem, aby nenastaly anaerobní podmínky. U těkavých látek se však zkouška provádí pouze se sériemi jednotlivých dílčích vzorků.

1.7.1.3. *Podmínky zkoušky a její trvání*

Test probíhá v temnu při pokojové teplotě 20 ± 2 °C. Vlhkost vzorku půdy se udržuje po dobu zkoušky v rozmezí 40 % až 60 % (± 5 %) maximální vodní kapacity půdy (viz oddíl 1.6.4.2). Podle potřeby se přidává destilovaná nebo deionizovaná voda.

Zkoušky trvají nejméně 28 dnů. Při zkouškách agrochemikálií se porovná množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku v exponovaných a kontrolních vzorcích. Pokud se 28. dne tyto rychlosti liší o více než 25 %, pokračuje se ve zkoušce do doby, než rozdíl klesne na 25 % a méně, nebo do 100 dnů, podle toho, co nastane dříve. U jiných látek než agrochemikálií se zkouška ukončí po 28 dnech. 28. den se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u exponovaných a kontrolních vzorků a vypočítají se hodnoty EC_x .

▼ B**1.7.2. Odběry vzorků a analýzy půd****1.7.2.1. Intervaly odběru vzorků**

Při zkoušení agrochemikálií se rychlost respirace vyvolané glukosou ve vzorcích analyzuje 0., 7., 14. a 28. den. Pokud se zkouška prodlužuje, provede se další měření ve 14denních intervalech po 28. dni.

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se použije alespoň pět zkušebních koncentrací a obsah respirace vyvolané glukosou se ve vzorcích půd analyzuje na začátku expoziční doby (den 0) a na jejím konci (po 28 dnech). Je-li to považováno za nutné, lze provést další průběžné měření, např. 7. den. Data získaná 28. den se použijí pro stanovení hodnoty EC_x chemické látky, v případě potřeby lze data ze dne 0 u kontrolních vzorků použít k odhadu výchozího množství metabolicky aktivní mikrobiální biomasy v půdě.

1.7.2.2. Měření rychlosti respirace vyvolané glukosou

Pro každý okamžik odběru vzorků se v exponovaných i kontrolních vzorcích stanoví rychlost respirace vyvolané glukosou. Vzorky půd se smísí s dostatečným množstvím glukosy, aby se ihned vyvolala maximální respirační odezva. Množství glukosy potřebné pro vyvolání maximální respirační odezvy u dané půdy lze stanovit v orientační zkoušce se sérií koncentrací glukosy (14). U písčitých půd s obsahem organického uhlíku od 0,5 do 1,5 % obvykle stačí 2 000 mg až 4 000 mg glukosy na kg sušiny. Glukosu lze rozmělnit na prášek s čistým křemenným pískem (10 g písku na kg sušiny) a homogenně smísit s půdou.

Vzorky půdy obohacené glukosou se inkubují ve vhodné aparatuře, která umožňuje měřit respirační rychlosti při 20 ± 2 °C kontinuálně, každou hodinu, nebo každé dvě hodiny (viz oddíl 1.6.1). Měření uvolněného oxidu uhličitého nebo spotřebovaného kyslíku se provádí nepřetržitě po dobu 12 hodin a měření se zahájí co nejdříve, tj. do 1 až 2 hodin po přidání glukosy. Změří se celkové množství uvolněného oxidu uhličitého nebo celkové množství spotřebovaného kyslíku za 12 hodin a stanoví se průměrná respirační rychlost.

2. ÚDAJE**2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Při zkoušení agrochemikálií se zaznamená množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku u každého duplikátního vzorku a průměrné hodnoty se zaznamenají do tabulky. Výsledky se vyhodnotí vhodnými všeobecně uznávanými statistickými metodami (např. F-testem při 5 % hladině významnosti). Rychlostí respirace vyvolané glukosou se vyjádří v mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo v mg kyslíku na kg sušiny za hodinu. Průměrná rychlost uvolňování oxidu uhličitého nebo průměrná rychlost spotřeby kyslíku u každé expozice se porovná s odpovídajícími hodnotami u kontrolních vzorků a vypočte se procentuální odchylka exponovaných vzorků od kontrolních vzorků.

▼B

Při zkoušení jiných látek než agrochemikálií se stanoví množství uvolněného oxidu uhličitého nebo množství spotřebovaného kyslíku v každém duplikátním vzorku a pro účely odhadu hodnot EC_x se sestrojí křivka závislosti odezvy na dávce. Rychlosti respirace vyvolané glukosou (tj. mg oxidu uhličitého na kg sušiny za hodinu nebo mg kyslíku na kg sušiny za hodinu) zjištěné v exponovaných vzorcích po 28 dnech se porovnají s hodnotami zjištěnými u kontrolních vzorků. z těchto údajů se pro každou zkušební koncentraci vypočte velikost inhibice v procentech. Tyto hodnoty v procentech se zanesou do grafu proti koncentraci a poté se statistickými metodami vypočítají hodnoty EC_x . Standardními metodami (15, 16, 17) se rovněž vypočítají intervaly spolehlivosti ($p = 0,95$) pro vypočtené hodnoty EC_x .

2.2. INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Pokud je při hodnocení výsledků zkoušek s agrochemikáliemi při kterémkoli odběru po 28 dnech rozdíl respiračních rychlostí při nižší expozici (tj. při maximální očekávané koncentraci) a rychlosti u kontroly roven 25 % nebo nižší, lze konstatovat, že zkoušená látka nemá dlouhodobý vliv na transformaci uhlíku v půdách. Pro hodnocení výsledků zkoušek jiných látek než agrochemikálií se použijí hodnoty EC_{50} , EC_{25} a/nebo EC_{10} .

3. ZPRÁVY

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto informace:

Úplnou identifikaci použité půdy zahrnující tyto údaje:

- zeměpisná poloha místa (zeměpisná šířka a délka),
- informace a historii místa (tj. vegetační kryt, ošetření přípravky na ochranu rostlin, použití hnojiv, náhodná kontaminace atd.),
- využití půdy (např. zemědělská půda, les atd.),
- hloubka odběru vzorků (cm),
- obsah písku/prachu/jílu (v % sušiny),
- pH (ve vodě),
- obsah organického uhlíku (v % sušiny),
- obsah dusíku (v % sušiny),
- kapacita výměny kationů (mmol/kg),
- výchozí mikrobiální biomasa v procentech celkového organického uhlíku,
- odkaz na metody použité pro stanovení jednotlivých parametrů,
- všechny informace týkající se odběru a skladování vzorků půd,
- podrobné údaje o případné předběžné inkubaci půdy.

▼ B

Zkoušená látka:

- fyzikální povaha a popřípadě fyzikálně-chemické vlastnosti,
- případně údaje o chemické identifikaci, včetně strukturního vzorce, čistoty (tj. procentuální obsah účinné složky u přípravků na ochranu rostlin), obsahu dusíku.

Zkušební podmínky:

- podrobné údaje o obohacení půdy organickým substrátem,
- počet použitých koncentrací zkoušené látky, popřípadě zdůvodnění volby koncentrací,
- podrobné údaje o aplikaci zkoušené látky do půdy,
- inkubační teplota,
- vlhkost půdy na začátku zkoušky a v jejím průběhu,
- použitá metoda inkubace půdy (tj. inkubace souhrnného vzorku, nebo inkubace jednotlivých dílčích vzorků půdy),
- počet duplikátních vzorků,
- doby odběru vzorků.

Výsledky:

- metoda a zařízení použité pro měření respiračních rychlostí,
- údaje včetně jednotlivých hodnot a průměrných hodnot množství oxidu uhličitého nebo kyslíku zpracované/ve formě tabulky,
- rozdíly mezi duplikátními vzorky u exponovaných a kontrolních vzorků půd,
- v případě potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,
- procentuální odchylka v rychlostech respirace vyvolané glukosou pro každou dobu odběru vzorků, popřípadě hodnota EC_{50} s 95 % intervalem spolehlivosti, jiné hodnoty EC_x (tj. EC_{25} nebo EC_{10}) s intervaly spolehlivosti a graf křivky závislosti odpovědi na dávce,
- v případě potřeby vysvětlení oprav provedených při výpočtech,
- všechny informace a pozorování užitečné pro interpretaci výsledků.

4. LITERATURA

- 1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.
- 2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).
- 3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼ B

- 4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- 5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.
- 6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora“. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45–60.
- 8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties“. Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831–871.
- 9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- 10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- 11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A., and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77–81.
- 12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- 13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38: 113–120.
- 15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99–113.
- 16) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- 17) Finney D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

▼B**C.23. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V PŮDĚ****1. METODA**

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 307 (2002).

1.1. ÚVOD

Tato zkušební metoda je založena na existujících směrnících (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Postup popsáný v této zkušební metodě je vyvinut pro účely hodnocení aerobní a anaerobní transformace chemické látky v půdě. Účelem experimentů je stanovit i) rychlost transformace zkoušené látky a ii) povahu a rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů, kterým mohou být rostliny a půdní organismy vystaveny. Tyto studie jsou požadovány u chemických látek, které se aplikují přímo do půdy nebo pravděpodobně mohou proniknout do půdního ekosystému. Výsledky těchto laboratorních studií mohou být také použity pro vypracování postupů odběru vzorků a analýzy u podobných polních studií.

Pro vyhodnocení způsobu transformace obvykle postačují aerobní a anaerobní studie s jedním druhem půdy (8, 10, 11). Rychlosti transformace se stanoví alespoň pro tři další půdy (8, 10).

O počtu a druzích půd, které mají být použity v této zkoušce, došlo k dohodě na semináři OECD Workshop on soil/sediment Selection v Belgirate v Itálii v roce 1995. Druhy zkušebních půd by měly být reprezentativní pro environmentální podmínky, v nichž dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Například chemické látky, k jejichž uvolnění může dojít v subtropickém až tropickém klimatu, by měly být zkoušeny s ferrasoly nebo nitosoly (systém FAO). Na tomto semináři byla také vydána doporučení týkající se odběru, zpracování a skladování vzorků půd založená na směrnících ISO (15). Tato metoda se rovněž týká půd rýžových polí.

1.2. DEFINICE

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO₂ a látek, které jsou přítomny ve vázaných reziduiích.

Vázaná rezidua: sloučeniny v půdě, rostlině nebo v živočichu, které po extrakci zůstávají v matici ve formě výchozí látky nebo jejího metabolitu (jejích metabolitů) nebo transformačních produktů. Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vyjasnit extrakcí spojenou se změnami v matici a náročnými analytickými technikami. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduií obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (12) (upraveno podle IUPAC 1984 (13)).

Aerobní transformace: reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (14).

▼B

Anaerobní transformace: reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (14).

Půda: směs minerálních a organických chemických složek oživená malými organismy (většinou mikroorganismy), přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Lze pracovat s dvěma formami půdy:

- a) s neporušenou půdou, jak v průběhu času vznikla, s charakteristickými vrstvami různých druhů půdy;
- b) s porušenou půdou, která se obvykle vyskytuje na obdělávaných polích v případě, že se vzorky odebírají vyrváním a používají se v této zkušební metodě (14).

Mineralizace: úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2 , H_2O za aerobních podmínek a na CH_4 , CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V souvislosti s touto metodou, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se radioisotopy uhlíku oxidují za tvorby odpovídajícího množství $^{14}\text{CO}_2$ (14).

Poločas: $t_{0,5}$, je čas, za který dojde k 50 % transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT₅₀ (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %; liší se od poločasu $t_{0,5}$, pokud transformace neprobíhá podle kinetiky prvního řádu.

DT₇₅ (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT₉₀ (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %;

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky se použijí pro charakterizaci a/nebo identifikaci transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

1.4. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato je metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro něž je k dispozici analytická metoda s dostatečnou správností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné i nerozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z půdy silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy v půdě udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

▼B

1.5. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak značené látky. Značený materiál je nezbytný pro studium způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C , avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část/části molekuly ⁽¹⁾. Čistota zkoušené látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky na aerobní a anaerobní transformaci v půdě by měly být k dispozici alespoň tyto informace o látce:

- a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6);
- b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;
- c) tlak par (metoda A.4) a/nebo Henryho konstanta;
- d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);
- e) chemická stabilita v temnu (hydrolyza) (metoda C.7);
- f) pK_a pokud u molekuly nastává protonace nebo deprotonace (směrnice OECD 112) (16).

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy (zkušební metody C.21 a C.22) (16).

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejích transformačních produktů.

1.6. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

Vzorky půdy se exponují zkušební látce a inkubují se v temnu v biometrických baňkách nebo v průtokových systémech za řízených laboratorních podmínek (při konstantní teplotě a vlhkosti půdy). Ve vhodných intervalech se vzorky půd extrahují a analyzuje se obsah výchozí látky a transformačních produktů. Vhodným absorpčním zařízením se k analýze shromáždí také těkavé produkty. Prostřednictvím materiálu značeného isotopem ^{14}C lze po zachycení uvolněného $^{14}\text{CO}_2$ měřit různé rychlosti mineralizace zkoušené látky a dále lze stanovit látkovou bilanci včetně tvorby vázaných reziduí v půdě.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. Výtěžnost

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků půdy ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí, měly by se nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (8) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek (3).

⁽¹⁾ Pokud například zkoušená látka obsahuje jeden kruh, je třeba, aby byl tento kruh označen. Pokud zkoušená látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie s cílem podchytit zbytky každého z kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů.

▼ B**1.7.2. Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantifikaci zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit provedením analýzy duplikátních vzorků týchž extraktů půdy, která byla dostatečně dlouho inkubována, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou látku a transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg půdy (pro zkoušenou látku) nebo 1 % aplikované dávky, podle toho, která z hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantifikace (LOQ).

1.7.3. Správnost dat o transformaci/transformačních dat

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o spolehlivosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50} , popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90} .

1.8. POPIS ZKUŠEBNÍ METODY**1.8.1. Vybavení a chemická činidla**

Inkubačními systémy jsou statické uzavřené systémy nebo vhodné průtokové systémy (7, 17). Příklady vhodných průtokových inkubačních aparatur a biometrických baněk jsou uvedeny na obrázcích 1 a 2. Oba typy inkubačních systémů mají své výhody a svá omezení (7, 17).

Pro zkoušku je nezbytné standardní laboratorní vybavení, zejména:

- analytické přístroje jako zařízení pro GC, HPLC, TLC, včetně odpovídajících detekčních systémů pro analýzu značených a neznačených látek pro inverzní isotopovou zředovací metodu,
- přístroje pro účely identifikace (např. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atd.),
- kapalinový scintilační spektrometr,
- oksyličovací zařízení pro spalování radioaktivního materiálu,
- odstředivka,
- extrakční aparatura (např. centrifugační zkumavky pro studenou extrakci a Soxhletův přístroj pro kontinuální extrakci s refluxem),
- zařízení pro zkoncentrování roztoků a extraktů (např. rotační odparka),
- vodní lázeň,
- mechanické míchací zařízení (např. hnětací zařízení, rotační mixér).

▼ B

Použijí se např. tato chemická činidla:

- NaOH p.a, 2 mol/l, nebo jiná vhodná zásada (např. KOH, ethanolamin),
- H₂SO₄, p.a., 0,05 mol · dm³,
- ethylenglykol p.a.,
- tuhý absorpční materiál, např. natronové vápno, a polyurethanové zátky,
- organická rozpouštědla čistoty p.a., např. aceton, methanol atd.,
- kapalný scintilátor.

1.8.2. Aplikace zkoušené látky

Za účelem aplikace zkoušené látky do půdy a jejího rozptýlení lze zkoušenou látku rozpustit ve vodě (v deionizované nebo destilované vodě) nebo lze v případě potřeby použít co nejmenší množství acetonu nebo jiných organických rozpouštědel (6), ve kterých je zkoušená látka dostatečně rozpustná a stabilní. Zvolené množství rozpouštědla však nesmí mít významný vliv na mikrobiální aktivitu půdy (viz oddíly 1.5 a 1.9.2 až 1.9.3). Rozpouštědla, která působí jako inhibitory mikrobiální aktivity, např. chloroform, dichloromethan a jiná halogenovaná rozpouštědla, nesmějí být použita.

Látku lze do půdy přidat také např. ve směsi s křemenným pískem (6) nebo ve formě malých dílčích vzorků zkušební půdy, které byly předem vysušeny na vzduchu a sterilizovány. Pokud se látka přidává pomocí rozpouštědla, mělo by být rozpouštědlo odpařeno ještě před tím, než jsou k původním nesterilním vzorkům půdy přidány obohacené dílčí vzorky.

U běžně používaných chemických látek, jež se dostávají do půdy prostřednictvím zemědělské aplikace čistírenských kalů, se zkoušená látka nejprve přidá do kalu, který se poté vpraví do vzorku půdy (viz oddíly 1.9.2 a 1.9.3).

Nedoporučuje se rutinně používat přípravky v komerční úpravě. Například u špatně rozpustných látek však může být použití přípravku v komerční úpravě vhodnou alternativou.

1.8.3. Půdy

1.8.3.1. Výběr půd

Pro stanovení způsobu transformace lze použít reprezentativní půdy; doporučují se písčitohlinitá, prachovitohlinitá, hlinitá nebo hlinitopísčítá půda (podle klasifikace FAO a USDA (18)) o hodnotě pH 5,5 až 8,0 a obsahu organického uhlíku 0,5–2,5 %, přičemž mikrobiální biomasa by měla tvořit nejméně 1 % celkového organického uhlíku (10).

Pro studie transformačních rychlostí se použijí alespoň tři další půdy reprezentující rozsah relevantních půd. Půdy by se měly lišit, pokud jde o obsah organického uhlíku, pH, obsah jílu a mikrobiální biomasy (10).

▼ B

Všechny půdy by měly být charakterizovány alespoň: strukturou (% písku, % prachu, % jílu) (podle klasifikace FAO a USDA (18)), pH, kationtovou výměnnou kapacitou, organickým uhlíkem, sypnou hustotou, schopností zadržet vodu ⁽¹⁾ a mikrobiální biomasou (pouze pro aerobní studie). Pro interpretaci výsledků mohou být užitečné další informace o vlastnostech půdy. Pro stanovení vlastností půdy lze použít metody doporučené v literatuře (19, 20, 21, 22, 23). Mikrobiální biomasa se stanoví metodou respirace indukované substrátem (SIR) (25, 26) nebo alternativními metodami (20).

1.8.3.2. *Odběr, příprava a skladování půd*

K dispozici by měly být podrobné informace o historii místa, ze kterého je půda odebírána. Těmito informacemi jsou přesná poloha, vegetační kryt, údaje o ošetřování chemickými látkami, použití organických a minerálních hnojiv, přídavky biologického materiálu nebo jiná kontaminace. Pokud byla půda v předchozích čtyřech letech ošetřena zkoušenou látkou nebo látkami s analogickou strukturou, neměla by být použita pro transformační studie (10, 15).

Půda by měla být čerstvě odebrána z terénu (z A horizontu nebo z horní dvacetimetřové vrstvy) a měla by být tak vlhká, aby bylo možné snadné prosévání. Kromě půd z rýžových polí by půdy neměly být odebírány v průběhu dlouhých období (více než 30 dnů) sucha, mrazů nebo zavodnění nebo krátce po těchto obdobích (14). Vzorky se přepravují způsobem, který minimalizuje změny obsahu vody v půdě, a uchovávají se v temnu za co největšího přístupu vzduchu. Pro tento účel je obecně vhodný volně uzavřený polyethylenový sáček.

Půda se zpracuje co nejdříve po odběru. Před proséváním na sítu o velikosti 2 mm se z půdy odstraní vegetace, větší živočichové a kameny, při prosévání se půda zbaví malých kamenů, drobných živočichů a zbytků rostlin. Před proséváním by nemělo dojít k nadměrnému vysušení a rozdrčení půdy (15).

Pokud je v zimě obtížné odebrat vzorky v terénu (zmrzlá půda, sněhová pokrývka), mohou být odebrány z půdy skladované ve skleníku pod vegetačním pokryvem (např. zatravněné půdy nebo půdy s travní směsí s jetelem). V každém případě se upřednostňují studie s čerstvě odebranými půdami; pokud má být odebrána a zpracovaná půda před zahájením studie skladována, musí být skladována za odpovídajících podmínek a pouze po omezenou dobu (při 4 ± 2 °C po dobu maximálně tří měsíců), aby byla zachována mikrobiální aktivita ⁽²⁾. Podrobné pokyny pro odběr, zpracování a skladování půd pro biotransformační experimenty lze nalézt v literatuře (8, 10, 15, 26, 27).

⁽¹⁾ Schopnost půdy zadržet vodu lze měřit jako polní kapacitu, jako retenční vodní kapacitu nebo jako vodní sací tlak (pF). Vysvětlení je uvedeno v dodatku 1. V protokolu o zkoušce by mělo být uvedeno, zda byly schopnost půdy zadržet vodu a sypná hustota stanoveny u neporušených polních vzorků, nebo porušených (zpracovaných) vzorků.

⁽²⁾ Z výsledků nedávných výzkumů vyplývá, že půdy z mírného pásma lze skladovat při 20 °C déle než tři měsíce (28, 29), aniž dojde k významné ztrátě mikrobiální aktivity.

▼ B

Před tím, než se zpracovaná půda použije ve zkoušce, provede se její předběžná inkubace, aby se umožnilo klíčení a odstranila se semena a aby se po změnách podmínek, ke kterým došlo od odběru nebo skladování po nastolení inkubačních podmínek, znovu ustavila rovnováha mikrobiálního metabolismu. Obecně postačuje předběžné inkubační období v délce od 2 do 28 dnů při podmínkách teploty a vlhkosti blízkých se podmínkám zkoušky (15). Skladování a předběžná inkubace by dohromady neměly trvat déle než tři měsíce.

1.9. PROVEDENÍ ZKOUŠKY

1.9.1. **Zkušební podmínky**1.9.1.1. *Zkušební teplota*

V průběhu celé zkoušky by měly být půdy inkubovány v temnu při stálé teplotě, která je typická pro klimatické podmínky, ve kterých dojde k použití látky nebo k jejímu uvolnění. Pro zkoušky všech látek, které se dostávají do půdy v mírném klimatickém pásu, se doporučuje teplota 20 ± 2 °C. Teplota musí být monitorována.

V případě chemických látek aplikovaných nebo uvolňovaných v chladném klimatickém pásu (např. v severských zemích, během podzimu/zimy) se inkubují další vzorky půdy, avšak při nižší teplotě (např. při 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Vlhkost*

Pro transformační zkoušky při aerobních podmínkách se vlhkost ⁽¹⁾ nastaví a udržuje na hodnotě pF od 2,0 do 2,5 (3). Vlhkost půdy se vyjádří jako hmotnost vody na jednotku hmotnosti sušiny půdy, pravidelně se kontroluje (např. každé 2 týdny) vážením inkubačních baněk a ztráta vody se vyrovnává přidáním vody (nejlépe sterilně filtrované vody z vodovodu). Při upravování vlhkosti je třeba zabránit ztrátám zkoušené látky a/nebo transformačních produktů v důsledku tékání nebo případné fotodegradace, nebo je třeba tyto ztráty minimalizovat.

V případě transformačních zkoušek za anaerobních podmínek a za podmínek rýžového pole se půda nasytí vodou tak, že se zaplaví.

1.9.1.3. *Podmínky aerobní inkubace*

V průtokových systémech se aerobní podmínky udržují občasným propláchnutím nebo nepřetržitým provětráváním zvlhčeným vzduchem. v biometrických baňkách se výměna vzduchu udržuje difuzí.

1.9.1.4. *Sterilní aerobní podmínky*

Za účelem získání informací o možné abiotické transformaci zkoušené látky lze vzorky půdy sterilizovat (metody sterilizace jsou uvedeny v literatuře 16 a 29), exponovat je sterilní zkoušené látce (např. přidáváním roztoku přes sterilní filtr) a provzdušňovat je zvlhčeným sterilním vzduchem, jak je popsáno v oddíle 1.9.1.3. U půd z rýžových polí se půda a voda sterilizuje a inkubace provede způsobem uvedeným v oddílu 1.9.1.6.

⁽¹⁾ Pro účely dostatečného provzdušňování a výživy půdní mikroflóry by půda neměla být ani příliš vlhká, ani příliš suchá. Vlhkost půdy doporučená pro optimální růst mikroflóry se nachází v rozmezí od 40 % do 60 % retenční vodní kapacity a v rozmezí od 0,1 do 0,33 bar (6). Naposledy uvedený rozsah odpovídá rozsahu pF od 2,0 do 2,5. Typická vlhkost různých druhů půd je uvedena v dodatku 2.

▼ B1.9.1.5. *Podmínky aerobní inkubace*

S cílem nastolit a udržovat anaerobní podmínky se půda, která byla exponována zkoušené látce a inkubována za aerobních podmínek 30 dnů nebo jeden poločas nebo po dobu odpovídající DT_{50} (podle toho, co je kratší), zaplaví vodou (vrstva vody 1–3 cm) a inkubační systém se propláchne inertním plynem (např. dusíkem nebo argonem) ⁽¹⁾. Zkušební systém musí umožňovat měření pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukčního potenciálu a musí být vybaven zařízením pro zachycování těkavých produktů. Biometrický systém musí být uzavřený, aby bylo zabráněno přístupu vzduchu difuzí.

1.9.1.6. *Inkubace za podmínek rýžového pole*

Pro účely studia transformace v půdách rýžových polí se půda zaplaví vrstvou vody o výšce asi 1–5 cm a zkoušená látka se aplikuje do vodné fáze (9). Doporučená tloušťka vrstvy půdy je alespoň 5 cm. Systém se provzdušňuje vzduchem jako za aerobních podmínek. Hodnota pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál vodné vrstvy se monitorují a zaznamenávají. Před zahájením transformačních studií je nezbytné alespoň dvoutýdenní předběžné inkubační období (viz oddíl 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Délka zkoušky*

Studie rychlosti a způsobu transformace by neměly za normálních podmínek trvat déle než 120 dnů ⁽²⁾ (3, 6, 8), neboť poté by podle očekávání mohlo v umělém laboratorním systému, izolovaném od přirozeného doplňování, postupně docházet ke snižování mikrobiální aktivity půdy. Pokud je to nezbytné pro popis rozkladu zkoušené látky a tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů, lze studie prodloužit (např. na 6 nebo 12 měsíců) (8). Delší inkubační období by měla být zdůvodněna ve zprávě o zkoušce a doplněna měřeními biomasy během těchto období a na jejich konci.

1.9.2. **Provedení zkoušky**

Do každé z inkubačních baněk se vpraví asi 50 až 200 g půdy (hmotnost sušiny) (viz obrázky 1 a 2 v příloze 3) a půda se jednou z metod uvedených v oddílu 1.8.2 exponuje zkoušené látce. Pokud se pro účely aplikace zkoušené látky použijí organická rozpouštědla, odstraní se z půdy odpařením. Půda se poté důkladně promíchá špachtlí nebo se baňka protřepe. Pokud se studie provádí za podmínek rýžového pole, půda a voda se po aplikaci zkoušené látky důkladně promísí. Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrnosti distribuce. Alternativní metody jsou uvedeny níže.

⁽¹⁾ Aerobní podmínky převažují v povrchových půdách a dokonce v podpovrchových půdách, jak ukázal výzkumný projekt podporovaný EU (K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270–277, 17–21 17–21. srpen 1992, Sigtuna, Švédsko). Anaerobní podmínky se mohou vyskytovat jen příležitostně během zaplavení půdy po vydatných srážkách, nebo jsou-li takové podmínky ustaveny na rýžových polích.

⁽²⁾ Aerobní studie mohou být ukončeny daleko dříve než za 120 dnů, pokud je v dané době jasně dosaženo konečného transformačního schématu a konečné mineralizace. Zkoušku lze ukončit po 120 dnech, nebo pokud se transformovalo 90 % zkoušené látky, avšak pouze tehdy, vytvořilo-li se alespoň 5 % CO_2 .

▼B

Aplikované množství by mělo odpovídat nejvyššímu aplikovanému množství přípravku na ochranu rostlin doporučenému podle pokynů k použití a rovnoměrnému zapravení do vhodné hloubky na poli (např. do horní deseticentimetrové vrstvy půdy⁽¹⁾). Například u chemických látek aplikovaných na list nebo do půdy bez zapravení se pro výpočet množství chemické látky, které je třeba přidat do každé baňky, použije hloubka vrstvy půdy 2,5 cm. U chemických látek zapravených do půdy je příslušná hloubka specifikována v pokynech pro použití. U chemických látek obecně by mělo být aplikované množství odhadnuto na základě hlavní cesty vstupu do půdy; jsou-li například hlavní cestou vstupu do půdy čistírenské kaly, měla by být chemická látka přidána do kalu v koncentraci, která odráží očekávanou koncentraci v kalu, a množství kalu zapravené do půdy by mělo odpovídat normálnímu množství kalu zapravenému do zemědělských půd. Pokud tato koncentrace není dostatečná pro identifikaci hlavních transformačních produktů, může napomoci inkubace samostatných půdních vzorků obsahujících vyšší koncentrace, avšak neměly by být používány nadměrné koncentrace, které mají vliv na mikrobiální funkce (viz oddíly 1.5 a 1.8.2).

Jinou možností je expozice velké dávky půdy (tj. 1 až 2 kg), její důkladné promísení vhodným míchacím zařízením a přenesení malých podílů o hmotnosti 50 až 200 g do inkubačních baněk (např. pomocí děliče vzorku). Malé podíly (např. 1 g) exponované půdy se analyzují na zkoušenou látku za účelem kontroly rovnoměrnosti distribuce. Takový postup se upřednostňuje, neboť umožňuje stejnoměrnější rozptýlení zkoušené látky v půdě.

Neexponované vzorky se inkubují za stejných (aerobních) podmínek jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy během studií a na jejich konci.

Pokud se látka aplikuje do půdy rozpuštěná v organickém rozpouštědle (organických rozpouštědlech), inkubují se vzorky půdy vystavené témuž množství rozpouštědla (rozpouštědel) za týchž (aerobních) podmínek jako vzorky exponované zkoušené látce. Tyto vzorky se použijí pro stanovení biomasy na začátku studií, v jejich průběhu a na jejich konci za účelem kontroly účinků rozpouštědla (rozpouštědel) na mikrobiální biomasu.

Baňky obsahující exponovanou půdu se buď zapojí do průtokového systému popsaného na obrázku 1, nebo se uzavřou absorbní kolonou, jak je uvedeno na obrázku 2 (viz dodatek 3).

⁽¹⁾ Výpočet výchozí koncentrace na základě plochy se provede takto:

$$C_{\text{půda}} [\text{mg/kg}] = \frac{A [\text{kg/ha}] \cdot 10^6 [\text{mg/kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{půda}}/\text{m}^3]}$$

$C_{\text{půda}}$ = výchozí koncentrace v půdě ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

A = aplikační dávka ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$); l = tloušťka půdní vrstvy na poli [m]; d = sypaná hustota suché půdy ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$).

Zhruba platí, že aplikační dávka $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ vede ke koncentraci v půdě přibližně $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ v 10 cm vrstvě (při předpokládané sypané hustotě $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

▼ B**1.9.3. Odběr vzorků a měření**

V příslušných časových intervalech se vyberou duplikátní inkubační baňky, vzorky půd se extrahují vhodnými rozpouštědly různé polarity a analyzují na zkoušenou látku a/nebo na transformační produkty. U kvalitně připravených studií je k dispozici dostatečný počet baněk, aby bylo možné ke každému odběru vybrat dvě baňky. V různých časových intervalech (v sedmidenních intervalech během prvního měsíce a po prvním měsíci v sedmnáctidenních intervalech) během inkubace každého vzorku půdy a dále na konci inkubace se také odeberou absorpční roztoky nebo tuhé absorpční materiály a analyzují se na těkavé produkty. Kromě vzorku půdy odebraného ihned po aplikaci (vzorek ze dne 0) se provede alespoň dalších 5 odběrů. Časové intervaly se zvolí tak, aby bylo možné stanovit schéma rozkladu zkoušené látky a způsob tvorby a rozkladu transformačních produktů (např. po 0, 1, 3, 7 dnech; po 2, 3 týdnech; po 1, 2, 3 měsících atd.).

V případě zkoušené látky značené isotopem ^{14}C se spálením kvantitativně stanoví neextrahovatelná radioaktivita a pro každý vzorkovací interval se vypočte látková bilance.

V případě anaerobní inkubace nebo inkubace za podmínek rýžového pole se půda a vodná fáze analyzují na zkoušenou látku a transformační produkty buď společně, nebo se před extrakcí a analýzou oddělí filtrací nebo centrifugací.

1.9.4. Nepovinné zkoušky

Pro odhad vlivu teploty a vlhkosti půdy na rychlosti transformace zkoušené látky a/nebo jejich transformačních produktů v půdě mohou být užitečné aerobní nesterilní studie při další teplotě nebo vlhkosti půdy.

O další charakterizaci neextrahovatelné radioaktivity se lze pokusit například použitím metody extrakce tekutinou v nadkritickém stavu.

2. ÚDAJE**2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Pro každý vzorkovací interval se uvede množství zkoušené látky, transformačních produktů, těkavých látek (pouze v %) a neextrahovatelných látek v procentech výchozí koncentrace, popřípadě v mg na kg půdy (na hmotnost sušiny). Pro každý vzorkovací interval se uvede látková bilance v procentech použité výchozí koncentrace. Grafické znázornění závislosti koncentrace zkoušené látky na čase umožní provést odhad jejího poločasu transformace nebo hodnoty DT_{50} . Měly by být identifikovány hlavní transformační produkty a sestrojeny křivky závislosti koncentrace na čase, aby se ukázala rychlost jejich tvorby a rozkladu. Hlavním transformačním produktem je jakýkoli produkt, který kdykoli během studie tvoří ≥ 10 % aplikované dávky.

Zachycené těkavé produkty jsou určitým ukazatelem těkavosti zkoušené látky a jejich transformačních produktů z půdy.

▼ B

Přesnější stanovení poločasů nebo hodnot DT_{50} a popřípadě hodnot DT_{75} a DT_{90} se provede výpočtem za použití vhodného modelu kinetiky. Společně s hodnotami poločasu a DT_{50} se uvede popis použitého modelu kinetiky, řád kinetiky a koeficient determinace (r^2). Pokud není $r^2 < 0,7$ upřednostňuje se kinetika prvního řádu. Podle možnosti se výpočty použijí také na hlavní transformační produkty. Příklady vhodných modelů jsou popsány v literatuře (31 až 35).

V případě studií rychlosti prováděných při různých teplotách se závislost rychlosti transformace na teplotě popíše v rozsahu experimentálních teplot pomocí Arrheniovy rovnice:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ nebo } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

kde $\ln A$ a B jsou regresní konstanty získané z úseku na abscise a ze směrnice regresní přímky závislosti $\ln k$ na $1/T$, kde k je rychlostní konstanta při teplotě T a T je teplota v Kelvinech. Je třeba věnovat pozornost omezení rozsahu teplot, v němž platí Arrheniova rovnice, jestliže transformaci určuje mikrobiální činnost.

2.2. HODNOCENÍ A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Přestože se studie provádějí v umělém laboratorním systému, umožňují výsledky odhadnout rychlost transformace zkoušené látky a rovněž rychlost tvorby a rozkladu transformačních produktů za polních podmínek (36, 37).

Studie transformačního způsobu zkoušené látky poskytuje informaci o způsobu, jakým se mění struktura aplikované látky v půdě působením chemických a mikrobiálních reakcí.

3. ZPRÁVY

PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

- obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturní vzorec (s uvedením polohy značícího atomu (značících atomů) při použití radionuklidů) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti (viz oddíl 1.5),
- čistota zkoušené látky (obsah nečistot),
- popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita.

Referenční látky:

- chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu.

Zkušební půdy:

- podrobné údaje o místě odběru,
- datum a postup odběru vzorků půdy,

▼ B

- vlastnosti půdy, např. pH, obsah organického uhlíku, struktura (% písku, % prachu, % jílu), kationtová výměnná kapacita, sypná hustota, schopnost zadržet vodu a mikrobiální biomasa,
- doba skladování půdy a podmínky skladování (pokud byla skladována).

Zkušební podmínky:

- datum provedení studií,
- množství aplikované zkoušené látky,
- použítá rozpouštědla a metoda aplikace zkoušené látky,
- hmotnost exponované půdy na začátku zkoušky a hmotnost půdy odebírané pro analýzu v každém intervalu,
- popis použitého inkubačního systému,
- rychlosti průtoku vzduchu (pouze u průtokových systémů),
- zkušební teplota,
- vlhkost půdy během inkubace,
- mikrobiální biomasa na začátku aerobních studií, během nich a na jejich konci,
- pH, koncentrace kyslíku a oxidačně-redukční potenciál na začátku anaerobních studií a studií za podmínek rýžového pole, během nich a na jejich konci,
- metoda (metody) extrakce,
- metody kvantitativního stanovení a identifikace zkoušené látky a hlavních transformačních produktů v půdě a v absorpčních materiálech,
- počet duplikátních vzorků a počet kontrol.

Výsledky:

- výsledky stanovení mikrobiální aktivity,
- opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,
- hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),
- tabulky s výsledky vyjádřenými v % výchozí aplikované dávky, popřípadě v mg na kg půdy (vztaheno na hmotnost sušiny půdy),
- látková bilance během studií a na jejich konci,
- charakterizace neextrahovatelné (vázané) radioaktivity nebo reziduí v půdě,
- kvantifikace uvolněného CO₂ a dalších těkavých sloučenin,
- křivky závislosti koncentrací zkoušené látky, popřípadě hlavních transformačních produktů v půdě na čase,
- poločas nebo hodnoty DT₅₀, DT₇₅ a DT₉₀ pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty včetně příslušných intervalů spolehlivosti,

▼B

- odhad rychlosti abiotického rozkladu za sterilních podmínek,
- posouzení kinetiky transformace pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty,
- případný návrh způsobu transformace,
- diskuse a interpretace výsledků,
- nezpracovaná data (tj. chromatogramy jednotlivých vzorků, příklady výpočtu rychlostí transformace a metody použité pro identifikaci transformačních produktů).

4. **LITERATURA**

- 1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- 2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- 3) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
- 4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- 6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.
- 7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- 8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- 10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.
- 11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.
- 12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- 13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984)
- 14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼ B

- 15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 16) Annex v to Dir. 67/548/EEC
- 17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.
- 18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26: 305 (1962).
- 19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- 20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keelney, Eds. *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- 21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- 22) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- 23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- 24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215–221.
- 25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.
- 26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.
- 27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105–120.
- 28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59–63 (SETAC-Europe).
- 29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68–69 (SETAC-Europe).
- 30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197–200.
- 31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141–146.

▼ B

- 32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181–199.
- 33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.
- 34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188–204.
- 35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47–60.
- 36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032–1041.
- 37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

▼ **B**

DODATEK 1

TLAK VODY, POLNÍ KAPACITY (PK) A RETENČNÍ VODNÍ KAPACITA (RVK) (1)

Výška vodního sloupce (cm)	pF (a)	bar (b)	Poznámky
10 ⁷	7	10 ⁴	Suchá půda
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Bod vadnutí
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 (c)	Rozpětí polní kapacity (d)
10 ²	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	RVK (přibližná hodnota)
1	0	0,001	Půda nasycená vodou

(a) pF = dekadický logaritmus výšky vodního sloupce v cm.

(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

(c) Odpovídá přibližnému obsahu vody při složení 10 % písku, 35 % hlíny a 45 % jílu.

(d) Polní kapacita není konstanta, ale mění se v závislosti na druhu půdy od pF 1,5 do 2,5.

Tlak vody se vyjadřuje v cm vodního sloupce nebo v jednotkách bar. Vzhledem k velkému rozpětí se sací tlak vyjadřuje jednoduše jako hodnota pF, která je ekvivalentní logaritmu vodního sloupce v cm.

Polní kapacita je definována jako množství vody, které přírodní půda po delším deštivém období nebo po dostatečném zavlažení udrží proti gravitaci 2 dny. Stanovuje se u neporušené půdy v polním pokusu. Naměřená hodnota tedy není použitelná pro laboratorní vzorky porušené půdy. Hodnoty PK stanovené u porušených půd mohou vykazovat větší systematické odchylky.

Retenční vodní kapacita (RVK) se stanovuje v laboratoři u neporušené i porušené půdy tak, že se kapilárním vztlínáním nasatí sloupec půdy vodou. Využije se zejména u porušených půd může být až o 30 % vyšší než polní kapacita (1). Také se stanovuje snadněji než spolehlivé hodnoty PK.

Poznámky

(1) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

DODATEK 2

**VLHKOST PUDY (V G VODY NA 100 G SUSINY) U RUZNÝCH DRUHU PUD
Z RUZNÝCH ZEMI**

Druh půdy	Země	Vlhkost půdy při		
		RVK ⁽¹⁾	pF = 1,8	pF = 2,5
Písčítá	Německo	28,7	8,8	3,9
Hlinitopísčítá	Německo	50,4	17,9	12,1
Hlinitopísčítá	Švýcarsko	44,0	35,3	9,2
Prachovitohlinitá	Švýcarsko	72,8	56,6	28,4
Jílovitohlinitá	Brazílie	69,7	38,4	27,3
Jílovitohlinitá	Japonsko	74,4	57,8	31,4
Písčítohlinitá	Japonsko	82,4	59,2	36,0
Prachovitohlinitá	USA	47,2	33,2	18,8
Písčítohlinitá	USA	40,4	25,2	13,3

⁽¹⁾ Retenční vodní kapacita.

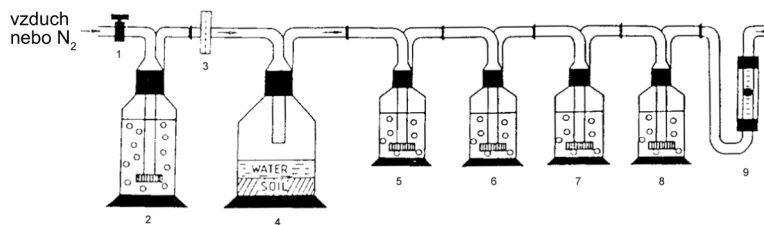
▼ B

DODATEK 3

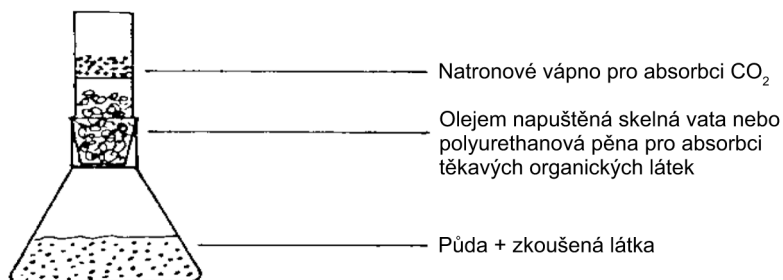
Obrázek 1

Příklad průtokové aparatury pro studium transformace chemických látek v půdě ⁽¹⁾ ⁽²⁾

- | | | |
|---|--|--|
| 1: jehlový ventil | 4: baňka pro studium metabolismu v půdě (zalitá vodou pouze v případě anaerobních podmínek a podmínek rýžového pole) | 7, 8: zátka z hydroxidu sodného pro zachycení CO ₂ a jiných kyselých těkavých látek |
| 2: promývačka s vodou | 5: baňka s ethylenglykolem pro zachycení organických těkavých sloučenin | 9: průtokoměr |
| 3: ultramembrána (pouze ve sterilních podmínkách), velikost pórů 0,2 μm | 6: baňka s kyselinou sírovou pro zachycení alkalických těkavých sloučenin | |



Obrázek 2

Příklad biometrické baňky pro studium transformace chemických látek v půdě ⁽³⁾

⁽¹⁾ Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In: Interactions between Herbicides and the Soil (R. J. Hance, ed.), Academic Press, 123–157.

⁽²⁾ Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In: Progress in Pesticide Biochemistry, D.H. Hutson, T.R. Roberts, (eds.) J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

⁽³⁾ Anderson, J. P. E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallyl im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

▼B**C.24. AEROBNÍ A ANAEROBNÍ TRANSFORMACE V SYSTÉMECH VODA/SEDIMENT****1. METODA**

Tato zkušební metoda je replikou metody OECD TG 308 (2002).

1.1. ÚVOD

Chemické látky se mohou dostat do mělkých nebo hlubokých povrchových vod cestami, jako jsou přímá aplikace, unášení postřiku, odtok, ukládání odpadu, průmyslové, komunální nebo zemědělské emise a atmosférický spad. V této zkušební metodě je popsán laboratorní postup posouzení aerobní a anaerobní transformace organických chemických látek v systémech voda/sediment. Vychází ze stávajících směrnic (1, 2, 3, 4, 5, 6). O počtu a druzích půd, které mají být použity ve zkoušce, byla učiněna dohoda na pracovním semináři OECD *Workshop on soil/sediment Selection held at Belgirate*, Itálie, 1995 (7). Zde byla rovněž přijata doporučení týkající se odběru, zpracování a skladování vzorků sedimentů založená na směrnici ISO (8). Tyto studie jsou požadovány u chemických látek, které jsou aplikovány bezprostředně do vody nebo které se mohou dostat do vody výše uvedenými cestami.

Podmínky ve vrchní vodní fázi přírodních systémů voda/sediment jsou často aerobní. Podmínky v povrchové vrstvě sedimentu mohou být buď aerobní, nebo anaerobní, zatímco podmínky hlouběji v sedimentu jsou obvykle anaerobní. S cílem zahrnout všechny tyto možnosti je v tomto dokumentu popsána zkouška jak za aerobních podmínek, tak za anaerobních podmínek. Aerobní zkouškou se simuluje aerobní vodní sloupec nad aerobní vrstvou sedimentu, pod níž leží vrstva s anaerobním gradientem. Anaerobní zkouška simuluje zcela anaerobní systém voda/sediment. Pokud je z okolností zřejmé, že je třeba se odchýlit od těchto doporučení, např. použít nedotčené střední vrstvy sedimentů nebo sedimenty, které mohly být exponovány zkoušenou látkou, existují jiné metody určené k tomuto účelu (9).

1.2. DEFINICE

Ve všech případech je třeba používat mezinárodní soustavu jednotek SI.

Zkoušená látka: jakákoli látka, ať již výchozí látka, nebo příslušné transformační produkty.

Transformační produkty: všechny látky vznikající při biotických a abiotických transformačních reakcích zkoušené látky, včetně CO₂ a vázaných reziduí.

Vázaná rezidua: „vázaná rezidua“ jsou sloučeniny v půdě, rostlinách nebo v živočiších, které po extrakci zůstávají v matici ve formě výchozí látky nebo jejího metabolitu (jejích metabolitů). Metoda extrakce nesmí podstatně měnit samotné sloučeniny nebo strukturu matrice. Povahu vazeb lze částečně vysvětlit extrakcí spojenou se změnami v matici a moderními analytickými postupy. Dosud byly tímto způsobem vyjasněny např. kovalentní, iontové a adsorpční vazby a rovněž záchyty. Tvorba vázaných reziduí obecně podstatně snižuje biologickou přístupnost a dostupnost (10) (upraveno IUPAC 1984 (11)).

▼ B

Aerobní transformace: (oxidační): reakce, ke kterým dochází za přítomnosti kyslíku (12).

Anaerobní transformace: (redukční): reakce probíhající s vyloučením molekulárního kyslíku (12).

Přírodní vody: jsou povrchové vody získané z rybníků, řek, potoků atd.

Sediment: je směs minerálních a organických chemických složek, přičemž organické složky obsahují sloučeniny s vysokým obsahem uhlíku a dusíku a vysokou molekulovou hmotností. Ukládají se v přírodních vodách a vytvářejí rozhraní s těmito vodami.

Mineralizace: je úplný rozklad organické sloučeniny na CO_2 a H_2O za aerobních podmínek a na CH_4 , CO_2 a H_2O za anaerobních podmínek. V rámci této zkušební metody, při níž se používají sloučeniny značené radioisotopy, se mineralizací rozumí rozsáhlý rozklad molekuly, při němž se značící atomy uhlíku kvantitativně oxidují nebo redukují, přičemž se uvolňuje odpovídající množství $^{14}\text{CO}_2$ nebo $^{14}\text{CH}_4$.

Poločas, $t_{0,5}$: je čas, za který dojde k 50 % transformaci zkoušené látky, jestliže lze transformaci popsat kinetikou prvního řádu; nezávisí na počáteční koncentraci.

DT₅₀ (doba odbourání 50): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 50 %.

DT₇₅ (doba odbourání 75): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 75 %.

DT₉₀ (doba odbourání 90): doba, za kterou se počáteční koncentrace zkoušené látky sníží o 90 %.

1.3. REFERENČNÍ LÁTKY

Referenční látky by měly být použity pro identifikaci a kvantitativní stanovení transformačních produktů spektroskopickými a chromatografickými metodami.

1.4. INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTCE

Pro stanovení rychlosti transformace lze použít jak látky neznačené radioisotopy, tak látky značené, přičemž značené materiály jsou upřednostňovány. Značený materiál je nezbytný pro studium způsobu transformace a pro stanovení látkové bilance. Doporučuje se značení isotopem ^{14}C , avšak užitečné mohou být i jiné isotopy, např. ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Značena by měla být pokud možno nejstabilnější část (části) molekuly ⁽¹⁾. Chemická a/nebo radiochemická čistota látky by měla být alespoň 95 %.

Před provedením zkoušky by měly být k dispozici tyto informace o látce:

- a) rozpustnost ve vodě (metoda A.6);
- b) rozpustnost v organických rozpouštědlech;
- c) tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta;

⁽¹⁾ Pokud například látka obsahuje kruh, je třeba tento kruh označit; pokud látka obsahuje dva nebo více kruhů, může být nezbytné provést samostatné studie za účelem stanovení osudu každého z označených kruhů, a získat tak vhodné informace o tvorbě transformačních produktů.

▼ B

- d) rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (metoda A.8);
- e) adsorpční koeficient (podle potřeby K_d , K_f nebo K_{oc}) (metoda C.18);
- f) hydrolýza (metoda C.7);
- g) disociační konstanta (pK_a) (směrnice OECD 112) (13);
- h) chemická struktura zkoušené látky a případně poloha značícího nuklidu.

Poznámka: Ve zprávě se uvede teplota, při které byla měření prováděna.

Mezi další užitečné informace patří údaje o toxicitě zkoušené látky pro půdní mikroorganismy, údaje o snadné nebo vlastní biologické rozložitelnosti a údaje o aerobní a anaerobní transformaci v půdě.

K dispozici by měly být analytické metody (včetně extrakčních a izolačních metod) pro kvantitativní stanovení a identifikaci zkoušené látky a jejich transformačních produktů ve vodě a sedimentu (viz oddíl 1.7.2).

1.5. PODSTATA ZKUŠEBNÍ METODY

V metodě popsané v této zkoušce se používají aerobní i anaerobní systémy voda/sediment (viz dodatek 1), které umožňují:

- i) měřit rychlost transformace zkoušené látky v systému voda/-sediment,
- ii) měřit rychlost transformace zkoušené látky v sedimentu,
- iii) měřit rychlost mineralizace zkoušené látky a/nebo produktů její transformace (pokud se použije zkoušená látka značená izotopem ^{14}C),
- iv) identifikaci a kvantifikaci produktů transformace ve vodě a v sedimentu, včetně látkové bilance (pokud se použije značená zkoušená látka),
- v) měřit distribuci zkoušené látky a produktů její transformace mezi dvěma fázemi během inkubace v temnu (aby nedošlo např. k vykvetení řas) při konstantní teplotě. Pokud to údaje umožňují, stanoví se poločasy a hodnoty DT_{50} , DT_{75} a DT_{90} , které by však neměly být příliš extrapolovány mimo obor experimentálních hodnot (viz oddíl 1.2).

Pro aerobní i anaerobní studie jsou nezbytné alespoň dva sedimenty a příslušné vodní fáze (7). V některých případech by však měly být použity více než dva systémy voda/sediment, např. u chemických látek, které mohou být přítomny ve sladkovodním i mořském ekosystému.

▼ B

1.6. POUŽITELNOST ZKOUŠKY

Tato metoda je použitelná pro všechny chemické látky (neznačené nebo značené radioaktivními isotopy), pro které je k dispozici analytická metoda s dostatečnou přesností a citlivostí. Je použitelná pro mírně těkavé a netěkavé sloučeniny rozpustné nebo špatně rozpustné ve vodě. Zkouška by neměla být použita u látek, které z vody silně těkají (např. fumiganty, organická rozpouštědla), a nelze je tedy ve vodě nebo v sedimentu udržet za experimentálních podmínek této zkoušky.

Tato metoda je dosud používána ke studiu transformace chemických látek ve sladkovodním systému voda/sediment, avšak může být v zásadě použita také na estuární a mořské systémy. Není vhodná k simulaci podmínek v tekoucích vodách (např. řekách) nebo na otevřeném moři.

1.7. KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1. **Výtěžnost**

Extrakce a analýza provedená alespoň u dvou duplikátních vzorků systému voda/sediment ihned po přidání zkoušené látky poskytne první informaci o opakovatelnosti analytické metody a o stejnoměrnosti aplikace zkoušené látky. Výtěžnosti pozdějších stupňů experimentu se zjistí z příslušných látkových bilancí (pokud se použije značený materiál). Výtěžnosti by se měly nacházet v rozmezí 90 % až 110 % u značených chemických látek (6) a v rozmezí 70 % až 110 % u neznačených chemických látek.

1.7.2. **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (kromě účinnosti první extrakce) pro kvantifikaci zkoušené látky a transformačních produktů lze ověřit paralelním provedením analýzy duplikátních vzorků těchto extraktů (vzorků) vody nebo sedimentu, které byly dostatečně dlouho inkubovány, aby došlo k vytvoření transformačních produktů.

Mez detekce analytické metody (LOD) pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být alespoň 0,01 mg na kg vody nebo sedimentu (pro zkoušenou látku) nebo 1 % výchozího množství aplikovaného do zkušebního systému, podle toho, která z těchto hodnot je nižší. Rovněž by měla být specifikována mez kvantitativní stanovitelnosti (LOQ).

1.7.3. **Správnost dat o transformaci**

Regresní analýza závislosti koncentrace zkoušené látky na čase poskytuje vhodné informace o správnosti transformační křivky a umožňuje vypočítat intervaly spolehlivosti pro poločasy (v případě zdánlivé kinetiky prvního řádu) nebo pro hodnoty DT_{50} a popřípadě hodnoty DT_{75} a DT_{90} .

1.8. POPIS METODY

1.8.1. **Zkušební systém a aparatura**

Studie se provede se skleněnými nádobami (např. baňkami, centrifugačními kyvetami), pokud z předběžných informací (např. z rozdělovacího koeficientu n-oktanol/voda, ze sorpčních dat atd.) nevyplývá, že látka může ulpívat na skle; v takovém případě lze zvážit použití náhradního materiálu (např. teflonu). Pokud je o zkoušené látce známo, že ulpívá na skle, lze problém zmírnit jednou z následujících metod:

▼B

- stanovením hmotnosti zkoušené látky a transformačních produktů sorbovaných na skle,
- zajištěním, aby se na konci zkoušky omylo rozpouštědlem veškeré laboratorní sklo,
- použitím komerční úpravy přípravků (viz také oddíl 1.9.2),
- použitím většího množství pomocného rozpouštědla za účelem přidání zkoušené látky do systému; pokud se použije pomocné rozpouštědlo, nesmí štěpit zkoušenou látku solvolýzou.

Příklady typických zkušebních aparatur, tj. průtokové a biometrické systémy, jsou uvedeny v dodatcích 2 a 3 (14). Jiné užitečné inkubační systémy jsou popsány v literatuře (15). Experimentální aparatura by měla být konstruována tak, aby byla možná výměna vzduchu nebo dusíku a zachycení těkavých produktů. Rozměry aparatury musí splňovat požadavky zkoušky (viz oddíl 1.9.1). Ventilace musí být zajištěna buď jemným probubláváním, nebo proháněním vzduchu nebo dusíku nad hladinou vody. V druhém případě se doporučuje vodu seshora mírně promíchávat, aby docházelo k lepší distribuci kyslíku nebo dusíku ve vodě. Neměl by se použít vzduch zbařený CO_2 , neboť by došlo ke zvýšení pH vody. V žádném případě není žádoucí, aby došlo ke zviření sedimentu, a je tomu třeba pokud možno zabránit. Slabě těkavé chemické látky se zkoušejí v biometrickém systému za mírného promíchávání vodní hladiny. Lze rovněž použít uzavřené nádoby s volným objemem pod víčkem vyplněným atmosférickým vzduchem nebo dusíkem a vnitřní ampulky pro zachycování těkavých produktů (16). U aerobních zkoušek je nezbytná pravidelná výměna plynu pod víčkem, aby se vyrovnávala spotřeba kyslíku biomasou.

Mezi vhodné lapače pro shromažďování těkavých transformačních produktů patří kromě jiných roztok hydroxidu draselného nebo sodného o koncentraci 1 mol/dm^3 pro zachycování oxidu uhličitého ⁽¹⁾ a ethylenglykol, ethanolamin nebo 2 % parafin v xylenu pro organické sloučeniny. Těkavé látky vznikající za anaerobních podmínek, např. methan, lze zachycovat na molekulovém sítu. Tyto těkavé látky lze spálit např. na CO_2 v křemenné trubičce za přítomnosti CuO při teplotě $900 \text{ }^\circ\text{C}$ a vzniklý CO_2 lze zachytit v absorbéru s alkálií (17).

Pro chemickou analýzu zkoušené látky a transformačních produktů jsou nezbytné laboratorní přístroje (např. přístroje pro plynovou chromatografii s kapalinovou stacionární fází (GLC), vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), pro chromatografii na tenké vrstvě (TLC), hmotnostní spektrometrii (MS), kombinaci plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC-MS), kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS), jadernou magnetickou rezonanci (NMR) atd.), včetně detekčních systémů pro detekci sloučenin značených nebo neznačených radioisotopy. Pokud se použije materiál značený radioisotopy, je třeba mít k dispozici scintilační spektrometr a zařízení pro spalování za přítomnosti oxidačního činidla (pro spalování vzorků sedimentů před analýzou radioaktivity).

Další standardní laboratorní vybavení pro fyzikálněchemická a biologická měření (viz oddíl 1.8.2.2 tabulka 1), laboratorní sklo, chemikálie a činidla se použijí podle potřeby.

⁽¹⁾ Vzhledem k tomu, že alkalické roztoky absorbují oxid uhličitý ze vzduchu určeného k provzdušňování a oxid uhličitý uvolňující se respirací v aerobních experimentech, musí být pravidelně vyměňovány, aby se nevyčerpala jejich absorpční kapacita.

▼B**1.8.2. Výběr a počet vodních sedimentů**

Místa odběru by měla být vybrána podle účelu zkoušky v dané situaci. Při výběru místa odběru vzorků musí být přihlédnuto k historii případných zemědělských, průmyslových nebo komunálních vstupů do povodí a do horních toků. Sedimenty by neměly být použity, pokud byly v předchozích 4 letech kontaminovány zkoušenou látkou nebo jejími strukturálními analogy.

1.8.2.1. Výběr sedimentů

Pro aerobní studie se obvykle použijí dva sedimenty (7). Tyto dva vybrané sedimenty by se měly lišit co do obsahu organického uhlíku a struktury. Jeden sediment by měl mít vysoký obsah organického uhlíku (2,5–7,5 %) a jemnou strukturu a druhý sediment by měl mít nízký obsah organického uhlíku (0,5–2,5 %) a hrubou strukturu. Obsah organického uhlíku by se měl zpravidla lišit alespoň o 2 %. „Jemná struktura“ je definována obsahem složky (jíl + prach) ⁽¹⁾ vyšším než 50 % a „hrubá textura“ je definována obsahem složky (jíl + prach) nižším než 50 %. Rozdíl v obsahu složek (jíl + prach) u obou sedimentů by měl být zpravidla alespoň 20 %. V případě, že se může chemikálie dostat do mořských vod, měl by alespoň jeden systém voda/sediment pocházet z moře.

Pro přísně anaerobní studie by měly být odebrány dva sedimenty (včetně okolní vody) z anaerobních zón povrchových vod (7). Se sedimentem i vodní fází by mělo být zacházeno opatrně a měly by být přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku.

Pro výběr sedimentu mohou být důležité i jiné parametry, které by měly být zvažovány případ od případu. Rozpětí pH sedimentů je například důležité pro zkoušení chemikálií, u nichž transformace a/-nebo sorpce mohou záviset na pH. Závislost sorpce na pH by se mohla odrážet v hodnotě pK_a zkoušené látky.

1.8.2.2. Charakterizace vzorků systému voda/sediment

Klíčové parametry, které musí být jak u vody, tak u sedimentu měřeny a uvedeny ve zprávě (s odkazem na použitou metodu), a fáze zkoušky, ve které mají být měřeny, jsou shrnuty v níže uvedené tabulce. Metody stanovení těchto parametrů jsou pro informaci uvedeny v literatuře (18, 19, 20, 21).

Kromě toho může být případ od případu nezbytné měřit a uvádět další parametry (např. u sladkovodního systému: obsah částic, alkalita, tvrdost, vodivost, NO_3/PO_4 (poměr jednotlivých hodnot); u sedimentů: kationtová výměnná kapacita, retenční vodní kapacita, obsah uhličitánů, celkový obsah dusíku a fosforu; u mořských systémů: salinita). Pro posouzení oxidačně-redukčních podmínek, a zejména v souvislosti s anaerobní transformací, může být také užitečná analýza sedimentů a vody na dusičnany, sírany, biologicky dostupné železo, popřípadě na jiné akceptory elektronů.

⁽¹⁾ (Jíl + prach) je minerální frakce sedimentu s velikostí částic < 50 μm .

▼**B****Měření parametrů pro charakterizaci vzorků systémů voda/sediment (7, 22, 23)**

Parametr	Fáze zkušebního postupu					
	odběr v terénu	manipulace po odběru	zahájení aklimatizace	zahájení zkoušky	samotná zkouška	konec zkoušky
Voda						
Původ/zdroj	x					
Teplota	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Koncentrace O ₂ (*)	x		x	x	x	x
Oxidačně-redukční potenciál (*)			x	x	x	x
Sediment						
Původ/zdroj	x					
Hloubka vrstvy	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuce částic		x				
TOC		x	x	x		x
Mikrobiální biomasa (**)		x		x		x
Oxidačně-redukční potenciál (*)	Pozorování (barva/zápach)		x	x	x	x

(*) Výsledky nedávných výzkumů ukázaly, že měření koncentrace kyslíku ve vodě a oxidačně-redukčního potenciálu vody nemají vypovídací hodnotu, pokud jde o mechanismus růstu a vývoje mikrobiální populace v povrchových vodách, a nemají ani předpovědní hodnotu (24, 25). Stanovení biochemické spotřeby kyslíku (BOD, při odběru vzorků v terénu a při zahájení a na konci zkoušky) a koncentrace mikro- a makroživin Ca, Mg a Mn ve vodě (při zahájení a na konci zkoušky) a měření celkového obsahu N a P v sedimentech (při odběru vzorků v terénu a na konci zkoušky) může být lepším nástrojem pro interpretaci a hodnocení rychlosti a způsobů aerobní biotransformace.

(**) Metoda měření rychlosti mikrobiální respirace (26), fumigační metoda (27) nebo měření počtu mikroorganismů (např. bakterií, aktinomycet, plísní a celkového počtu kolonií) pro aerobní studie; rychlost methanogeneze u anaerobních studií.

1.8.3. **Odběr vzorků, manipulace s nimi a jejich skladování**1.8.3.1. *Odběr*

Vzorky sedimentu se odeberou podle návrhu směrnice ISO pro odběr vzorků sedimentů ze dna (8). Vzorky se odeberou z celé 5 až 10 cm silné horní vrstvy sedimentu. Současně se sedimentem se odebere z téhož místa i vzorek okolní vody. U anaerobní studie musí být sediment a okolní voda odebrány a přepravovány s vyloučením přístupu kyslíku (28) (viz oddíl 1.8.2.1). V literatuře je popsáno několik odběrových zařízení (8, 23).

▼ B1.8.3.2. *Manipulace*

Sediment se oddělí od vody filtrací a poté se pomocí přebytku vody z místa odběru prosévá za mokra na 2mm sítu; voda se poté odstraní. Následně se v inkubační baňce v požadovaném poměru (viz oddíl 1.9.1) smísí známé množství sedimentu a vody a směs se připraví pro aklimatizaci (viz oddíl 1.8.4). U anaerobní studie musí být všechny kroky prováděny s vyloučením přístupu kyslíku (29, 30, 31, 32, 33).

1.8.3.3. *Skladování*

V každém případě se doporučuje používat čerstvě odebraný sediment a vodu; je-li však skladování nezbytné, sediment s vodou se proseje výše popsaným způsobem a zalitý vodou (vrstva vody 6–10 cm) se skladuje v temnu při 4 ± 2 °C (4) maximálně 4 týdny (7, 8, 23). Vzorky pro aerobní studie se skladují za volného přístupu vzduchu (např. v otevřených nádobách), zatímco vzorky pro anaerobní studie se skladují s vyloučením přístupu kyslíku. Při přepravě a skladování nesmí sediment a voda zmrznout a sediment nesmí být vysušován.

1.8.4. **Příprava vzorků sedimentu/vody ke zkoušce**

Před přidáním zkoušené látky musí proběhnout aklimatizace, při níž musí být vzorky sedimentu/vody umístěny v inkubační nádobě, která se použije při hlavní zkoušce; podmínky aklimatizace musí být totožné s podmínkami inkubace při zkoušce (viz oddíl 1.9.1). Doba aklimatizace je čas nezbytný pro dostatečnou stabilizaci systému, kterou lze posoudit podle pH, koncentrace kyslíku ve vodě, oxidačně-redukčního potenciálu sedimentu a vody a makroskopické separace fází. Doba aklimatizace není obvykle delší než jeden až dva týdny a neměla by překročit čtyři týdny. Výsledky měření provedených během této doby se uvedou ve zprávě.

1.9. **PROVEDENÍ ZKOUŠKY**1.9.1. **Zkušební podmínky**

Zkouška se provede v inkubační aparatuře (viz oddíl 1.8.1) s poměrem objemu vody a sedimentu 3:1 až 4:1 a vrstvou sedimentu 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm)⁽¹⁾. Doporučené minimální množství sedimentu na inkubační nádobu je 50 g (hmotnost sušiny).

Zkouška se provádí v temnu za konstantní teploty v rozmezí 10 až 30 °C. Vhodná je teplota 20 ± 2 °C. Podle potřeby lze případ od případu v závislosti na zaměření zkoušky zvolit jinou, nižší teplotu (např. 10 °C). Inkubační teplota se sleduje a uvede se ve zprávě.

⁽¹⁾ Z nedávných studií vyplývá, že skladování při 4 °C může vést k poklesu obsahu organického uhlíku v sedimentu, který by mohl případně vést k poklesu mikrobiální aktivity.

▼B**1.9.2. Úprava zkoušené látky a její aplikace**

Použije se jedna zkušební koncentrace chemické látky ⁽¹⁾. U přípravků na ochranu rostlin aplikovaných přímo do vodního tělesa se použije maximální dávkování uvedené na etiketě jako maximální aplikovaná dávka vypočtená podle plochy hladiny vody ve zkušební nádobě. Ve všech ostatních případech se použije koncentrace založená na odhadech emisí do životního prostředí. Je třeba spolehlivě zajistit, aby byla aplikována dostatečná koncentrace zkoušené látky pro charakterizaci postupu transformace a tvorby a odbourávání transformačních produktů. v situaci, kdy se koncentrace zkoušené látky na začátku studie blíží mezím detekce a/nebo kdy by nebylo možné detekovat hlavní transformační produkty, jsou-li přítomny v množství odpovídajícím 10 % výchozí aplikované dávky, může být nezbytné aplikovat vyšší dávky (např. desetkrát vyšší). Použité vyšší koncentrace však nesmí mít značně nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu vody/sedimentu. S cílem dosáhnout konstantní koncentrace v nádobách různých rozměrů může být nezbytné upravit množství použitého materiálu, přičemž se vychází z výšky vodního sloupce v nádobě v poměru k hloubce vody v odběrovém místě (předpokládá se hloubka 100 cm, možná je však i jiná hloubka). Příklad výpočtu je uveden v příloze 4.

V ideálním případě se zkoušená látka aplikuje do vodné fáze zkoušeného systému ve formě vodného roztoku. Je-li to nevyhnutelné, je přípustné použít pro aplikaci a rozptýlení zkoušené látky malé množství rozpouštědla mísitelného s vodou (např. acetonu nebo ethanolu), avšak jeho množství by nemělo překročit 1 % (obj.); rozpouštědlo by nemělo mít nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému. Přípravě vodného roztoku zkoušené látky je třeba věnovat pozornost a k zajištění naprosté homogenity může být vhodné použít generátorové kolony a předem připravené směsi. Po přidání vodného roztoku do zkušebního systému se doporučuje vodnou fázi mírně promíchat tak, aby se sediment zvířil co nejméně.

Použití komerčních úprav přípravků se v zásadě nedoporučuje, neboť složky přípravku mohou mít vliv na rozptýlení zkoušené látky a/nebo transformačních produktů mezi vodu a sediment. U špatně rozpustných zkoušených látek však může být použití komerční úpravy vhodnou možností.

Počet inkubačních nádob závisí na počtu intervalů, v nichž mají být prováděny odběry (viz oddíl 1.9.3). Je třeba nasadit dostatečný počet zkušebních systémů, aby bylo možné v každém intervalu vyhodnotit dva systémy. Použijí-li se pro každý systém voda/sediment kontrolní systémy, neexponují se zkoušené látce. Kontrolní systémy lze použít pro stanovení mikrobiální biomasy sedimentu a celkového organického uhlíku ve vodě na konci studie. Dva kontrolní systémy (tj. po jednom kontrolním systému z každého systému voda/sediment) mohou být použity pro sledování požadovaných parametrů v sedimentu a ve vodě v průběhu aklimatizace (viz tabulka v oddílu 1.8.2.2). Dva další kontrolní systémy musí být nasazeny za účelem měření nepříznivých účinků na mikrobiální aktivitu ve zkušebním systému v případě, že se zkoušená látka aplikuje pomocí rozpouštědla.

⁽¹⁾ Zkouška s druhou koncentrací může být užitečná u chemických látek, které se dostávají do vod různými cestami, a vykazují tedy významně odlišné koncentrace, pokud lze nižší koncentraci analyzovat s dostatečnou správností.

▼ B**1.9.3. Délka zkoušky a odběry vzorků**

Délka experimentu by neměla překročit 100 dnů (6) a experiment by měl trvat tak dlouho, dokud se nestanoví způsob rozkladu a rozptýlení ve vodě/sedimentu, nebo dokud se transformací a/nebo těkáním nevyčerpá 90 % zkoušené látky. Odběr by měl být proveden nejméně šestkrát za sebou (včetně času 0), přičemž vhodný režim odběrů a délka zkoušky se stanoví nepovinnou orientační studií (viz oddíl 1.9.4), nejsou-li k dispozici dostačující údaje o zkoušené látce z dřívějších studií. U hydrofobních zkoušených látek může být potřeba dodatečným vzorkováním v průběhu počáteční fáze studie zjistit stupeň rozptýlení mezi vodu a sediment.

V příslušnou dobu se k analýze odebere celý obsah inkubačních nádob (včetně duplikátních nádob). Sediment a voda nad sedimentem se analyzují zvlášť⁽¹⁾. Voda se za minimálního zviření sedimentu opatrně odebere. Vhodnými analytickými postupy se provedou extrakce a charakterizace zkoušené látky a transformačních produktů. Je třeba také pečlivě shromáždit materiál, který může být adsorbován na inkubační nádobě nebo ve spojovacích trubičkách použitých k zachycení těkavých látek.

1.9.4. Nepovinná orientační zkouška

Nelze-li délku a režim odběrů odhadnout z jiných relevantních studií zkoušené látky, může se provést předběžná zkouška za týchž zkušebních podmínek, jaké jsou navrženy pro hlavní studii. Příslušné podmínky a výsledky orientační zkoušky, pokud byla provedena, by měly být stručně uvedeny ve zprávě.

1.9.5. Měření a analýza

Pro každý jednotlivý odběr se provede měření koncentrace zkoušené látky a transformačních produktů ve vodě a v sedimentu a výsledky se uvedou ve zprávě (jako koncentrace a v procentech aplikovaného množství). V zásadě by měla být při každém odběru provedena identifikace transformačních produktů, které obsahují ≥ 10 % radioaktivity aplikované do celého systému voda/sediment, nejsou-li dostatečné důvody pro jiný postup. Měly by být také identifikovány transformační produkty, jejichž koncentrace se v průběhu studie nepřetržitě zvyšuje, třebaže nedosahuje výše uvedené meze, neboť to může znamenat, že se jedná o perzistentní produkty. Tento postup by měl být zvážen případ od případu a ve zprávě by měl být odůvodněn.

Pro každý jednotlivý odběr se uvedou výsledky ze systémů pro zachycování plynů/těkavých látek (CO₂ a jiných těkavých organických sloučenin). Uvede se rychlost mineralizace. Pro každý jednotlivý odběr se uvedou neextrahovatelná (vázaná) rezidua v sedimentu.

⁽¹⁾ Může-li snadno docházet k rychlé opětovné oxidaci produktů anaerobní transformace, měly by být během odběru a analýzy zachovány anaerobní podmínky.

▼ B**2. ÚDAJE****2.1. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ**

Pro každý jednotlivý odběr se vypočte celková látková bilance nebo výtěžnost (viz oddíl 1.7.1) přidané radioaktivity. Výsledky se uvedou v procentech přidané radioaktivity. Pro každý jednotlivý odběr se uvede rozptýlení radioaktivity mezi vodu a sediment (vyjádřeno v koncentracích a v procentech).

Pro zkoušenou látku se vypočítá poločas a hodnoty DT_{50} , případně hodnoty DT_{75} a DT_{90} a intervaly spolehlivosti těchto hodnot (viz oddíl 1.7.3). Vhodnými hodnoticími nástroji lze zjistit míru zániku zkoušené látky ve vodě a v sedimentu. Může jít o použití zdánlivé kinetiky prvního řádu, o techniky proložení empirické křivky za použití grafického nebo numerického řešení a o složitější hodnocení, např. pomocí modelu s jednou nebo více složkami. Další podrobné informace lze získat z příslušné publikované literatury (35, 36, 37).

Všechny přístupy mají své silné a slabé stránky a značně se liší z hlediska komplexnosti. Použití kinetiky prvního řádu může být sice přílišným zjednodušením procesu rozkladu a distribuce, vede však v ideálním případě k hodnotám (rychlostní konstantě nebo poločasu), které jsou snadno srozumitelné a mají význam pro simulační modelování a výpočet předpokládaných koncentrací v životním prostředí. Empirický přístup nebo lineární transformace mohou vést k lepšímu proložení dat křivkami, a tedy k lepšímu odhadu poločasů, hodnot DT_{50} , případně DT_{75} a DT_{90} . Použití odvozených konstant však má své meze. Složkové modely mohou poskytovat řadu užitečných konstant, které jsou důležité pro posouzení rizika a pro popis rozkladu chemické látky v různých složkách a pro její distribuci. Použijí se rovněž pro odhad rychlostních konstant tvorby a rozkladu hlavních transformačních produktů. v každém případě však musí být volba metody odůvodněna a experimentátor by měl graficky nebo statisticky prokázat její oprávněnost.

3. ZPRÁVY**3.1. PROTOKOL O ZKOUŠCE**

Protokol musí obsahovat následující informace:

Zkoušená látka:

— obecný název, chemický název, číslo CAS, strukturální vzorec (s uvedením polohy značícího nuklidu u látek značených radionuklidy) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti,

— čistota zkoušené látky (obsah nečistot),

— popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a molární aktivita.

▼ B

Referenční látky:

- chemický název a struktura referenčních látek použitých k charakterizaci a/nebo identifikaci transformačního produktu.

Zkušební sedimenty a vody:

- lokalita a popis místa/míst odběru sedimentu a vody, pokud možno včetně dřívější kontaminace,
- všechny informace týkající se odběru, případného skladování a aklimatizace systému voda/sediment,
- charakteristiky vzorků systému voda/sediment, jak jsou uvedeny v tabulce v oddílu 1.8.2.2.

Zkušební podmínky:

- použitý zkušební systém (např. průtokový systém, biometrický systém, způsob provzdušňování, míchání, objem vody, hmotnost sedimentu, tloušťka vrstvy vody i sedimentu, rozměry zkušebních nádob atd.),
- aplikace zkoušené látky do systému: použitá zkušební koncentrace, počet duplikátních vzorků a kontrol, způsob aplikace zkoušené látky (např. případné použití rozpouštědla) atd.,
- inkubační teplota,
- doby odběru,
- metody extrakce a účinnosti extrakce, analytické metody a meze detekce,
- metody charakterizace/identifikace transformačních produktů,
- odchylky od zkušebního postupu nebo zkušebních podmínek.

Výsledky:

- původní číselná data reprezentativních analýz (všechna původní data musí být uložena v archivu vedeném podle zásad správné laboratorní praxe),
- opakovatelnost a citlivost použitých analytických metod,
- hodnoty výtěžnosti (hodnoty v % pro platnou studii jsou uvedeny v oddíle 1.7.1),
- výsledky pro zkoušenou látku, popřípadě i pro transformační produkty a neextrahovatelnou radioaktivitu, zpracované v tabulkové formě a vyjádřené v % aplikované dávky a v mg/kg pro vodu, sediment a celý systém (pouze v %),
- látková bilance během studií na jejich konci,
- grafické schéma transformace ve vodě a sedimentu a v celém systému (včetně mineralizace),
- rychlosti mineralizace,

▼B

- poločas, hodnoty DT_{50} a popřípadě DT_{75} a DT_{90} pro zkoušenou látku, popřípadě i pro hlavní transformační produkty, včetně intervalů spolehlivosti, pro vodu, sediment a celý systém,
- charakteristika kinetiky transformace zkoušené látky, popřípadě i hlavních transformačních produktů,
- případný návrh způsobu transformace,
- diskuse o výsledcích.

4. **LITERATURA**

- 1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- 2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- 3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United Kingdom.
- 4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. 35–37.
- 5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162–3, Anaerobic aquatic metabolism.
- 6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. (ed. Dr. Mark R. Lynch.) SETAC-Europe, Brussels.
- 7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.
- 8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- 9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- 10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- 11) T. R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. *Pure Appl. Chem.* 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- 12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (přijato 12. května 1981).
- 13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C., Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149–158.

▼B

- 15) Guth, J. A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry* (ed. D. H. Hutson, T. R. Roberts), Vol. 1, 85–114. J. Wiley & Sons.
- 16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 631–637.
- 17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661–667.
- 18) Black, C. A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- 19) APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17. vyd.). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- 20) Rowell, D. L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*. Longman.
- 21) Light, T. S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chem.* 44, 1038–1039.
- 22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3.–4. června 1991.
- 23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8.–10. listopadu 1993. (ed. I. R. Hill, P. Matthiessen, F. Heimbach).
- 24) Vink, J. P. M., van der Zee, S. E. A. T. M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858–2868.
- 25) Vink, J. P. M., Schraa, G., van der Zee, S. E. A. T. M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* 329–338.
- 26) Anderson, T. H., Domsch, K. H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under in-situ conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197–203.
- 27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 28) Beelen, P. Van, F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13–21.
- 29) Shelton, D. R., Tiedje, J. M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850–857.
- 30) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere*, 19, 1527–1550.
- 31) Pagga, U., Beimbom, D. B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere*, 27, 1499–1509.

▼B

- 32) Nuck, B. A., Federle, T. W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597–3603.
- 33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- 34) Sijm, Haller, Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961–968.
- 35) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, 187–203.
- 36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, 47–60.
- 37) Carlton, R.R., Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, 1349–1354.

▼ B*DODATEK 1***POKYNY K AEROBNÍM A ANAEROBNÍM ZKUŠEBNÍM SYSTÉMŮM****Aerobní zkušební systém**

Aerobní zkušební systém popsáný v této zkušební metodě se skládá z aerobní vodní vrstvy (typická koncentrace kyslíku v rozmezí od 7 do 10 mg/l) a vrstvy sedimentu, která je na povrchu aerobní a pod povrchem anaerobní (typické průměrné oxidačně-redukční potenciály (E_h) v anaerobní zóně sedimentu jsou v rozmezí – 80 až – 190 mV). Nad vodní hladinu v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený vzduch, aby se v prostoru pod víčkem udržovala dostatečná koncentrace kyslíku.

Anaerobní zkušební systém

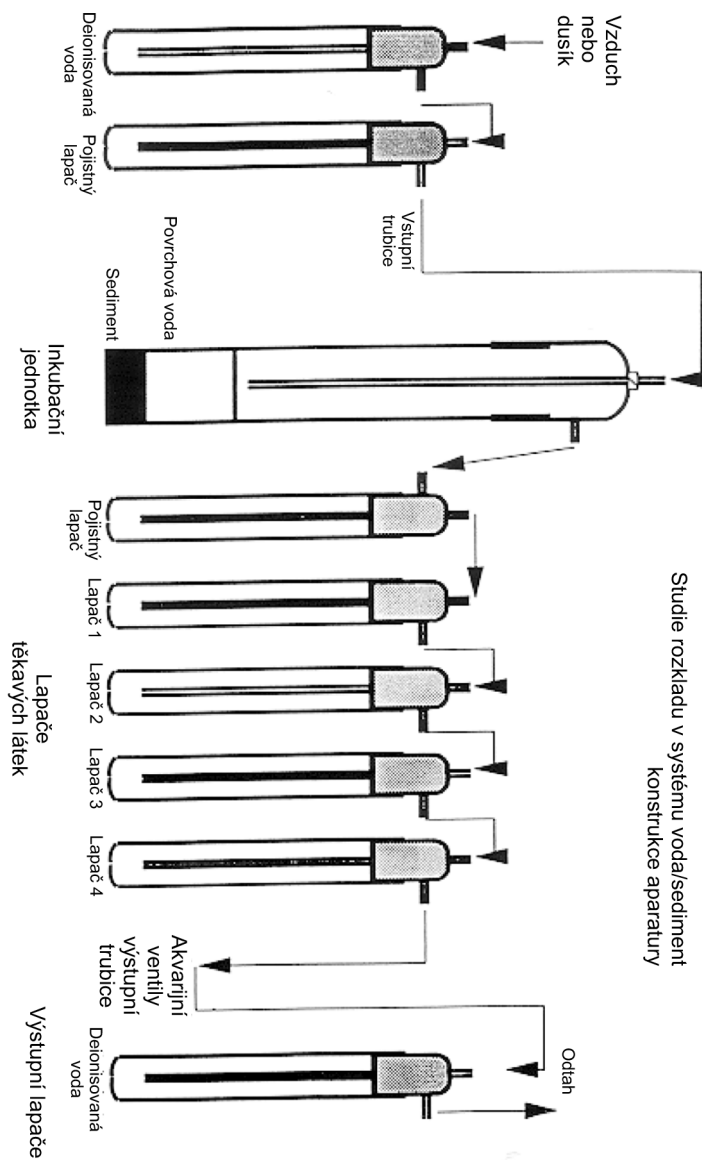
Pro anaerobní zkušební systém je zkušební postup v podstatě tentýž, jako postup popsáný pro aerobní systém, liší se však tím, že nad hladinu vody v každé inkubační jednotce se zavádí zvlhčený dusík, aby se udržovala jeho koncentrace v prostoru pod víčkem. Sediment a voda jsou považovány za anaerobní, pokud je oxidačně-redukční potenciál (E_h) nižší – 100 mV.

V anaerobní zkoušce se mineralizace posuzuje na základě měření uvolněného oxidu uhličitého a methanu.

▼B

DODATEK 2

PŘÍKLAD SKLENĚNÉ PRŮTOKOVÉ APARATURY



Pojistný lapač: prázdný

Lapač 1:
ethylenglykol pro zachycení organických těkavých látek

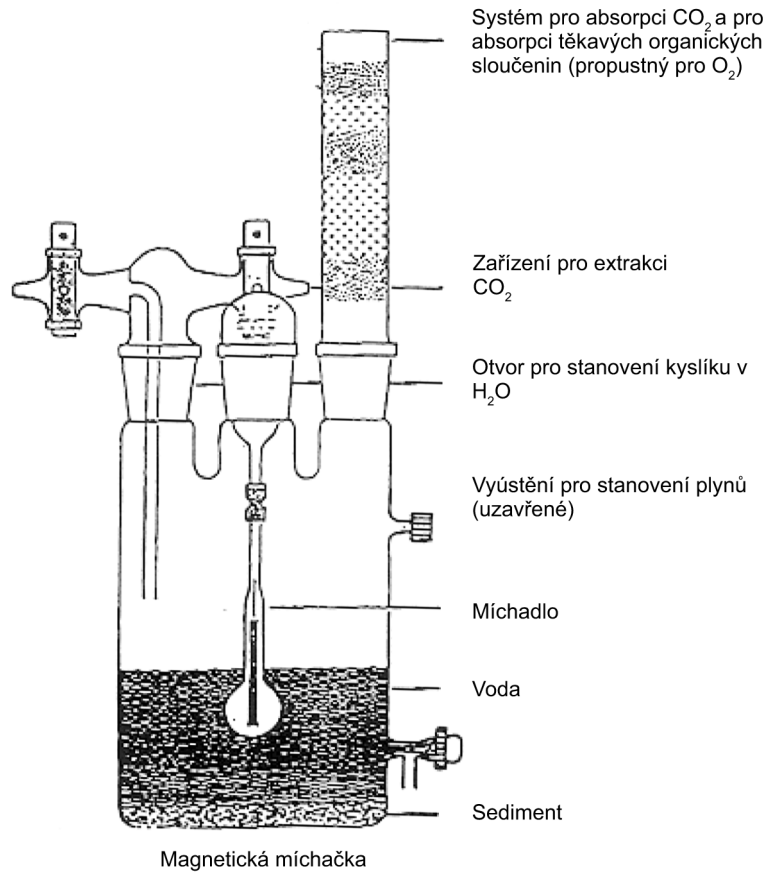
Lapač 2:
0,1 M kyselina sírová k zachycení alkalických těkavých látek

Lapače 3 a 4:
2 M hydroxid sodný k zachycení CO_2 jiných kyselých těkavých látek

▼ B

DODATEK 3

PŘÍKLAD BIOMETRICKÉ APARATURY



▼B*DODATEK 4***PŘÍKLAD VÝPOČTU DÁVKY APLIKOVANÉ DO ZKUŠEBNÍCH NÁDOB**

Vnitřní průměr válce:	= 8 cm
Výška vodního sloupce bez sedimentu:	= 12 cm
Plocha hladiny: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm ²
Dávkování: 500 g zkoušené látky na ha odpovídá 5 µg/cm ²	
Celkové množství v µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Přepočet celkového množství na hloubku 100 cm:	= 30,18 µg
$12 \times 251,5 \div 100$	
Objem vodního sloupce: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrace ve vodě: $30,18 \div 603$	= 0,050 µg/ml nebo 50 µg/l

▼ **M1****C.25 AEROBNÍ MINERALIZACE V POVRCHOVÉ VODĚ –
SIMULAČNÍ ZKOUŠKA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU****1. METODA**

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 309 (2004) (1).

1.1 ÚVOD

Cílem této zkoušky je změřit časový průběh biologického rozkladu zkoušené látky při nízké koncentraci v aerobní přírodní vodě a kvantifikovat pozorování ve formě výrazů pro kinetickou rychlost. Tato simulační zkouška je dávková zkouška v laboratorní třepací lahvi pro stanovení rychlostí aerobního biologického rozkladu organických látek ve vzorcích přírodní povrchové vody (sladkovodní, brakické nebo mořské). Je založena na ISO/DIS 14592-1 (2) a rovněž obsahuje prvky ze zkušebních metod C.23 a C.24 (3) (4). Volitelně při dlouhých zkušebních časech je dávkové zkoušení nahrazeno polospojitou zkouškou s cílem zabránit zhoršení zkušebního mikrokosmu. Základním cílem simulační zkoušky je určit mineralizaci zkoušené látky v povrchové vodě a mineralizace tvoří základnu pro vyjádření kinetiky rozkladu. Ovšem volitelným sekundárním cílem zkoušky je získat informace o primárním rozkladu a tvorbě významnějších transformačních produktů. Určení transformačních produktů, a bude-li to možné, kvantitativní stanovení jejich koncentrací jsou zvláště důležité pro látky, které jsou velmi pomale mineralizované (např. s poločasy pro celkový zbytkový ¹⁴C překračující 60 dnů). Pro určení a kvantitativní stanovení významnějších transformačních produktů by se vzhledem k analytickým omezením měly obvykle používat vyšší koncentrace zkoušené látky (např. > 100 µg/l).

Nízká koncentrace v této zkoušce znamená koncentraci (např. méně než 1 µg/l až 100 µg/l), která je dostatečně nízká na to, aby zajistila, že kinetika biologického rozkladu získaná ve zkoušce odráží kinetiku očekávanou v životním prostředí. V porovnání s celkovou hmotností biologicky rozložitelných uhlíkových substrátů dostupných v přírodní vodě používané pro zkoušku slouží zkoušená látka přítomná v nízké koncentraci jako sekundární substrát. To znamená, že očekávaná kinetika biologického rozkladu je prvního řádu („nerůstová“ kinetika) a že zkoušená látka může být rozkládána „spolumentabolismem“. Z kinetiky prvního řádu vyplývá, že rychlost rozkladu (mg/l/den) je přímo úměrná koncentraci substrátu, která s časem klesá. Při opravdové kinetice prvního řádu je specifická rychlostní konstanta rozkladu, k , nezávislá na času a koncentraci. To znamená, že k se znatelně nemění během doby experimentu a nemění se s rostoucí koncentrací během experimentů. Z definice je specifická rychlostní konstanta rozkladu rovna relativní změně koncentrace za čas: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Ačkoliv se za předepsaných podmínek normálně očekává kinetika prvního řádu, mohou nastat určité okolnosti, za kterých se projeví kinetiky jiných řádů. Odchyly od kinetiky prvního řádu lze pozorovat například tehdy, jestliže rychlost biologické transformace omezuje spíše než biologická reakční rychlost jev spojený s přenosem hmoty, například rychlost difuze. Ovšem údaje lze téměř vždy popsat kinetikou pseudoprvního řádu a přijmout rychlost závislou na koncentraci jako konstantní.

▼ **M1**

Informace o biologické rozložitelnosti zkoušené látky při vyšších koncentracích (např. ze standardních screeningových zkoušek) společně s informacemi o abiotické rozložitelnosti, transformačních produktech a relevantních fyzikálně-chemických vlastnostech by měly být dostupné před zkouškou jako pomůcka pro vypracování plánu experimentu a interpretaci výsledků. Použití zkoušených látek značených isotopem ^{14}C a stanovení fázové distribuce ^{14}C na konci zkoušky umožňuje stanovení úplné biologické rozložitelnosti. Při použití neznačené zkoušené látky lze úplný biologický rozklad pouze odhadovat, pokud se zkouší vyšší koncentrace a jsou známy všechny významnější transformační produkty.

1.2 DEFINICE

Primární biologický rozklad: strukturální změna (transformace) chemické látky působením mikroorganismů, která má za následek ztrátu chemické identity.

Funkční biologický rozklad: strukturální změna (transformace) chemické látky působením mikroorganismů, která má za následek ztrátu specifické vlastnosti.

Úplný aerobní biologický rozklad: rozložení chemické látky působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu a minerální soli jakýchkoli jiných přítomných prvků (mineralizace) a tvorba nové biomasy a organických mikrobiálních produktů biologické syntézy.

Mineralizace: rozložení chemické látky nebo organické hmoty působením mikroorganismů za přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu a minerální soli jakýchkoli jiných přítomných prvků.

Fáze iniciace: doba od počátku zkoušky do dosažení adaptace rozkládajících mikroorganismů a zvýšení stupně biologického rozkladu chemické látky nebo organické hmoty na detekovatelnou úroveň (např. 10 % maximálního teoretického biologického rozkladu nebo nižší v závislosti na přesnosti techniky měření).

Maximální úroveň biologického rozkladu: stupeň biologického rozkladu chemické látky nebo organické hmoty při zkoušce uváděný v procentech, při jehož překročení neprobíhá během zkoušky žádný další biologický rozklad.

Primární substrát: soubor přírodního uhlíku a zdrojů energie, který zajišťuje růst a udržování mikrobiální biomasy.

Sekundární substrát: substrátová složka přítomná v tak nízké koncentraci, že svými rozkladem dodává pouze nevýznamná množství uhlíku a energie kompetentním mikroorganismům v porovnání s uhlíkem a energií dodávanou rozkladem hlavních složek substrátu (primárních substrátů).

Rychlostní konstanta rozkladu: rychlostní konstanta kinetiky prvního nebo pseudoprvního řádu, k (d^{-1}), která ukazuje rychlost rozkladných procesů. U dávkového experimentu se k odhaduje z počáteční části rozkladové křivky získané po ukončení fáze iniciace.

▼ **M1**

Poločas, $t_{1/2}$ (d): termín používaný pro charakteristiku rychlosti reakce prvního řádu. Je to časový interval, který odpovídá poklesu koncentrace na polovinu. Poločas a rychlostní konstanta rozkladu jsou ve vzájemném vztahu vyjádřeném rovnicí $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Poločas rozkladu, DT_{50} (d): termín používaný pro kvantifikaci výsledků zkoušek biologického rozkladu. Je to časový interval včetně fáze iniciace potřebný k dosažení 50 % biologického rozkladu.

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ): Mez detekce (LOD) je koncentrace látky, pod níž nelze totožnost látky rozlišit od analytických artefaktů. Mez kvantifikace (LOQ) je koncentrace látky, pod níž nelze koncentraci určit s přijatelnou přesností.

Rozpuštěný organický uhlík (*dissolved organic carbon*, **DOC):** ta část organického uhlíku ve vzorku vody, kterou nelze odstranit stanovenou fázovou separací, například odstředováním po dobu 15 minut při zrychlení $40\,000\text{ ms}^{-2}$ nebo membránovou filtrací pomocí membrán s póry o průměru $0,2\ \mu\text{m}$ až $0,45\ \mu\text{m}$.

Celková aktivita organického ^{14}C (*total organic ^{14}C activity*, **TOA):** Celková aktivita ^{14}C spojená s organickým uhlíkem.

Aktivita rozpuštěného organického ^{14}C (*dissolved organic ^{14}C activity*, **DOA):** Celková aktivita ^{14}C spojená s rozpuštěným organickým uhlíkem.

Aktivita částicového organického ^{14}C (*particulate organic ^{14}C activity*, **POA):** Celková aktivita ^{14}C spojená s částicovým organickým uhlíkem.

1.3 POUŽITELNOST ZKOUŠEBNÍ METODY

Tato simulační zkouška je použitelná pro netěkavé nebo slabě těkavé organické látky zkoušené při nízkých koncentracích. Při použití baněk otevřených do atmosféry (např. se zátkou z vaty) lze látky s Henryho konstantou nižší než $1\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (přibližně $10^{-5}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) považovat za prakticky netěkavé. Při použití uzavřených baněk s dostatečným volným prostorem nad látkou je možné zkoušet mírně těkavé látky (s Henryho konstantami $< 100\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ nebo $< 10^{-3}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) beze ztrát ve zkušebním systému. Při odstraňování CO_2 může dojít ke ztrátám látek značených isotopem ^{14}C , pokud nejsou přijata správná předběžná opatření. V takových situacích může být nezbytné jímat CO_2 v interním absorbéru s alkálií nebo použít externí systém pro absorpci CO_2 (přímé stanovení $^{14}\text{CO}_2$, viz dodatek 3). Pro stanovení kinetiky biologického rozkladu musí být koncentrace zkoušené látky nižší než její rozpustnost ve vodě. Je však nutné uvést, že hodnoty rozpustnosti ve vodě uváděné v literatuře mohou být významně vyšší než rozpustnost zkoušené látky v přírodních vodách. Případně lze stanovit rozpustnost zkoušených látek se zvláště špatnou rozpustností ve vodě pomocí zkušebních přírodních vod.

Tuto metodu lze použít pro simulování biologického rozkladu v povrchové vodě bez hrubých částic („pelagická zkouška“) nebo ve zkalené povrchové vodě, která by například mohla existovat v blízkosti rozhraní voda/sediment („zkouška se suspendovanými sedimenty“).

▼ **M1**

1.4 PODSTATA ZKOUŠKY

Zkouška se provádí v dávce inkubací zkoušené látky buď pouze s povrchovou vodou („pelagická zkouška“), nebo povrchovou vodou doplněnou suspendovanými pevnými látkami/sedimenty o suché hmotnosti 0,01 až 1 g/l („zkouška se suspendovanými sedimenty“) pro simulaci vodní hmoty se suspendovanými pevnými látkami nebo resuspendovanými sedimenty. Koncentrace suspendovaných pevných látek/sedimentů v nižším rozmezí tohoto intervalu je typická pro většinu povrchových vod. Zkušební baňky se inkubují ve tmě za teploty okolí za aerobních podmínek a míchání. Pro stanovení kinetiky rozkladu je zapotřebí použít nejméně dvou odlišných koncentrací zkoušené látky. Koncentrace by se měly navzájem lišit faktorem 5 až 10 a měly by představovat očekávané rozmezí koncentrací v životním prostředí. Maximální koncentrace zkoušené látky by neměla překročit 100 µg/l, ale dává se přednost maximálním koncentracím nižším než 10 µg/l, aby se zajistilo, že biologický rozklad dodržuje kinetiku prvního řádu. Nejnižší koncentrace by neměla překročit 10 µg/l, ale dává se přednost nejnižším zkušebním koncentracím 1–2 µg/l nebo méně než 1 µg/l. Normálně lze odpovídající analýzy takové nízké koncentrace provést pomocí komerčně dostupných látek značených isotopem ¹⁴C. Kvůli analytickým omezením je často nemožné změřit koncentraci zkoušené látky s požadovanou přesností, pokud se zkoušená látka používá v koncentraci ≤ 100 µg/l (viz bod 1.7.2 druhý odstavec). Vyšší koncentrace zkoušené látky (> 100 µg/l a někdy > 1 mg/l) lze použít pro identifikaci a stanovení množství významnějších transformačních produktů, nebo není-li k dispozici specifická analytická metoda s nízkou mezí detekce. Jestliže se zkouší vysoké koncentrace zkoušené látky, nemusí být použiti výsledků pro odhad rozkladové konstanty prvního řádu a poločasu možné, protože rozklad pravděpodobně nebude probíhat podle kinetiky prvního řádu.

Rozklad je sledován v příslušných časových intervalech měřením zbytkového ¹⁴C nebo zbytkové koncentrace zkoušené látky při použití specifické chemické analýzy. Značení nejstabilnější části molekuly isotopem ¹⁴C zaručuje určení celkové mineralizace, zatímco značení méně stabilní části molekuly isotopem ¹⁴C společně s využitím specifické analýzy umožňuje hodnotit pouze primární biologický rozklad. Ovšem nejstabilnější část nemusí nutně obsahovat relevantní funkční část molekuly (kterou lze vztahovat ke konkrétní vlastnosti, například toxicitě, bioakumulaci atd.). V tomto případě může být vhodné použít zkoušenou látku, která je značena isotopem ¹⁴C, ve funkční části ke sledování eliminace konkrétní vlastnosti.

1.5 INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTKE

V této zkoušce lze použít jak zkoušené látky značené radioisotopy, tak látky neznačené. Doporučuje se metoda značení isotopem ¹⁴C, přičemž značena by obvykle měla být nejstabilnější část (části) molekuly (viz také bod 1.4). U látek obsahujících více než jeden aromatičtý kruh by se isotopem ¹⁴C měly nejlépe označit jeden či více uhlíků v každém kruhu. Dále by se isotopem ¹⁴C měl nejlépe označit jeden či více uhlíků na obou stranách snadno rozložitelných vazeb. Chemická a/nebo radiochemická čistota zkoušené látky by měla být > 95 %. U radioisotopově značených látek se dává přednost specifické aktivitě přibližně 50 µCi/mg (1,85 MBq) nebo více, aby se usnadnila měření ¹⁴C u zkoušek prováděných s nízkými počátečními koncentracemi. O zkoušené látce by měly být k dispozici následující informace:

▼ M1

- rozpustnost ve vodě (metoda A.6),
- rozpustnost v organickém(ých) rozpouštědle(ch) (látky používané s rozpouštědlem nebo s nízkou rozpustností ve vodě),
- disociační konstanta (pK_a), jestliže látka podléhá protonaci nebo deprotonaci (Pokyn OECD pro zkoušení 112) (5),
- tlak par (metoda A.4) a Henryho konstanta,
- chemická stálost ve vodě a ve tmě (hydrolyza) (metoda C.7).

Zkouší-li se v mořské vodě látky špatně rozpustné ve vodě, může být rovněž užitečné znát vysolovací konstantu (neboli „Sečenovovu konstantu“) K^s , která je definována výrazem: $\log(S/S') = K^s C_m$, kde S je rozpustnost látky ve sladké vodě a S' v mořské vodě, a C_m je molární koncentrace soli.

Jestliže se zkouška provádí jako „zkouška se suspendovanými sedimenty“, měly by být k dispozici rovněž následující informace:

- rozdělovací koeficient oktanol-1-ol/voda (metoda A.8),
- adsorpční koeficient (metoda C.18).

Mezi další užitečné informace patří:

- koncentrace v životním prostředí, je-li známá nebo odhadnutá,
- toxicita zkoušené látky pro mikroorganismy (metoda C.11),
- snadná a/nebo vlastní biologická rozložitelnost (metody C.4 A–F, C.12, C.9, Pokyn OECD pro zkoušení 302 (5)),
- aerobní nebo anaerobní biologická rozložitelnost v půdě a studie transformace v systémech voda/sediment (metody C.23, C.24).

1.6 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako referenční látka by se měla používat látka, která se za aerobních podmínek obvykle snadno rozkládá (např. anilin nebo benzoát sodný). Očekávaný časový interval pro rozklad anilinu a benzoátu sodného je obvykle méně než 2 týdny. Účelem referenčních látek je zajistit, aby byla mikrobiální aktivita zkušební vody v určitých mezích, tj., aby voda obsahovala aktivní mikrobiální populaci.

▼ **M1**

1.7 KRITÉRIA JAKOSTI

1.7.1 **Výtěžnost**

Bezprostředně po přidání zkoušené látky je třeba ověřit každou počáteční zkušební koncentrací měřením aktivity ^{14}C nebo – v případě neznačených látek – chemickými analýzami vždy nejméně v duplikátních vzorcích. Takto se získají informace o použitelnosti a opakovatelnosti analytické metody a o homogenitě distribuce zkoušené látky. V následných analýzách údajů se obvykle namísto nominální koncentrace použije spíše naměřená počáteční aktivita ^{14}C nebo koncentrace zkoušené látky, neboť se jejich použitím kompenzují ztráty způsobené sorpcí a chybami při dávkování. U zkoušené látky značené isotopem ^{14}C se hodnota výtěžnosti na konci experimentu udává pomocí hmotnostní bilance (viz bod 1.8.9.4 poslední odstavec). V ideálním případě by se hmotnostní bilance radioisotopově značené látky měla pohybovat od 90 % do 110 %, zatímco analytická přesnost by měla vést k počáteční výtěžnosti od 70 % do 110 % pro neznačené zkoušené látky. Tato rozmezí je zapotřebí vykládat jako cíle a neměla by se používat jako kritéria pro přijetí zkoušky. Případně lze analytickou přesnost stanovit pro zkoušenou látku při nižší koncentraci, než je koncentrace počáteční, a pro významnější transformační produkty.

1.7.2 **Opakovatelnost a citlivost analytické metody**

Opakovatelnost analytické metody (včetně účinnosti první extrakce) pro kvantitativní stanovení zkoušené látky a případně transformačních produktů by se měla ověřit pěti opakovanými analýzami jednotlivých extraktů povrchové vody.

Mez detekce (LOD) analytické metody pro zkoušenou látku a pro transformační produkty by měla být pokud možno alespoň 1 % počátečního množství použitého ve zkušebním systému. Mez kvantifikace (LOQ) by se měla rovnat nebo být menší než 10 % použité koncentrace. Chemické analýzy mnoha organických látek a jejich transformačních produktů často vyžadují, aby se zkoušená látka používala v relativně vysoké koncentraci, tj. > 100 $\mu\text{g/l}$.

1.8 POPIS ZKUŠEBNÍ METODY

1.8.1 **Vybavení**

Zkoušku lze provádět v Erlenmeyerových baňkách nebo válcových nádobách vhodné kapacity (např. 0,5 nebo 1,0 litru) uzavřených silikonovou nebo pryžovou zátkou nebo v baňkách na sérum s víky těsnícími proti úniku CO_2 (např. opatřené septou z butylové pryže). Další možností je provádět zkoušku pomocí více baněk a používat jako vzorek celý objem vždy nejméně dvou baněk v každém intervalu odběru vzorku (viz bod 1.8.9.1 poslední odstavec). Pro netěkavé zkoušené látky, které nejsou radioisotopově označeny, nejsou nutné plynotěsné zátky nebo víka; vhodné jsou volně vatové zátky, které brání kontaminaci ze vzduchu (viz bod 1.8.9.1 druhý odstavec). Lehce těkavé látky by měly být zkoušeny v systému biometrického typu s jemným mícháním povrchu vody. Aby se zajistilo, že nedojde k bakteriální kontaminaci, lze nádoby před použitím případně sterilizovat ohřevem nebo autoklávováním. Dále se používá toto standardní laboratorní vybavení:

— desková třepačka nebo magnetické míchačky pro nepřetržité míchání zkušebních baněk,

▼ M1

- odstředivka,
- pH-metr,
- turbidimetr pro nefelometrická měření turbidity (zákalu),
- pec nebo mikrovlnná pec pro stanovení suché hmotnosti,
- membránový filtrační přístroj,
- autokláv nebo pec pro tepelnou sterilizaci skleněného nádobí,
- zařízení pro manipulaci s látkami značenými isotopem ^{14}C ,
- zařízení pro kvantifikaci aktivity ^{14}C ve vzorcích z roztoků pro s jímáním CO_2 a, bude-li to nutné, ze vzorků sedimentů,
- analytické vybavení pro určení zkoušené (a referenční) látky, jestliže se použije specifická chemická analýza (např. plynový chromatograf, chromatograf pro vysokotlakou kapalinovou chromatografii).

1.8.2 Zásobní roztoky zkoušené látky

Pro přípravu zásobních roztoků zkoušených a referenčních látek se používá deionizovaná voda (viz bod 1.8.7 první odstavce). Deionizovaná voda by měla být zbavená látek, které mohou být toxické pro mikroorganismy a podíl rozpuštěného organického uhlíku (DOC) by neměl být vyšší než 1 mg/l (6).

1.8.3 Odběr a přeprava povrchové vody

Místo odběru povrchové vody by mělo být vybráno podle účelu zkoušky v dané situaci. Při výběru míst odběru musí být přihlédnuto k historii případných zemědělských, průmyslových nebo domácích vstupů. Jestliže je známo, že bylo vodní prostředí v předchozích čtyřech letech kontaminováno zkoušenou látkou nebo jejími strukturálními analogy, nemělo by se používat k odběru zkušební vody, s výjimkou případů, kdy je zkoumání rychlosti rozkladu v dříve exponovaných místech výslovným účelem zkoušejícího. V místě odběru by se měly změřit pH a teplota vody. Dále je třeba zaznamenat hloubku odběru a vzhled vzorku vody (např. barva a turbidita) (viz bod 3). Měly by se měřit koncentrace kyslíku a/nebo oxidačně-redukční potenciál ve vodě a v povrchové vrstvě sedimentu s cílem prokázat aerobní podmínky, s výjimkou případů, kdy je jejich existence patrná ze vzhledu a historické zkušenosti s daným místem. Povrchová voda by se měla přepravovat v důkladně vyčištěném zásobníku. Během přepravy by teplota vzorku neměla významně překračovat teplotu použitou při zkoušce. Doporučuje se chlazení na 4 °C, pokud trvání přepravy překračuje 2 až 3 hodiny. Vzorek vody se nesmí zmrazit.

▼ M1**1.8.4 Skladování a příprava povrchové vody**

Zkouška by měla být nejlépe zahájena do jednoho dne po odběru vzorku. Skladování vody, je-li nutné, by se mělo minimalizovat a nesmí v žádném případě překračovat maximální hranici 4 týdnů. Vzorek vody je zapotřebí skladovat až do použití při teplotě 4 °C za provzdušňování. Před použitím je třeba odstranit hrubé částice, např. filtrací přes nylonový filtr s velikostí ok okolo 100 µm nebo přes hrubý papírový filtr, případně sedimentací.

1.8.5 Příprava vody doplněné sedimentem (nepovinné)

Pro zkoušku se suspendovanými sedimenty se do baněk obsahujících přírodní vodu (přefiltrovanou za účelem odstranění hrubých částic, jak je popsáno v bodě 1.8.4) přidává povrchový sediment, aby vznikla suspenze; koncentrace suspendovaných pevných látek by měla být v rozmezí 0,01 až 1 g/l. Povrchový sediment by měl pocházet ze stejného místa, z něhož byl odebrán vzorek vody. V závislosti na konkrétním vodním prostředí může být povrchový sediment buď charakterizován vysokým obsahem organického uhlíku (2,5–7,5 %) a jemnou strukturou, nebo nízkým obsahem organického uhlíku (0,5–2,5 %) a hrubou strukturou (3). Povrchový sediment lze připravit následovně: odeberte několik jader sedimentu pomocí zkumavky z průhledného plastu, bezprostředně po odběru vzorku oddělte horní aerobní vrstvy (od povrchu do hloubky maximálně 5 mm) a smíste je. Výsledný vzorek sedimentu by měl být přepravován v zásobníku s velkým vzduchovým prostorem nad sedimentem, aby se sediment udržel za aerobních podmínek (chladit na 4 °C, jestliže doba přepravy překračuje 2 až 3 hodiny). Vzorek sedimentu by měl být suspendován ve zkušební vodě v poměru 1:10 a do použití skladován při teplotě 4 °C za provzdušňování. Skladování sedimentu, je-li nutné, by se mělo minimalizovat a nesmí v žádném případě překračovat maximální hranici 4 týdnů.

1.8.6 Polospojité postup (nepovinné)

Jestliže nastává dlouhá fáze iniciace před tím, než je možné měřit významný rozklad zkoušené látky, může být nezbytná prodloužená inkubace (několik měsíců). Pokud je tato skutečnost z předchozího zkoušení látky známa, zkoušku lze zahájit používáním polospojitého postupu, který umožňuje pravidelné obnovování části zkušební vody nebo suspenze (viz dodatek 2). Alternativně lze normální dávkovou zkoušku změnit na polospojitou zkoušku, pokud nebylo dosaženo rozkladu zkoušené látky přibližně během 60 dnů zkoušení s využitím dávkového postupu (viz bod 1.8.8.3 druhý odstavec).

1.8.7 Přidání zkoušené (nebo referenční) látky

U látek s vysokou rozpustností ve vodě (> 1 mg/l) a nízkou těkavostí (Henryho konstanta < 1 Pa·m³/mol nebo < 10⁻⁵ atm·m³/mol) lze připravit zásobní roztok v deionizované vodě (viz bod 1.8.2), vhodný objem zásobního roztoku se přidává do zkušebních nádob pro dosažení požadované koncentrace. Objem jakéhokoliv přidaného zásobního roztoku je třeba omezit na co nejnižší možnou míru (< 10 % konečného objemu kapaliny, je-li to možné). Dalším postupem, který lze považovat za alternativu pro používání organických rozpouštědel, je rozpustit zkoušenou látku ve větším objemu zkušební vody.

▼ **M1**

Je-li to nevyhnutelné, měly by se zásobní roztoky netěkavých látek se špatnou rozpustností ve vodě připravit za použití těkavého organického rozpouštědla, avšak množství rozpouštědla přidaného do zkušebního systému by nemělo překročit 1 % obj. a nemělo by mít nepříznivé účinky na mikrobiální aktivitu. Rozpouštědlo by nemělo ovlivňovat stálost zkoušené látky ve vodě. Rozpouštědlo by mělo být odstraněno na mimořádně malé množství tak, aby významně nezvyšovalo koncentraci DOC zkušební vody nebo suspenze. Toto je třeba zkontrolovat analýzou specifickou pro danou látku, nebo je-li to možné, analýzou DOC (6). Musí se vynaložit úsilí na omezení přenášeného rozpouštědla na absolutně nezbytné množství a zajistit, aby množství zkoušené látky bylo možné rozpustit v konečném objemu zkušební vody. Pro zavedení zkoušené látky do zkušebních nádob lze používat i další metody, které jsou popsány v literatuře (7) a (8). Používá-li se k aplikaci zkoušené látky organické rozpouštědlo, měly by se kontroly s rozpouštědlem obsahující zkušební vodu (bez přísad) a zkušební vodu s přidanou referenční látkou exponovat podobně jako aktivní zkušební nádoby doplněné zkoušenou látkou v nosném rozpouštědle. Cílem kontrol s rozpouštědlem je prozkoumat na základě rozkladu referenční látky možné nežádoucí účinky na mikrobiální populaci způsobené rozpouštědlem.

1.8.8 **Zkušební podmínky**1.8.8.1 *Zkušební teplota*

Inkubace by měla probíhat (nejlépe) v temnu nebo v difuzním světle při kontrolované (± 2 °C) teplotě, která může být teplotou terénu nebo standardní teplotou 20 až 25 °C. Teplotou terénu může být buď skutečná teplota vzorku v době odběru, nebo průměrná teplota terénu na místě odběru.

1.8.8.2 *Promíchávání*

Je nutné zajistit promíchávání nepřetržitým protřepáváním nebo mícháním, aby se částice a mikroorganismy udržovaly v suspenzi. Promíchávání rovněž umožňuje přenos kyslíku do kapaliny z volného prostoru nad kapalinou tak, aby bylo možné odpovídajícím způsobem udržovat aerobní podmínky. Umístěte baňky na deskovou třepačku (promíchávání přibližně při 100 ot/min) nebo použijte magnetické míchání. Promíchávání musí být nepřetržité. Třepání nebo míchání by však mělo být co nejjemnější, přičemž je třeba udržovat homogenní suspenzi.

1.8.8.3 *Doba trvání zkoušky*

Doba trvání zkoušky by obecně neměla překročit 60 dnů, pokud se nepoužije polospojité postup s pravidelným obnovováním zkušební suspenze (viz bod 1.8.6 a dodatek 2). Ovšem doba trvání může být u dávkové zkoušky prodloužena na maximálně 90 dnů, jestliže rozklad zkoušené látky začal během prvních 60 dnů. Rozklad se sleduje ve vhodných časových intervalech určováním zbytkové aktivity ^{14}C nebo uvolněného $^{14}\text{CO}_2$ (viz bod 1.8.9.4) a/nebo chemickou analýzou (bod 1.8.9.5). Doba inkubace musí být dostatečně dlouhá pro vyhodnocení procesu rozkladu. Rozsah rozkladu by měl nejlépe překročit 50 %; u pomalu rozložitelných látek musí být rozsah rozkladu dostatečný (obvykle větší než 20 % rozklad) k tomu, aby byl možný odhad kinetické rychlostní konstanty rozkladu.

▼ **M1**

Musí se provádět pravidelná měření pH a koncentrace kyslíku ve zkušebním systému, pokud nejsou k dispozici předchozí zkušenosti z podobných zkoušek se vzorky vody a sedimentů odebraných ze stejného místa, přičemž v takovém případě by tato měření nebyla potřebná. Za určitých podmínek by mohl metabolismus primárních substrátů při mnohem vyšších koncentracích ve vodě nebo v sedimentu vést k tak velkému uvolňování CO₂, a tak značnému vyčerpání kyslíku, že by to významně změnilo experimentální podmínky během zkoušky.

1.8.9 **Postup**1.8.9.1 *Příprava baněk pro pelagickou zkoušku*

Do zkušebních baněk se převede vhodný objem zkušební vody, a to až do přibližně jedné třetiny objemu baňky a ne méně než přibližně 100 ml. Jestliže se používá více baněk (umožňujících zkoušení na celém objemu baňky v každém čase odběru vzorku), je vhodný objem zkušební vody rovněž přibližně 100 ml, protože malé objemy vzorku mohou ovlivnit délku fáze iniciace. Zkoušená látka se přidá ze zásobního roztoku, jak je popsáno v bodech 1.8.2 a 1.8.7. Pro určení kinetiky rozkladu a výpočet kinetické rychlostní konstanty rozkladu by se měly použít nejméně dvě odlišné koncentrace zkoušené látky lišící se faktorem 5 až 10. Obě zvolené koncentrace by měly být nižší než 100 µg/l a nejlépe v rozmezí < 1–10 µg/l.

Baňky se uzavřou zátkami nebo víčky nepropustnými pro vzduch a CO₂. U netěkavých zkušebních chemických látek neznačených isotopem ¹⁴C jsou vhodné volné vatové zátky, které brání kontaminaci ze vzduchu (viz bod 1.8.1), pokud je ovšem o všech hlavních produktech rozkladu známo, že jsou netěkavé, a pokud se používá nepřímé stanovení CO₂ (viz dodatek 3).

Baňky se inkubují při zvolené teplotě (viz bod 1.8.8.1). Vzorky pro chemickou analýzu nebo měření ¹⁴C je třeba odebrat na počátku zkoušky (tj. předtím, než začne biologický rozklad; viz bod 1.7.1) a poté ve vhodných časových intervalech v průběhu zkoušky. Odběr vzorků lze provádět odběrem dílčích vzorků (např. 5 ml alikvotních objemů) z každého opakování nebo odběrem vždy celého objemu baňky v každém čase odběru vzorku. Mineralizace zkoušené látky může být určena buď přímo, nebo nepřímo (viz dodatek 3). Obvykle se vyžaduje minimálně pět bodů pro odběr vzorku během fáze rozkladu (tj. po ukončené fázi iniciace) s cílem odhadnout spolehlivou rychlostní konstantu, s výjimkou případů, kdy je možné odůvodnit, že u rychle rozložitelných látek jsou dostatečné tři body odběru vzorku. U látek, které nepodléhají rychlému rozkladu, lze snadno provést více měření během fáze rozkladu, a proto by se k odhadu *k* mělo používat více datových bodů. Pro odběr vzorků nelze uvést žádný pevný časový harmonogram, protože rychlost biologického rozkladu se v jednotlivých případech liší; ovšem doporučuje se odebírat vzorky jednou týdně, pokud je rozklad pomalý. Jestliže zkoušená látka podléhá rychlému rozkladu, odběr vzorků by se měl během prvních tří dnů provádět jednou denně a poté každý druhý nebo třetí den. Za určitých okolností, například u velmi rychle hydrolyzujících látek, může být nezbytné odebírat vzorky v hodinových intervalech. Doporučuje se, aby se před zkouškou provedla předběžná studie s cílem určit vhodné intervaly odběru vzorků. Pokud musí být vzorky k dispozici pro další specifickou analýzu, je užitečné odebrat více vzorků a poté na konci experimentu zvolit ty, které se mají analyzovat, v opačném pořadí, tj. poslední vzorky se analyzují první (viz bod 1.8.9.5 druhý odstavce, kde jsou pokyny ke stálosti vzorků během skladování).

▼ **M1**1.8.9.2 *Počet baněk a vzorků*

Nasad'te dostatečný počet zkušebních baněk v tomto rozsahu:

- zkušební baňky; nejméně dvojí baňky pro každou koncentraci zkoušené látky (nejlépe minimálně 3) nebo více zkušebních baněk pro každou koncentraci, jestliže se jako vzorek použije vždy celý objem baňky v každém čase odběru vzorků (označeno symbolem F_T),
- zkušební baňky pro výpočet hmotnostní bilance; nejméně dvojí baňky pro každou zkušební koncentraci (označeno symbolem F_M),
- slepé zkoušky, bez zkoušené látky; nejméně jedna zkušební baňka pro slepou zkoušku obsahující pouze zkušební vodu (označeno symbolem F_B),
- referenční kontrola; dvojí baňky s referenční látkou (např. anilinem nebo benzoátem sodným v koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$) (označeno symbolem F_C). Cílem referenční kontroly je potvrdit minimum mikrobiální aktivity. Je-li to výhodné, lze použít radioisotopově značenou referenční látku, a to i tehdy, je-li rozklad zkoušené látky sledován chemickými analýzami,
- sterilní kontrola; jedna nebo dvě baňky obsahující sterilizovanou zkušební vodu ke zkoumání možného abiotického rozkladu nebo jiného nebiologického odstranění zkoušené látky (označeno symbolem F_S). Biologickou aktivitu lze zastavit autoklávováním (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 minut) zkušební vody nebo přidáním toxické látky (např. azidu sodného (NaN_3) v množství 10–20 g/l , chloridu rtuťnatého (HgCl_2) v množství 100 mg/l nebo formalinu v množství 100 mg/l) nebo zářením gama. Použije-li se HgCl_2 , měl by se zneškodnit jako toxický odpad. U vody s velkým množstvím přidaného sedimentu se sterilních podmínek dosahuje nesnadno; v tomto případě se doporučuje opakované autoklávování (např. třikrát). Je třeba vzít v úvahu, že sorpční charakteristiky sedimentu se mohou autoklávováním pozměnit,
- kontroly s rozpouštědlem obsahující zkušební vodu a zkušební vodu s referenční látkou; dvojí baňky ošetřené stejným množstvím rozpouštědla a podrobené stejnému postupu jako v případě aplikace zkoušené látky. Cílem je zkoumat pomocí určení rozkladu referenční látky možné nežádoucí účinky rozpouštědla.

V plánu zkoušky by měl zkoušející vzít v úvahu relativní důležitost většího počtu opakování oproti zvýšenému počtu časů odběru vzorků. Přesný počet požadovaných baněk bude záviset na metodě použité pro měření rozkladu (viz bod 1.8.9.1 třetí odstavec, bod 1.8.9.4 a dodatek 3).

▼ M1

V každém čase odběru vzorku by se měly odebrat dva dílčí vzorky (např. 5 ml alikvotních objemů) z každé zkušební baňky. Jestliže se používá více baňek, aby bylo možné použít jako vzorek vždy celý objem baňky, v každém čase odběru vzorků by se měly odebrat minimálně dvě baňky (viz bod 1.8.9.1 první odstavec).

1.8.9.3 *Příprava baňek pro zkoušku se suspendovanými sedimenty [nepovinné]*

Přidejte do zkušebních nádob potřebná množství zkušební vody a případně sedimentu (viz bod 1.8.5). Příprava baňek pro zkoušku se suspendovanými sedimenty je stejná jako pro pelagickou zkoušku (viz body 1.8.9.1 a 1.8.9.2). Nejlépe použijte lahvičky na sérum nebo baňky podobných tvarů. Umístěte uzavřené baňky horizontálně do třepačky. Je zřejmé, že otevřené baňky pro netěkavé látky neznačené isotopem ^{14}C by se měly umístit do svislé polohy; v tomto případě se doporučuje magnetické míchání a používání magnetických tyčinek pokrytých sklem. Je-li to nezbytné, přivádějte do lahví vzduch, aby se udržely správné aerobní podmínky.

1.8.9.4 *Radiochemická stanovení*

Uvolněný $^{14}\text{CO}_2$ se měří nepřímo a přímo (viz dodatek 3). Nepřímo se $^{14}\text{CO}_2$ určuje jako rozdíl mezi počáteční aktivitou ^{14}C ve zkušební vodě nebo suspenzi a celkovou zbytkovou aktivitou v době odběru vzorku po okyselení vzorku na pH 2–3 a odvedení CO_2 . Odstraní se tak anorganický uhlík a naměřená zbytková aktivita se odvodí z organického materiálu. Nepřímé stanovení $^{14}\text{CO}_2$ by se nemělo používat, jestliže během transformace zkoušené látky vznikají významnější těkavé transformační produkty (viz dodatek 3). Je-li to možné, uvolňování $^{14}\text{CO}_2$ by se mělo měřit přímo (viz dodatek 3) v každém čase odběru vzorků v nejméně jedné zkušební baňce; tento postup umožňuje kontrolovat jak hmotnostní bilanci, tak proces biologického rozkladu, ale je omezen na zkoušky prováděné s uzavřenými baňkami.

Jestliže je uvolněný $^{14}\text{CO}_2$ během zkoušky měřen přímo, vyčlení se pro tento účel na počátku zkoušky více baňek. Přímé stanovení $^{14}\text{CO}_2$ se doporučuje tehdy, jestliže během transformace zkoušené látky vznikají významnější těkavé transformační produkty. V každém bodě měření se dodatečně zkušební baňky okyselí na pH 2 až 3 a $^{14}\text{CO}_2$ se jímá v interním či externím absorbéru (viz dodatek 3).

Případně lze koncentrace zkoušené látky značené isotopem ^{14}C a významnějších transformačních produktů stanovit radiochromatograficky (např. chromatografií na tenké vrstvě, RAD-TLC) nebo pomocí HPLC s radiochemickou detekcí.

Případně lze určit fázovou distribuci zbývající radioaktivity (viz dodatek 1) a zbytkovou zkoušenou látku a transformační produkty.

▼ M1

Na konci zkoušky by se měla určit hmotnostní bilance, a to přímým měřením $^{14}\text{CO}_2$ pomocí samostatných zkušebních baněk, z nichž se v průběhu zkoušky neodebírají žádné vzorky (viz dodatek 3).

1.8.9.5 *Specifická chemická analýza*

Jestliže je k dispozici citlivá specifická analytická metoda, lze primární biologický rozklad hodnotit měřením celkové zbytkové koncentrace zkoušené látky namísto využívání metod značení radioisotopem. Jestliže se použije zkoušená látka značená radioisotopem (pro měření celkové mineralizace), lze souběžně provádět specifické chemické analýzy s cílem získat užitečné dodatečné informace a ověřit postup. Specifické chemické analýzy lze rovněž použít pro měření transformačních produktů vzniklých během rozkladu zkoušené látky, přičemž se toto doporučuje u látek, které jsou mineralizovány s poločasem překračujícími 60 dnů. Měla by se změřit a v protokolu o zkoušce uvést koncentrace zkoušené látky a transformačních produktů v každém čase odběru vzorků (jako koncentrace a jako procentuální podíl použité koncentrace). Obecně je zapotřebí identifikovat transformační produkty zjištěné při $\geq 10\%$ použité koncentrace v jakoukoliv dobu odběru vzorku; v opačném případě je nutné přiměřeně odůvodnit, proč nebyly identifikovány. Transformační produkty, jejichž koncentrace během studie trvale rostou, by rovněž měly být určeny, a to i tehdy, pokud jejich koncentrace nepřekračuje shora uvedenou mez, neboť tyto transformační produkty mohou být známkou perzistentnosti. Analýzy transformačních produktů ve sterilních kontrolách by se měly vzít v potaz v případě, že se rychlá abiotická přeměna zkoušené látky (např. hydrolýza) považuje za možnou. Potřeba kvantitativního stanovení a identifikace transformačních produktů by se měla posuzovat případ od případu a odůvodnění by měla být uvedena v protokolu o zkoušce. Extrakční postupy s organickými rozpouštědly by se měly používat podle pokynů uvedených v příslušném analytickém postupu.

Všechny vzorky by se měly skladovat vzduchotěsně při teplotách od 2 do 4 °C, pokud se analýza provádí do 24 hodin (nejlépe). Při delším skladování je zapotřebí vzorky zmrazovat na teplotu nižší než -18 °C nebo je chemicky konzervovat. Okyselení jako metoda pro konzervaci vzorků se nedoporučuje, protože okyselené vzorky mohou být nestálé. Jestliže se vzorky neanalyzují do 24 hodin a jsou-li skladovány po delší dobu, je zapotřebí provést studii stability při skladování, aby se prokázala stálost dotčených chemických látek při teplotách skladování nižších než -18 °C nebo při konzervaci. Jestliže analytická metoda vyžaduje extrakci rozpouštědla nebo extrakci tuhé fáze (SPE), je třeba provést tuto extrakci bezprostředně po odběru vzorků nebo po skladování vzorku v chlazeném stavu po dobu maximálně 24 hodin.

V závislosti na citlivosti analytické metody mohou být nezbytné větší objemy vzorků než objemy uvedené v bodě 1.8.1. Zkoušku lze snadno provést při zkušebních objemech jeden litr v baňkách o objemu 2 až 3 litry, což umožňuje odebírat vzorky o objemu přibližně 100 ml.

▼ **M1****2. DATA A ZPRÁVY****2.1 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ****2.1.1 Vynášení dat**

Časy odběru vzorku se zaokrouhlí na celé hodiny (s výjimkou případů, kdy se látka významně rozkládá v řádu minut až hodin), ne však na celé dny. Odhady zbytkové aktivity zkoušené látky (pro látky značené isotopem ^{14}C) nebo zbytkové koncentrace (pro neznačené látky) se vynesou proti času jak v lineárním, tak v semilogaritmickém tvaru (viz obrázky 1a a 1b). Jestliže došlo k rozkladu, výsledky z baněk F_T je třeba porovnat s výsledky z baněk F_S . Jestliže se střední hodnoty výsledků z baněk se zkoušenou látkou (F_T) a sterilních baněk (F_S) odchylní o méně než 10 %, lze předpokládat, že pozorovaný rozklad je převážně abiotický. Jestliže je rozklad v bankách F_S nižší, lze hodnoty použít pro korekci hodnot získaných pomocí baněk F_T (odečtením), odhadnout tak rozsah biologického rozkladu. Provádí-li se nepovinné analýzy významnějších transformačních produktů, je zapotřebí získat kromě grafického znázornění úbytku zkoušené látky také grafické znázornění jejich tvorby a úbytku.

Trvání fáze iniciace t_L se odhadne z křivky rozkladu (semilogaritmický graf) extrapolací její lineární části na nulový rozklad nebo případně určením doby přibližně 10 % rozkladu (viz obrázky 1a a 1b). Ze semilogaritmického grafu se odhadne rychlostní konstanta prvního řádu, k , a její standardní chyba lineární regrese \ln (zbytková aktivita ^{14}C nebo koncentrace zkoušené látky) ve vztahu k času. Zejména při měřeních ^{14}C je nutné používat pouze údaje patřící do počáteční lineární části křivky po ukončení fáze iniciace a dávat přednost výběru spíše malého počtu reprezentativních údajů před výběrem velkého počtu více nejistých dat. Nejistota zde zahrnuje chyby vlastní doporučenému přímému použití naměřených zbytkových aktivit ^{14}C (viz dále). Někdy může být důležité vypočítat dvě odlišné rychlostní konstanty, pokud rozklad postupuje ve dvou fázích. Za tímto účelem se definují dvě odlišné fáze rozkladové křivky. Rychlostní konstanta, k , a poločas, $t_{1/2} = \ln 2/k$, by se měly vypočítat pro každou z jednotlivých baněk k opakování, pokud se odebírají dílčí vzorky ze stejné baňky, nebo pomocí průměrných hodnot, pokud se použije jako vzorek celý objem baňky v každé době odběru vzorku (viz bod 1.8.9.2 poslední odstavce). Použije-li se první uvedený postup, je třeba v protokolu o zkoušce uvést rychlostní konstantu a poločas pro každou z jednotlivých baněk k opakování a vyjádřit je rovněž jako průměrnou hodnotu se standardní chybou. Jestliže se používaly vysoké koncentrace zkoušené látky, křivka rozkladu se může značně odchylovat od přímky (semilogaritmický graf) a kinetika prvního řádu nemusí platit. Definování poločasu proto nemá žádným smysl. Ovšem při omezeném rozpětí dat lze použít kinetiku pseudoprvního řádu a poločas rozkladu DT_{50} (čas pro dosažení 50 % rozkladu) odhadnout. Je však třeba mít na paměti, že časový průběh rozkladu nad zvolené datové rozpětí nelze předpovídat pomocí parametru DT_{50} , který slouží pouze k popisu dané datové množiny. Analytické nástroje pro usnadnění statistických výpočtů a sestavení křivky jsou snadno dostupné a doporučuje se používat software tohoto typu.

▼ **M1**

Jestliže se provádí specifické chemické analýzy, je třeba odhadnout rychlostní konstanty a poločasy primárního rozkladu, jak je shora uvedeno pro celkovou mineralizaci. Jestliže je limitujícím procesem primární rozklad, lze někdy použít datové body z celého průběhu rozkladu. Je to proto, že měření jsou přímá, na rozdíl od měření aktivity ^{14}C .

Jestliže se použijí látky značené isotopem ^{14}C , hmotnostní bilance by měla být vyjádřena v procentech použité počáteční koncentrace nejméně na konci zkoušky.

2.1.2 **Zbytková aktivita**

Při biologickém rozkladu té části organické látky, která je značená isotopem ^{14}C , se hlavní část ^{14}C přemění na $^{14}\text{CO}_2$, zatímco další část se využije pro růst biomasy a/nebo syntézu mimobuněčných metabolitů. Proto zcela „úplný“ biologický rozklad látky nedává 100 % přeměnu jejího uhlíku na $^{14}\text{CO}_2$. Isotop ^{14}C zabudovaný do produktů vytvářených biologickou syntézou se následně v důsledku „sekundární mineralizace“ pomalu uvolňuje jako $^{14}\text{CO}_2$. Z těchto důvodů vykazují grafy zbytkové aktivity organického ^{14}C (měřeno po odstranění CO_2) nebo vzniklého $^{14}\text{CO}_2$ v závislosti na čase i po dokončení rozkladu „chvostování“. Tím se komplikuje kinetická interpretace dat, a proto je k odhadu rychlostní konstanty rozkladu zapotřebí obvykle používat pouze počáteční část křivky (po skončení fáze iniciace a před dosažením přibližně 50 % rozkladu). Při rozkladu zkoušené látky je celková zbytková aktivita organického ^{14}C vždy vyšší než aktivita ^{14}C spojená se zbývající nedotčenou zkoušenou látkou. Jestliže se zkoušená látka rozkládá reakcí prvního řádu a konstantní frakce α se mineralizuje na CO_2 , počáteční sklon křivky úbytku ^{14}C (celkový organický ^{14}C vzhledem k času) bude α -násobkem sklonu příslušné křivky koncentrace zkoušené látky (nebo přesněji řečeno té části zkoušené látky, která je značená isotopem ^{14}C). Při použití nekorigovaného měření celkové aktivity organického ^{14}C bude proto vypočítaná rychlostní konstanta rozkladu konzervativní. V literatuře (2) (9) (10) (11) byly popsány postupy pro odhad koncentrací zkoušené látky z naměřených radiochemických aktivit na základě různých zjednodušujících předpokladů. Takové postupy se nejnáze používají u rychle rozložitelných látek.

2.2 **INTERPRETACE VÝSLEDKŮ**

Jestliže se zjistí, že k nezávisí na rostoucí koncentraci (tj. pokud je vypočítaná konstanta k přibližně stejná při různých koncentracích zkoušené látky), lze předpokládat, že rychlostní konstanta prvního řádu je reprezentativní pro použité zkušební podmínky, tj. pro zkoušenou látku, vzorek vody a zkušební teplotu. Odborníci musí vyhodnotit, do jaké míry lze výsledky generalizovat či extrapolovat na jiné systémy. Jestliže se zkoušená látka použije ve vysoké koncentraci, a rozklad proto neprobíhá podle kinetiky prvního řádu, nelze data použít pro přímý odhad rychlostní konstanty prvního řádu nebo odpovídajícího poločasu. Ovšem data odvozená ze zkoušky s vysokou koncentrací zkoušené látky mohou být přesto použitelná pro odhad stupně celkové mineralizace a/nebo pro detekci a kvantifikaci transformačních produktů.

▼ **M1**

Jestliže jsou známy rychlosti jiných ztrátových procesů než biologického rozkladu (například hydrolýza nebo těkání), mohou být odečteny od čisté ztrátové rychlosti pozorované během zkoušky, čímž se získá přibližný odhad rychlosti biologického rozkladu. Údaje o hydrolýze mohou být například získány ze sterilní kontroly nebo ze souběžného zkoušení pomocí vyšší koncentrace zkoušené látky.

Nepřímé a přímé stanovení $^{14}\text{CO}_2$ (bod 1.8.9.4 a dodatek 3) lze použít pouze pro měření rozsahu mineralizace zkoušené látky na CO_2 . K analýze koncentrací zkoušené látky značené izotopem ^{14}C a tvorby významnějších transformačních produktů lze použít radiochromatografii (RAD-TLC) nebo HPLC (bod 1.8.9.4 třetí odstavec). Aby byl možný přímý odhad poločasu, je nezbytné, aby nebyly přítomny žádné významnější transformační produkty (definované jako ≥ 10 % použitého množství zkoušené látky). Jestliže jsou přítomny významnější transformační produkty odpovídající této definici, požaduje se podrobné hodnocení dat. To může zahrnovat opakované zkoušení a/nebo identifikaci transformačních produktů (viz bod 1.8.9.5 první odstavec), pokud nelze osud transformačních produktů přiměřeně vyhodnotit na základě zkušenosti (např. informace o cestě rozkladu). Protože se poměr uhlíku zkoušené látky přeměněného na CO_2 mění (do velké míry závisí na koncentraci zkoušené látky a dalších dostupných substrátech, na zkušebních podmínkách a mikrobiálním společenství), tato zkouška nedovoluje přímý odhad úplného biologického rozkladu, jako tomu je u zkoušky na úbytek rozpuštěného organického uhlíku (DOC); výsledek je však podobný výsledku získanému zkouškou respirometrií. Stupeň mineralizace tak bude rovný minimální úrovni úplného biologického rozkladu nebo bude nižší. Pro získání ucelenějšího obrazu úplného biologického rozkladu (mineralizace a zabudování do biomasy) by se měla analýza fázové distribuce ^{14}C provádět na konci zkoušky (viz dodatek 1). ^{14}C obsažený v souboru částic bude obsahovat ^{14}C zabudovaný do bakteriální biomasy a ^{14}C sorbovaný do organických částic.

2.3 VALIDITA ZKOUŠKY

Jestliže se referenční látka nerozloží během očekávaného časového intervalu (u anilinu a benzoátu sodného je to obvykle méně než dva týdny), validita zkoušky je zpochybněna a musí být dále ověřena, případně by se zkouška měla opakovat s novým vzorkem vody. V kroužkové zkoušce této metody pořádané ISO, které se účastnilo sedm laboratoří z celé Evropy, se upravené rychlostní konstanty rozkladu pro anilin pohybovaly od 0,3 do 1,7 dne^{-1} s průměrem 0,8 d^{-1} při teplotě 20 °C a standardní chybě $\pm 0,4 \text{ d}^{-1}$ ($t_{1/2} = 0,9$ dne). Typické fáze iniciace trvaly 1 až 7 dnů. Ve zkoumaných vodách byla uváděna bakteriální biomasa odpovídající 10^3 až 10^4 jednotek tvořících kolonie (CFU) na ml. Rychlosti rozkladu ve střeoevropských vodách bohatých na živiny byly vyšší než ve skandinávských oligotrofních vodách, což může být způsobeno odlišným trofickým stavem nebo expozicí chemickým látkám.

Celková výtěžnost (hmotnostní bilance) na konci experimentu by měl být v rozmezí 90 % až 110 % pro radioisotopově značené látky, zatímco počáteční výtěžnost na počátku experimentu by se měla pohybovat v rozmezí 70 % až 110 % pro neznačené látky. Ovšem tato rozmezí je zapotřebí vykládat pouze jako cílová a neměla by se používat jako kritéria pro přijetí zkoušky.

▼ **M1**3. **PROTOKOL O ZKOUŠCE**

V protokolu o zkoušce, který bude rovněž obsahovat nejméně následující informace, musí být jasně uveden typ studie, tj. pelagická nebo zkouška se suspendovanými sedimenty:

Zkoušená látka a referenční látka(y):

- obecné názvy, chemické názvy (doporučují se názvy podle IUPAC a/nebo CAS), čísla CAS, strukturální vzorce (uvádějící polohu ^{14}C , pokud se použije radioisotopově značená látka) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti zkoušené a referenční látky (viz body 1.5 a 1.6),
- chemické názvy, čísla CAS, strukturální vzorce (uvádějící polohu ^{14}C , pokud se použije radioisotopově značená látka) a relevantní fyzikálně-chemické vlastnosti látek použitých jako standardy k identifikaci a kvantifikaci transformačních produktů,
- čistota zkoušené a referenční látky (obsah nečistot),
- popřípadě radiochemická čistota značené chemické látky a specifická aktivita.

Povrchová voda:

O vzorku vody musí být poskytnuty tyto minimální informace:

- lokalita a popis místa odběru vzorku, pokud možno včetně dřívější kontaminace,
- datum a čas odběru vzorku,
- živiny (celkový obsah N, amonia, dusitanů, dusičnanů, celkový fosfor, rozpuštěný orthofosforečnan),
- hloubka odběru,
- vzhled vzorku (např. barva a turbidita),
- DOC a TOC,
- BOD,
- teplota a pH v místě a době odběru,
- kyslík nebo oxidačně-redukční potenciál (povinné pouze v případě, že nejsou zřejmé aerobní podmínky),
- slanost nebo vodivost (v případě mořské vody a brakické vody),
- suspendované pevné látky (v případě zakaleného vzorku),
- podle možnosti další významné informace o lokalitě odběru vzorku v době jeho odběru (např. aktuální či dřívější údaje o průtoku řek nebo mořských proudech v blízkosti hlavních výpustí a typ výpustí, meteorologické podmínky předcházející době odběru vzorku),

a nepovinně:

- mikrobiální biomasa (např. AODC (přímé počítání za použití akridinové oranže) nebo jednotky tvořící kolonie),

▼ M1

- anorganický uhlík,
- koncentrace chlorofylu *a* jakožto specifický odhad biomasy řas.

Dále by se měly poskytovat následující informace o sedimentu, pokud se provádí zkouška se suspendovanými sedimenty:

- hloubka odběru sedimentu,
- vzhled sedimentu (například barevný, blátivý, bahnitý nebo písečný),
- struktura (např. % hrubého písku, jemného písku, bahna a jílu),
- suchá hmotnost v g/l suspendovaných pevných látek, koncentrace TOC nebo hmotnostní ztráta při vznícení jako měřítko obsahu organické hmoty,
- pH,
- kyslíkový nebo oxidačně-redukční potenciál (povinné pouze v případě, že nejsou zřejmé aerobní podmínky).

Zkušební podmínky:

- zpoždění mezi odběrem a použitím v laboratorní zkoušce, skladování vzorků a předúprava vzorku, data provádění studií,
- množství použité zkoušené látky, zkušební koncentrace a referenční látka,
- metoda aplikace zkoušené látky včetně použití rozpouštědel,
- objem použité povrchové vody a sedimentu (používá-li se) a objem vzorků odebraných v každém intervalu pro analýzu,
- popis použitého zkušebního systému,

jestliže zkouška nemusí být prováděna v temnu, informace o podmínkách „difuzního světla“,

- informace o použité metodě nebo metodách k vytvoření sterilních kontrol (např. teplota, čas a počet autoklávování),
- inkubační teplota,
- informace o analytických technikách a metodě nebo metodách použitých pro radiochemická měření a pro kontrolu hmotnostní bilance a měření fázové distribuce (provádí-li se),
- počet opakování.

Výsledky:

- výtěžnost v procentech (viz bod 1.7.1),
- opakovatelnost a citlivost používaných analytických metod včetně meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ) (viz bod 1.7.2),

▼ M1

- všechna naměřená data (včetně časových bodů odběru vzorků) a vypočítané hodnoty v tabulkové formě a křivky rozkladu; pro každou zkušební koncentraci a pro každou baňku k opakování je nutné v protokolu o zkoušce uvést lineární korelační koeficient pro sklon logaritmického grafu, odhadovanou fázi iniciace a rychlostní konstantu prvního řádu nebo pseudoprvního řádu (je-li to možné) a odpovídající poločas rozkladu (nebo doba poločasu t_{50}),
- v protokolu o zkoušce zaznamenejte relevantní hodnoty jako průměry výsledků zjištěných u jednotlivých opakování, např. délka fáze iniciace, rychlostní konstanta rozkladu a poločas rozkladu (nebo t_{50}),
- na základě vzhledu křivky rozkladu a možného vlivu zkušební koncentrace je třeba systém kategorizovat buď jako nepřizpůsobený, nebo přizpůsobený,
- výsledky kontroly konečné hmotnostní bilance a výsledky měření pro stanovení fázových distribucí (jsou-li k dispozici),
- podíl mineralizovaného ^{14}C , a použijí-li se specifické analýzy, konečná úroveň primárního rozkladu,
- případně identifikace, molární koncentrace a procentuální podíl aplikovaných významnějších transformačních produktů (viz bod 1.8.9.5 první odstavce),
- případně navrhovaná cesta transformace,
- diskuse výsledků.

4. LITERATURA

- (1) OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.
- (2) ISO/DIS 14592–1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.
- (3) Zkušební metoda C.23 Aerobní a anaerobní transformace v půdě.
- (4) Zkušební metoda C.24 Aerobní a anaerobní transformace v systémech voda/sediment.
- (5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.
- (6) ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).
- (7) ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.
- (8) OECD, předloha (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (předpokládané zveřejnění v létě roku 2000).

▼ M1

- (9) Simkins, S., Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 394–401.
- (10) Ingerslev, F., Nyholm, N. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ¹⁴C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 274–283.
- (11) ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼ **M1***Dodatek 1***Fázová distribuce ^{14}C**

Pro kontrolu postupu je zapotřebí doplnit rutinní měření zbytkové celkové aktivity organického ^{14}C (TOA) měřeními hmotnostní bilance zahrnující přímé stanovení uvolněného $^{14}\text{CO}_2$ po jímání v absorbéru (viz dodatek 3). Sama o sobě je pozitivní tvorba $^{14}\text{CO}_2$ přímým důkazem o biologickém rozkladu, na rozdíl od abiotického rozkladu nebo jiných ztrátových mechanismů, jakými jsou těkání a sorpce. Dodatečné užitečné informace charakterizující chování při biologické rozložitelnosti lze získat z měření distribuce TOA mezi rozpuštěným stavem (aktivita rozpuštěného organického ^{14}C , DOA) a částicovým stavem (aktivita částicového organického ^{14}C , POA) po separaci částic membránovou filtrací nebo odstřediváním. POA obsahuje zkoušenou látku sorbovanou na mikrobiální biomasu a na další částice a dále z uhlíku zkoušené látky, který byl použit k syntéze nového buněčného materiálu, a tím začleněn do frakce částicové biomasy. Tvorbu rozpuštěného organického materiálu s ^{14}C lze odhadnout jako DOA na konci biologického rozkladu (platí na křivce závislosti rozkladu na čase).

Fázová distribuce zbytkového ^{14}C ve zvolených vzorcích se odhadne filtrováním vzorků na membránovém filtru s velikostí pórů 0,22 μm nebo 0,45 μm a z materiálu, který neabsorbuje významná množství zkoušené látky (vhodné mohou být polykarbonátové filtry). Jestliže sorpce zkoušené látky na filtr není zanedbatelně nízká (tuto skutečnost je nutné ověřit před experimentem), lze použít místo filtrace vysokorychlostní odstředivání (2 000 g, 10 minut).

Dále je třeba s filtrem či centrifugátem pracovat tak, jak je uvedeno v dodatku 3 pro nefiltrované vzorky. Membránové filtry se rozpustí ve vhodné scintilační kapalině a počítá se jako obvykle, obecně pouze za použití metody externího standardního poměru pro korekci na zhášení, nebo se použije oxidační činidlo na vzorek. Pokud bylo použito odstředivání, vytvořené pelety částicové frakce se resuspendují v 1–2 ml destilované vody a převedou se do scintilační lahvičky. Následně se provedou dvě promytí pomocí 1 ml destilované vody a promývací voda se převede do lahvičky. V případě potřeby lze suspenzi ukotvit do gelu za účelem počítání scintilací v roztoku.

▼ **M1***Dodatek 2***Polospojité postup**

Pro dosažení významného rozkladu obtížně rozložitelných látek může být vyžadována prodloužená inkubace až po několik měsíců. Doba trvání zkoušky by obecně neměla překročit 60 dnů, pokud nebudou zachovány charakteristiky původního vzorku vody obnovením zkušební suspenze. Ovšem doba trvání zkoušky může být prodloužena na maximálně 90 dnů bez obnovení zkušební suspenze, jestliže rozklad zkoušené látky začal během prvních 60 dnů.

Během inkubace po dlouhá období může být různorodost mikrobiální komunity snížena v důsledku různých ztrátových mechanismů a možného vyčerpání významných živin a primárních uhlíkových substrátů ze vzorku vody. Proto se doporučuje, aby se pro adekvátní určení rychlosti rozkladu pomalu se rozkládajících látek používala polospojité zkouška. Zkouška by se měla zahájit použitím polospojitého postupu, pokud se na základě předchozí zkušenosti očekává, že pro dosažení 20 % rozkladu látky je nezbytná inkubační doba tří měsíců. Alternativně lze normální dávkovou zkoušku změnit na polospojitou zkoušku, pokud nebylo dosaženo rozkladu zkoušené látky přibližně během 60 dnů zkoušení s využitím dávkového postupu. Polospojité postup lze zastavit a ve zkoušce pokračovat jakožto v dávkovém experimentu, když je zaznamenán významný rozklad (např. > 20 %).

Při polospojité zkoušce se každé dva týdny nahrazuje přibližně jedna třetina objemu zkušební suspenze čerstvě odebranou vodou, do níž byla přidána zkoušená látka v počáteční koncentraci. Podobně se do vody, která má být použita k obnovení, přidá sediment v počáteční koncentraci (mezi 0,01 a 1 g/l), pokud se provádí nepovinná zkouška se suspendovanými sedimenty. Při provádění zkoušky se suspendovanými částicemi sedimentu je důležité, aby byl plně suspendovaný systém zachován také během obnovování vody a aby doba zdržení byla shodná pro pevné látky a vodu, protože jinak se může ztratit zamýšlená podobnost s homogenním vodním systémem bez zakotvených fází. Z těchto důvodů se při použití polospojitého postupu dává přednost počáteční koncentraci suspendovaných sedimentů s nižším rozpětím stanoveného intervalu.

U předepsaného přídatku zkoušené látky se předpokládá, že počáteční koncentrace zkoušené látky není překročena částečným obnovením zkušební suspenze, a proto se zabrání přízpusobení, které je často pozorováno při vysokých koncentracích zkoušených látek. Protože postup obsahuje opakovanou inokulaci i náhradu vyčerpávaných živin a primárních substrátů, obnoví se původní mikrobiální různorodost a dobu trvání zkoušky lze v zásadě prodloužit do nekonečna. Při použití polospojitého postupu je důležité mít na paměti, že zbytková koncentrace zkoušené látky se musí korigovat na množství zkoušené látky přidané a odstraněné v každém postupu obnovení. U sloučenin, které se málo sorbují, lze celkovou koncentraci a koncentraci rozpuštěné zkoušené látky používat zaměnitelně. Sorpce je za stanovených podmínek (0,1–1 g pevných látek/l) pro látky s $\log K_{ov} < 3$ (platí pro neutrální, lipofilní sloučeniny) nevýznamná (< 5 %). To je ilustrováno následujícím příkladem výpočtu. 0,1 g/l pevných látek zhruba odpovídá 10 mg uhlíku na litr (uhlíková frakce, $f_C = 0,01$). Předpokládáme, že:

$$\text{Log } K_{ov} \text{ (zkoušené látky)} = 3$$

$$K_{ou} = 0,42 \times K_{ov}$$

$$\text{Rozdělovací koeficient } K_d = f_C \times K_{ou}$$

rozpuštěná frakce celkové koncentrace (C_v)/ C -celkové(C_c) je pak:

$$C_v/C_c = 1/(1 + K_d \times SS) = 1/(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999$$

▼ **M1***Dodatek 3***Stanovení $^{14}\text{CO}_2$** **Nepřímé stanovení $^{14}\text{CO}_2$**

Pro rutinní měření je nepřímá metoda obvykle nejméně časově náročnou a nejpřesnější metodou, pokud je zkoušená látka netěkavá a netransformuje se na těkavé transformační produkty. Nefiltrované vzorky, např. o objemu 5 ml, se jednoduše převedou do scintilačních lahvíček. Vhodná aktivita ve vzorcích je na počátku 5 000 dpm–10 000 dpm (80–170 Bq) a minimální počáteční aktivita je přibližně 1 000 dpm. CO_2 by měl být odstraněn po okyselení na pH 2 až 3 pomocí 1 či 2 kapek koncentrované H_3PO_4 nebo HCl . Odstraňování CO_2 lze provádět probubláváním vzduchem přibližně po ½–1 hodinu. Eventuálně lze lahvičky intenzivně protřepávat po dobu 1 až 2 hodin (například na třepačce s mikrodoskou) nebo jemně protřepávat přes noc. Účinnost procesu odstraňování CO_2 se musí zkontrolovat (prodloužením doby provzdušňování nebo protřepávání). Poté by se měla přidat scintilační kapalina vhodná pro počítání vodních vzorků, vzorek by se měl homogenizovat vířivou míchačkou a radioaktivita určit počítáním scintilací v roztoku, přičemž je nutné odečíst aktivitu pozadí zjištěnou ve slepých zkouškách (F_B). Pokud nebude zkušební voda velmi zbarvená ani nebude obsahovat vysokou koncentraci částic, vzorky budou obvykle vykazovat jednotné zhášení a postačí provedení korekcí na zhášení pomocí externího standardu. Je-li zkušební voda vysoce zbarvená, může být nutná korekce na zhášení přidáním interního standardu. Je-li koncentrace částic vysoká, nemusí být možné získat homogenní roztok či gel, případně může být odchylka zhášení mezi vzorky velká. V takovém případě lze použít níže popsanou metodu počítání pro zkušební suspenze. Provádí-li se zkouška jako zkouška se suspendovanými sedimenty, měření $^{14}\text{CO}_2$ by se mohlo provádět nepřímo odběrem homogenního 10ml vzorku zkušební vody/suspenze a oddělením fází pomocí odstředování při vhodných otáčkách (např. při 40 000 m/s^2 po dobu 15 minut). Vodní fáze by poté měla být ošetřena shora popsaným postupem. Aktivita ^{14}C v částicové fázi (POA) by se měla určit resuspendací sedimentu v malém objemu destilované vody, převedením do scintilačních lahvíček a přidáním scintilační kapaliny pro vytvoření gelu (za tímto účelem jsou k dispozici speciální scintilační kapaliny). V závislosti na povaze částic (např. jejich obsahu organického materiálu) může být před přidáním scintilační kapaliny vzorek přes noc vyluhován tkáňovým rozpustidlem a poté homogenizován vířivou míchačkou. Alternativně lze POA určit spalováním v nadbytku kyslíku použitím oxidačního činidla na vzorek. Při počítání je třeba vždy zahrnout interní standard a může být nezbytné provádět korekce na zhášení pomocí přidání interního standardu pro každý jednotlivý vzorek.

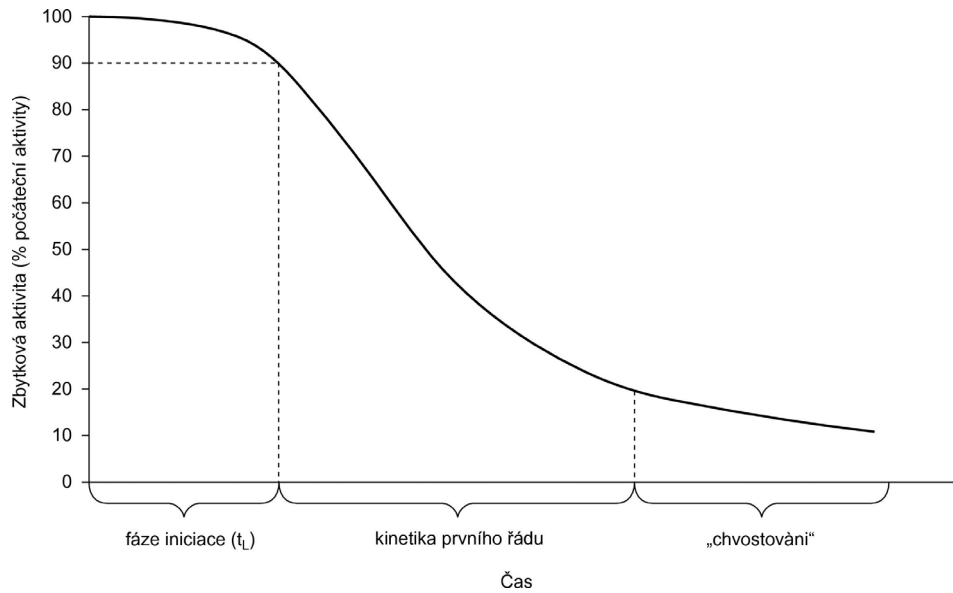
Přímé stanovení $^{14}\text{CO}_2$

Měří-li se uvolňovaný $^{14}\text{CO}_2$ přímo, je třeba nasadit na počátku zkoušky více baněk, používat jako vzorek vždy celý objem zkušební baňky v každém měřicím bodě, okyselit zkušební baňky na pH 2 až 3 a jímat $^{14}\text{CO}_2$ v interním (umístěný v každé zkušební baňce na počátku zkoušky) nebo externím absorbéru. Jako absorpční médium lze používat alkálii (např. 1 N roztok NaOH nebo peleta NaOH), ethanolamin nebo na ethanolaminu založený absorbér a komerčně dostupné absorbéry. Pro přímé měření $^{14}\text{CO}_2$ je třeba baňky uzavřít např. septou z butylové pryže.

▼ M1

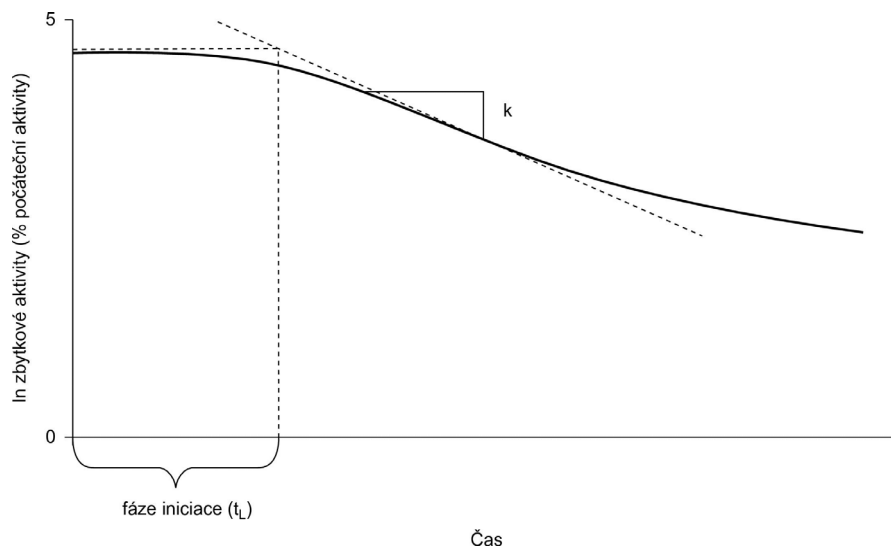
Obrázek 1a

Příklad aritmetického vynášení dat (zbytková aktivita vzhledem k času)



Obrázek 1b

Příklad semilogaritmického vynesení dat (ln zbytkové aktivity vzhledem k času)



▼ **M1****C.26 ZKOUŠKA INHIBICE RŮSTU *LEMNA* SPP.****1. METODA**

Tato metoda je rovnocenná Pokynu OECD pro zkoušení 221 (2006) (1). Mezi orgány EU panuje široká shoda v tom, že zkouška na *Lemna* spp. je u intenzivně zbarvených látek vhodnou alternativou ke zkoušce na řasách (2, 3).

1.1 ÚVOD

Tato zkušební metoda je určena k hodnocení toxicity látek pro sladkovodní rostliny rodu *Lemna* (okřehek). Je založena na existujících pokynech (4, 5, 6, 7, 8, 9), ale obsahuje úpravy těchto metod, aby odrazila nejnovější výsledky výzkumu a konzultace v řadě klíčových záležitostí. Navrhovaná metoda byla validována mezinárodní kroužkovou zkouškou (10).

Tato zkušební metoda popisuje zkoušení toxicity pomocí *Lemna gibba* a *Lemna minor*, které byly obě rozsáhle studovány a jsou předmětem shora uvedených norem. Taxonomie *Lemna* spp. je obtížná a je komplikována existencí široké škály fenotypů. Ačkoliv se u *Lemna* může vyskytnout genetická variabilita v odezvě na toxické látky, není v současnosti dostatek údajů o tomto zdroji variability, aby mohl být pro použití v rámci této metody doporučen specifický klon. Je třeba uvést, že zkouška se neprovádí axenicky, ale v jednotlivých stupních během zkušebního procesu se provádí opatření pro udržení kontaminace jinými organismy na minimu.

Podrobně se popisuje zkoušení s obnovením (semistatické a průtokové) a bez obnovení (statické) zkušebního roztoku. V závislosti na cílech zkoušky a právních požadavcích se doporučuje zvážit použití semistatických a průtokových metod, například pro látky, které se z roztoku rychle ztrácí v důsledku odpaření, fotodegradace, srážení nebo biologického rozkladu. Další pokyny jsou uvedeny v (11).

1.2 DEFINICE

Pro účely této zkušební metody se používají následující definice a zkratky:

Biomasa: je suchá hmotnost živé hmoty přítomné v populaci. V této zkoušce se obvykle měří náhrady biomasy, například počet lístků nebo plocha lístků a používání termínu „biomasa“ rovněž odkazuje na tyto náhradní míry.

Chloróza: je žloutnutí tkáně lístků.

Klon: je organismus nebo buňka vzniklá z jediného jedince asexuální reprodukci. Jedinci ze stejného klonu jsou proto geneticky identičtí.

Kolonie: znamená soubor mateřských a dceřiných lístků (obvykle 2 až 4) navzájem spolu spojených. Někdy se označuje jako rostlina.

▼ M1

EC_x: je koncentrace zkoušené látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k x% (např. 50 %) snížení růstu *Lemna* (musí se výslovně uvést, pokud se odchyluje od plné či normální doby trvání zkoušky). Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti nebo z výtěžku se pro růstovou rychlost používá symbol „E_rC“ a pro výtěžek „E_yC“ následovaný proměnnou měření, např. E_rC (počet lístků).

Průtoková zkouška: je zkouškou, při níž jsou zkušební roztoky průběžně vyměňovány.

Lístek: je individuální/samostatnou listovitou strukturou rostliny okřehku. Je to nejmenší jednotka, tj. jedinec, schopná reprodukce.

Hrbatost: znamená lístky mající hrbolaty či napuchlý vzhled.

Růst: je zvýšením proměnné měření, např. počtu lístků, suché hmotnosti, hmotnosti za mokra nebo plochy lístků, během doby zkoušky.

Růstová rychlost (průměrná specifická růstová rychlost): je logaritmické zvýšení biomasy během období expozice.

Nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (Lowest Observed Effect Concentration, LOEC): je nejnižší zkušební koncentrací, při níž je pro danou expoziční dobu pozorován statisticky významný účinek látky na snížení růstu (na hladině spolehlivosti $p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Všechny zkušební koncentrace vyšší než LOEC musí však mít stejné nebo vážnější škodlivé účinky, než jsou účinky pozorované při koncentraci LOEC. Nelze-li tyto dvě podmínky splnit, musí být podrobně vysvětleno, jak byla LOEC (a tedy i NOEC) zvolena.

Proměnné měření: jsou jakýmkoliv druhem proměnných, které se měří pro vyjádření zkoumaného účinku pomocí jedné či více různých proměnných odezvy. V této metodě jsou proměnnými měření počet lístků, plocha lístků, čerstvá hmotnost a suchá hmotnost.

Monokultura: je kultura s jedním druhem rostliny.

Nekróza: je mrtvá (tj. bílá či vodou nasáklá) tkáň lístku.

Koncentrace bez pozorovaných účinků (No Observed Effect Concentration, NOEC): je zkušební koncentrace bezprostředně nižší než LOEC.

Fenotyp: je pozorovatelnou charakteristikou organismu určenou interakcí jeho genů s prostředím.

Proměnné odezvy: jsou proměnné pro odhad toxicity odvozené z jakýchkoliv naměřených proměnných, jež popisují biomasu, různými metodami výpočtu. U této metody jsou proměnnými odezvy růstová rychlost a výtěžek, které se odvozují z proměnných měření jako např. počtu lístků, plochy lístků, čerstvé hmotnosti nebo suché hmotnosti.

Semistatická (obnovovací) zkouška: je zkouškou, při níž je zkušební roztok během zkoušky ve stanovených intervalech pravidelně nahrazován.

Statická zkouška: je zkušební metoda bez obnovování zkušebního roztoku během zkoušky.

▼ **M1**

Zkoumaný účinek: popisuje obecný faktor, který bude jakožto cíl zkoušky změněn zkoušenou chemickou látkou vzhledem ke kontrole. Při této metodě je zkoumaným účinkem inhibice růstu, kterou lze vyjádřit různými proměnnými odezvy, jež jsou založeny na jedné či více proměnných měření.

Zkušební médium: je úplné syntetické růstové médium, v němž rostou zkušební rostliny při expozici zkoušené látky. Zkoušená látka bude za normálních podmínek ve zkušebním médiu rozpuštěna.

Výtěžek: je hodnota proměnné měření pro vyjádření biomasy na konci expoziční doby minus proměnná měření na počátku expoziční doby.

1.3 **PODSTATA ZKOUŠKY**

Exponenciálně rostoucí kultury rostlin rodu *Lemna* se po dobu sedmi dnů nechají růst jako monokultury v různých koncentracích zkoušené látky. Cílem zkoušky je kvantifikovat účinky související s látkou na vegetativní růst během tohoto období, a to na základě hodnocení zvolených proměnných měření. Primární proměnnou měření je počet lístků. Rovněž se měří nejméně jedna další proměnná měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), protože některé látky mohou ovlivňovat jiné proměnné měření mnohem více než počet lístků. Pro kvantifikaci účinků souvisejících s látkou se růst ve zkušebních roztocích porovnává s růstem kontrol a stanoví se koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici růstu (např. 50 %) a vyjádří jako EC_x (např. EC_{50}).

Zkoumaným účinkem je inhibice růstu vyjádřená jako logaritmické zvýšení proměnné měření (průměrná specifická růstová rychlost) během expoziční doby. Z průměrných specifických růstových rychlostí zaznamenaných v řadě zkušebních roztoků se stanoví koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici růstové rychlosti (např. 50 %) a vyjádří se jako E_rC_x (např. E_rC_{50}).

Další proměnnou odezvy použitou v této zkušební metodě je výtěžek, který může být nutný ke splnění specifických právních požadavků v některých zemích. Je definován jako proměnné měření na konci expoziční doby minus proměnné měření na počátku expoziční doby. Z výtěžku zaznamenaného v řadě zkušebních roztoků se vypočítá koncentrace způsobující stanovenou x% inhibici výtěžku (např. 50 %) a vyjádří se jako E_yC_x (např. E_yC_{50}).

Kromě toho se může statisticky určit nejnižší koncentrace s pozorovanými účinky (LOEC) a koncentrace bez pozorovaných účinků (NOEC).

1.4 **INFORMACE O ZKOUŠENÉ LÁTKE**

Měla by být k dispozici analytická metoda s odpovídající citlivostí pro kvantifikaci látky ve zkušebním médiu.

▼ **M1**

Užitečnými informacemi o zkoušené látce pro účely stanovení zkušebních podmínek mohou být strukturální vzorec, čistota, rozpustnost ve vodě, stálost ve vodě na světle, pK_a , $K_{o/w}$, tlak par a biologická rozložitelnost. Pro výpočet Henryho konstanty, která bude ukazovat, zda-li jsou pravděpodobné významné ztráty zkoušené látky během doby zkoušky, lze použít rozpustnost ve vodě a tlak par. To pomáhá zjistit, zda-li by se měly podniknout konkrétní opatření ke kontrole takových ztrát. Jestliže nejsou informace o rozpustnosti a stálosti zkoušené látky jisté, doporučuje se, aby byly hodnoceny za podmínek zkoušky, tj. v růstovém médiu, při teplotě a režimu osvětlení, které mají být při zkoušce použity.

Pokud je zvláště důležitá kontrola pH zkušebního média, např. zkouší-li se kovy nebo látky, které jsou hydrolyticky nestálé, doporučuje se přidavek pufru do růstového média (viz bod 1.7.4 první odstavce). Další pokyny pro zkoušení látek s fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které způsobují jejich obtížnou testovatelnost, je uveden v (11).

1.5 REFERENČNÍ LÁTKA

Jako prostředek kontroly zkušebního postupu lze zkoušet referenční látku (látky), například 3,5-dichlorfenol použitý v mezinárodní kruhové zkoušce (10). Doporučuje se zkoušet referenční látku nejméně dvakrát ročně nebo – pokud se zkoušení provádí s menší četností – souběžně se stanovováním toxicity zkoušené látky.

1.6 VALIDITA ZKOUŠKY

Má-li být zkouška platná, musí být doba do zdvojnásobení počtu lístků v kontrole menší než 2,5 dnů (60 hodin), což odpovídá přibližně sedminásobnému zvýšení za sedm dnů a průměrné specifické růstové rychlosti $0,275 \text{ d}^{-1}$. Při využití médií a zkušebních podmínek popsanych v této zkušební metodě lze tohoto kritéria dosáhnout použitím statické zkoušky (8). Rovněž se předpokládá, že toto kritérium bude splnitelné za podmínek semistatické a průtokové zkoušky. Výpočet doby zdvojnásobení je uveden v bodě 2.1.

1.7 POPIS METODY

1.7.1 **Přístroje a pomůcky**

Veškeré vybavení přicházející od styku se zkušebními médii by mělo být vyrobeno ze skla nebo jiného chemicky inertního materiálu. Skleněné pomůcky použité pro kultivační a zkušební účely je zapotřebí vyčistit od chemických kontaminantů, které by mohly uniknout do zkušebního média, a musí být sterilní. Zkušební nádoby by měly být dostatečně široké, aby mohly lístky jednotlivých kolonií v kontrolních nádobách růst, aniž by se na konci zkoušky překrývaly. Není důležité, zda se kořeny dotýkají dna zkušebních nádob, ale doporučuje se, aby v každé zkušební nádobě byla minimální hloubka 20 mm a minimální objem 100 ml. Volba zkušebních nádob není zásadně důležitá, pokud budou splněny tyto požadavky. Jako vhodné se potvrdily skleněné kádinky, krystalizační misky nebo skleněné Petriho misky vhodných rozměrů. Zkušební nádoby musí být zakryty, aby se minimalizovalo odpařování a náhodná kontaminace, přičemž však musí být umožněna nezbytná výměna vzduchu. Vhodné zkušební nádoby a zejména kryty musí zabránit stínění nebo změnám spektrálních charakteristik světla.

▼ **M1**

Kultury a zkušební nádoby by se neměly přechovávat společně. Toho se nejlépe dosáhne pomocí samostatných komor, inkubátorů či místností pro růst za podmínek prostředí. Osvětlení a teplota musí být regulovatelné a musí se udržovat na stálé úrovni (viz bod 1.7.8).

1.7.2 **Testovací organismus**

Organismem použitým pro tuto zkoušku je *Lemna gibba* nebo *Lemna minor*. Krátké popisy druhů okřehků, které byly použity pro zkoušky toxicity, jsou uvedeny v dodatku 1. Rostlinný materiál lze získat ze sbírek kultur, z jiné laboratoře nebo z terénu. Jestliže se sběr provádí z terénu, rostliny by se měly kultivovat ve stejném médiu, jaké se používá ke zkoušení, minimálně po dobu osmi týdnů před použitím. Terénní místa použitá pro sběr výchozích kultur musí být prostá zřejmých zdrojů kontaminace. Pokud se získávají z jiné laboratoře nebo ze sbírek kultur, měly by se podobně uchovávat minimálně po tři týdny. Ve zkušebním protokolu je vždy třeba uvést zdroj rostlinného materiálu a druhů a klonu (je-li znám) použitých ke zkoušení.

Měly by se používat monokultury, které jsou očividně prosté kontaminace jinými organismy, například řasami a prvoky. Zdravé rostliny *L. minor* obsahují kolonie skládající se ze dvou až pěti lístků, zatímco zdravé kolonie *L. gibba* mohou obsahovat až sedm lístků.

Kvalita a jednotnost rostlin použitých pro zkoušku bude mít významný vliv na výsledek zkoušky, a proto by se měla volit s velkou péčí. Měly by se používat mladé, rychle rostoucí rostliny bez viditelných lézí či odbarvení (chlorózy). Kultury dobré kvality se vyznačují vysokým výskytem kolonií obsahujících nejméně dva lístky. Velký počet jednotlivých lístků je ukazatelem environmentálního stresu, např. nedostatku živin, a rostlinný materiál z takovýchto kultur by se ke zkoušení neměl používat.

1.7.3 **Kultivace**

Pro snížení četnosti udržování kultury (např. pokud se na určité období neplánují žádné zkoušky s *Lemna*) lze kultury udržovat za sníženého osvětlení a teploty (4–10 °C). Podrobnosti o kultivaci jsou uvedeny v dodatku 2. Očividné známky kontaminace řasami nebo jinými organismy vyžadují povrchovou sterilizaci dílčího vzorku lístků *Lemna* a následný přenos do čerstvého média (viz dodatek 2). V tomto případě je třeba zbývající kontaminovanou kulturu zlikvidovat.

Nejméně sedm dnů před zkoušením se asepticky převede dostatečný počet kolonií do čerstvého sterilního média a kultivuje se 7 až 10 dnů za podmínek zkoušky.

1.7.4 **Zkušební médium**

Pro *Lemna minor* a *Lemna gibba* se doporučují odlišná média, jak je dále uvedeno. Je třeba pečlivě zvážit zahrnutí pufru pH do zkušebního média (MOPS (3-(*N*-morfolino)propansulfonová kyselina, číslo CAS: 1132–61–2; číslo EINECS: 214–478–5) do média pro *L. minor* a NaHCO₃ do média pro *L. gibba*), jestliže existuje podezření, že by mohl reagovat se zkoušenou látkou a ovlivňovat expresi její toxicity. Steinbergovo médium (12) je rovněž přijatelné, pokud jsou splněna kritéria validity.

▼ M1

Pro kultivaci a zkoušení s *L. minor* se doporučuje úprava švédského standardního (SIS) růstového média pro *Lemna*. Složení tohoto média je uvedeno v dodatku 3.

Ke kultivaci a zkoušení s *L. gibba* se doporučuje růstové médium 20X AAP, popsané v dodatku 3.

Steinbergovo médium, popsané v dodatku 3, je rovněž vhodné pro *L. minor*, ale může se používat i pro *L. gibba*, pokud jsou splněna kritéria validity.

1.7.5 Zkušební roztoky

Zkušební roztoky se obvykle připravují ředěním zásobního roztoku. Zásobní roztoky zkoušené látky se obvykle připravují rozpouštěním látky v růstovém médiu.

Nejvyšší zkušební koncentrace zkoušené látky by obvykle neměla překročit rozpustnost látky ve vodě za zkušebních podmínek. Je však třeba poznamenat, že *Lemna* spp. plují na povrchu a mohou být vystaveny působení látek, které se hromadí na rozhraní voda-vzduch (např. látky špatně rozpustné ve vodě nebo hydrofobní či povrchově aktivní látky). Za takových podmínek dochází k expozici jiným látkám, než jaké se nachází v roztoku, a zkušební koncentrace mohou v závislosti na vlastnostech zkoušené látky překračovat rozpustnost ve vodě. Pro zkoušené látky s nízkou rozpustností ve vodě může být nezbytné připravit koncentrovaný zásobní roztok nebo disperzi látky pomocí organického rozpouštědla nebo dispergátoru, aby se usnadnilo přidávání přesných množství zkoušené látky do zkušebního média, a napomohlo se tak její dispergaci a rozpouštění. Měla by být vynaložena maximální snaha takové látky nepoužívat. Používání pomocných rozpouštědel nebo dispergátorů by nemělo způsobovat žádnou fytotoxicitu. Příkladem běžně používaných rozpouštědel, která nezpůsobují fytotoxicitu při koncentracích až do $100 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$, jsou aceton a dimethylformamid. Jestliže se použije rozpouštědlo nebo dispergátor, jeho konečná koncentrace by se měla zapsat ve zkušební zprávě a udržovat na minimu ($\leq 100 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$) a všechny exponované vzorky a kontroly by měly obsahovat stejnou koncentraci rozpouštědla nebo dispergátoru. Další pokyny k používání dispergátorů jsou uvedeny v (11).

1.7.6 Zkušební a kontrolní skupiny

Předběžná znalost toxicity zkoušené látky pro *Lemna*, např. z orientační zkoušky, pomůže při volbě vhodných zkušebních koncentrací. Při definitivní zkoušce toxicity se zpravidla použije alespoň pět zkušebních koncentrací tvořících geometrickou řadu. Faktor mezi zkušebními koncentracemi by nejlépe neměl překročit 3,2, ale lze použít vyšší hodnotu, jestliže je křivka závislosti koncentrace a odezvy plochá. Použití méně než pěti koncentrací by mělo být zdůvodněno. V rámci každé zkušební koncentrace se použijí nejméně tři opakování.

Při volbě rozsahu zkušebních koncentrací (pro orientační a/nebo definitivní zkoušku toxicity) je zapotřebí zvážit následující:

▼ **M1**

- Pro stanovení EC_x by se zkušební koncentrace měly pohybovat pod a nad hodnotu EC_x , aby se zajistila vhodná úroveň spolehlivosti. Například pokud se odhaduje EC_{50} , nejvyšší zkušební koncentrace by měla být vyšší než hodnota EC_{50} . Jestliže hodnota EC_{50} leží mimo rozmezí zkušebních koncentrací, související intervaly spolehlivosti budou velké a správné hodnocení statistické vhodnosti modelu nemusí být možné.
- Jestliže je cílem odhadnout LOEC/NOEC, nejnižší zkušební koncentrace by měla být dostatečně nízká, aby růst nebyl výrazně nižší než růst kontroly. Dále by nejvyšší zkušební koncentrace měla být dostatečně vysoká, aby byl růst výrazně nižší než růst kontroly. Pokud tomu tak není, zkouška se bude muset opakovat v odlišném rozmezí koncentrací (s výjimkou případů, kdy je nejvyšší koncentrace na mezi rozpustnosti nebo je maximální požadovanou limitní koncentrací, např. 100 mg.l^{-1}).

Každá zkouška by měla zahrnovat kontroly, pro něž se použije stejné živné médium, stejný počet lístků a kolonií, stejné podmínky okolního prostředí a postupy jako pro zkušební nádoby, avšak neobsahují zkoušenou látku. Jestliže se použije pomocné rozpouštědlo nebo dispergátor, měla by být zahrnuta i další kontrolní expozice s rozpouštědlem/dispergátorem přítomným ve stejné koncentraci jako v nádobách se zkoušenou látkou. Počet kontrolních nádob použitých k opakování (a případných nádob s rozpouštědly) by měl být nejméně roven počtu nádob použitých pro každou zkušební koncentraci; v ideálním případě by měl být dvojnásobný.

Jestliže se stanovení NOEC nepožaduje, plán zkoušky lze pozměnit tak, že se zvýší počet koncentrací a sníží počet opakování na příslušnou koncentraci. Počet kontrolních opakování však musí být nejméně tři.

1.7.7 **Expozice**

Kolonie tvořené 2 až 4 viditelnými lístky se převedou z očkovací kultury a za aseptických podmínek se náhodně přiřadí do zkušebních nádob. Každá nádoba by měla celkem obsahovat 9 až 12 lístků. Počet lístků a kolonií by měl být v každé zkušební nádobě stejný. Zkušenosti získané s touto metodou a údaje z kruhové zkoušky ukazují, že použití tří opakování na expozici, přičemž pro každé opakování se zpočátku použije od 9 do 12 lístků, dostává ke zjištění rozdílů v inhibici růstu přibližně o 4 až 7 % vypočítané pomocí růstové rychlosti (10 až 15 % počítáno pomocí výtěžku) mezi jednotlivými expozicemi (10).

K minimalizaci vlivu prostorových rozdílů v intenzitě světla nebo v teplotě je potřebné náhodné uspořádání zkušebních nádob v inkubátoru. Při provádění pozorování se rovněž vyžaduje uspořádání do bloků nebo náhodné přemísťování nádob (nebo častější přemísťování).

▼ **M1**

Jestliže předběžná zkouška stálosti ukazuje, že během doby trvání zkoušky (7 dnů) nelze udržet koncentraci zkoušené látky (tj. měřená koncentrace poklesne pod 80 % naměřené počáteční koncentrace), doporučuje se semistatická zkouška. V tomto případě by měly být kolonie nejméně dvakrát během zkoušky (např. v den 3 a 5) vystaveny čerstvě připraveným zkušebními a kontrolními roztokům. Četnost expozice čerstvému médiu závisí na stálosti zkoušené látky; pro udržení téměř konstantních koncentrací vysoce nestálých či těkavých látek může být zapotřebí vyšší četnost. Za určitých okolností může být nutný průtokový postup (11, 13).

Scénář expozice prostřednictvím aplikace na lístek (rozprašování) není do této zkušební metody zahrnut, avšak tomuto tématu se věnuje literatura (14).

1.7.8 Inkubační podmínky

Pomocí kontinuálního teplého nebo chladného bílého fluorescenčního osvětlení je třeba zajistit světelnou intenzitu zvolenou z rozmezí 85–135 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, přičemž se tato intenzita měří při fotosynteticky aktivním záření (400 až 700 nm) v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla jako lístky *Lemna* (ekvivalent 6 500 až 10 000 luxů). Jakékoliv odchylky od zvolené světelné intenzity nad zkušební plochou by neměly překročit $\pm 15\%$. Naměřenou hodnotu bude ovlivňovat metoda detekce světla a měření, zejména typ čidla. Kulová čidla (která reagují na světlo ze všech úhlů nad a pod rovinou měření) a „kosinová“ čidla (která reagují na světlo ze všech úhlů nad rovnou měření) jsou vhodnější než jednosměrná čidla, neboť poskytují vyšší naměřené hodnoty pro vícebodový světelný zdroj zde popsaného typu.

Teplota ve zkušebních nádobách by měla být $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$. Hodnota pH kontrolního média by neměla během zkoušky vzrůst o více než 1,5. Ovšem odchylka o více než 1,5 nebude znamenat neplatnost zkoušky, pokud je možné prokázat, že byla splněna kritéria validity. Zvláštní pozornost je zapotřebí věnovat posunu pH ve zvláštních případech, jako jsou zkoušky nestálých látek nebo kovů. Další pokyny naleznete v (11).

1.7.9 Doba trvání

Zkouška je ukončena za 7 dnů poté, co byly rostliny převedeny do zkušebních nádob.

1.7.10 Měření a analytická stanovení

Na počátku zkoušky se určí a zaznamená počet lístků ve zkušebních nádobách, přičemž se pečlivě dbá na to, aby byly započítány vystupující, jasně viditelné lístky. Na počátku zkoušky, dále nejméně jednou během každých 3 dnů během expoziční doby (tj. nejméně dvakrát během celkové doby 7 dnů) a při ukončení zkoušky se musí určit počty lístků, které mají normální či abnormální vzhled. Je zapotřebí zaznamenat ve zkušební zprávě změny ve vývoji rostlin, např. velikost lístku, vzhled, známky nekrózy, chlorózy nebo hrbatosti, rozpadávání kolonií nebo ztráta vzplývavosti a v délce a vzhledu kořenu. Je rovněž nutné zaznamenat významné vlastnosti zkušebního média (např. přítomnost nerozpuštěného materiálu, růst řas ve zkušební nádobě).

▼ **M1**

Kromě určení počtu lístků během zkoušky se také hodnotí účinky zkoušené látky na jednu (nebo více) následujících proměnných měření:

- i) celková plocha lístků,
- ii) suchá hmotnost,
- iii) čerstvá hmotnost.

Celková plocha lístků má tu výhodu, že ji lze u každé zkušební a kontrolní nádoby určit na počátku zkoušky, v jejím průběhu i na jejím konci. Suchá nebo čerstvá hmotnost by se měla určit na počátku zkoušky ze vzorku očkovací kultury, jaké se obvykle používá k zahájení zkoušky, a na konci zkoušky pak na základě rostlinného materiálu z každé zkušební a kontrolní nádoby. Jestliže se plocha lístků neměří, dává se přednost suché hmotnosti před čerstvou hmotností.

Celková plocha lístků, suchá hmotnost a čerstvá hmotnost se mohou určit následovně:

- i) Celková plocha lístků: Celková plocha lístků všech kolonií může být stanovena analýzou obrazu. Pomocí videokamery lze zachytit siluetu zkušební nádoby a rostlin (tj. umístíte nádobu na svítící skříň) a výsledný obraz se digitalizuje. Plochu lístků ve zkušební nádobě lze poté stanovit kalibrací pomocí plochých tvarů o známé ploše. Je třeba dbát na vyloučení rušení způsobeného hranou zkušební nádoby. Alternativní, ale pracnější způsob spočívá v pořízení fotografie zkušebních nádob a rostlin, vyřízení výsledné siluety kolonií a určení jejich plochy pomocí analyzátoru lístkové plochy nebo milimetrového papíru. Mohou být vhodné i další postupy (například poměr hmotností papíru mezi plochou siluety kolonií a jednotkovou plochou).
- ii) Suchá hmotnost: Z každé ze zkušebních nádob se shromáždí všechny kolonie a propláchnou se destilovanou nebo deionizovanou vodou. Nadbytečná voda se odstraní savým papírem a pak se vzorky suší při 60 °C do konstantní hmotnosti. Měly by být zahrnuty jakékoliv úlomky kořenů. Suchá hmotnost by se měla vyjádřit s přesností na nejméně 0,1 mg.
- iii) Čerstvá hmotnost: Všechny kolonie se převedou do předem zvážených polystyrenových zkumavek (nebo vyrobených z jiného interního materiálu) s malými (1 mm) otvory v zakulacených dnech. Zkumavky se poté odstředí při 3 000 ot/min po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Zkumavky obsahující nyní osušené kolonie se opětovně zváží a čerstvá hmotnost se vypočítá odečtením hmotnosti prázdné zkumavky.

1.7.10.1 *Četnost měření a analytická stanovení*

Jestliže se používá plán statické zkoušky, pH každé expozice by se mělo změřit na počátku a na konci zkoušky. Jestliže se používá plán semistatické zkoušky, pH by se mělo měřit v každé vsázce „čerstvého“ zkušebního roztoku před každým obnovením a rovněž i v odpovídajících „spotřebovaných“ roztocích.

▼ M1

Intenzita osvětlení by se měla měřit v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti v bodech nacházejících se ve stejné vzdálenosti od zdroje světla jako listy *Lemma*. Měření je třeba provádět nejméně jednou během zkoušky. Teplota média v náhradní nádobě držené za stejných podmínek v růstové komoře, inkubátoru nebo místnosti by se měla zaznamenávat nejméně jednou denně.

Během zkoušky se koncentrace zkoušené látky určují ve vhodných intervalech. Ve statických zkouškách je minimálním požadavkem určení koncentrací na počátku a na konci zkoušky.

U semistatických zkoušek, u nichž se neočekává, že koncentrace zkoušené látky zůstane v rozmezí ± 20 % nominální koncentrace, je nezbytné analyzovat všechny čerstvě připravené zkušební roztoky a tytéž roztoky při každém obnovení (viz bod 1.7.7 třetí odstavce). Ovšem u těch zkoušek, u nichž nejsou naměřené počáteční koncentrace zkoušené látky v rozmezí ± 20 % nominální hodnoty, avšak u nichž lze dostatečně prokázat, že počáteční koncentrace jsou reprodukovatelné a stálé (tj. od 80 do 120 % počátečních koncentrací), mohou být chemická stanovení provedena pouze na nejvyšších a nejnižších zkušebních koncentracích. Ve všech případech je třeba provést určení koncentrací zkoušené látky před obnovením při každé zkušební koncentraci vždy pouze u jedné nádoby k opakování (nebo u sdruženého obsahu nádob jednoho opakování).

U průtokových zkoušek je vhodný podobný vzorkovací režim, jaký je popsán u semistatických zkoušek včetně analýzy na počátku, uprostřed a na konci zkoušky, ale měření „spotřebovaného“ roztoku není v tomto případě vhodné. U tohoto typu zkoušky je zapotřebí kontrolovat denně průtok ředící vody a zkoušené látky nebo zásobního roztoku zkoušené látky.

Lze-li prokázat, že byla po celou dobu zkoušky koncentrace zkoušené látky uspokojivě udržována v rozmezí ± 20 % nominální nebo naměřené počáteční koncentrace, může být analýza výsledků založena na nominálních nebo naměřených počátečních hodnotách. Je-li odchylka od nominální nebo naměřené počáteční koncentrace větší než ± 20 %, analýza výsledků by měla být založena na geometrické střední koncentraci během expozice nebo na modelech popisujících pokles koncentrace zkoušené látky (11).

1.7.11 Limitní zkouška

Za určitých okolností, např. pokud předběžná zkouška naznačuje, že zkoušená látka nemá žádné toxické účinky při koncentracích až do 100 mg l^{-1} nebo až do meze své rozpustnosti ve zkušebním médiu (podle toho, co je nižší), může být provedena limitní zkouška zahrnující porovnání odezvy v kontrolní skupině a odezvy v jedné exponované skupině (100 mg l^{-1} nebo koncentrace rovná mezi rozpustnosti). Důrazně se doporučuje podpořit tuto zkoušku analýzou expozičních koncentrací. Všechny dříve popsané zkušební podmínky a kritéria validity se vztahují i na limitní zkoušku s výjimkou toho, že počet opakování s exponovanými vzorky by se měl zdvojnásobit. Růst v kontrolní a exponované skupině může být analyzován pomocí statistického testu pro porovnání středních hodnot, např. Studentova t-testu.

▼ **M1****2. DATA A ZPRÁVY****2.1 DOBA ZDVOJNÁSOBENÍ**

Pro stanovení doby zdvojnásobení (T_d) počtu lístků a dodržování tohoto kritéria validity ve studii (bod 1.6) se používá následující vzorec s údaji získanými z kontrolních nádob:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

kde μ je průměrná specifická růstová rychlost určená podle bodu 2.2.1 prvního a druhého odstavce.

2.2 PROMĚNNÉ ODEZVY

Účelem této zkoušky je stanovit účinky zkoušené látky na vegetativní růst *Lemna*. Tato zkušební metoda popisuje dvě proměnné odezvy, protože členské země mají odlišné preference a právní požadavky. Mají-li být výsledky zkoušky přijatelné ve všech členských zemích, účinky je třeba vyhodnotit pomocí obou proměnných odezvy a) a b) popsaných dále.

a) Průměrná specifická růstová rychlost: tato proměnná odezvy se počítá na základě změn logaritmů počtů lístků a dále na základě změn logaritmů jiného parametru měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost) v čase (vyjádřeno na den) v kontrolách a každé exponované skupině. Někdy se označuje jako relativní růstová rychlost (15).

b) Výtěžek: tato proměnná odezvy se počítá na základě změn počtu lístků a dále na základě změn jiného parametru měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost) v kontrolách a každé exponované skupině až do konce zkoušky.

Je třeba uvést, že hodnoty toxicity vypočítané pomocí těchto dvou proměnných odezvy nejsou srovnatelné a při používání výsledků zkoušky se musí vzít tento rozdíl na vědomí. Hodnoty EC_x založené na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x) budou všeobecně vyšší než výsledky založené na výtěžku (E_yC_x), pokud se dodrží zkušební podmínky této zkušební metody, a to díky matematické základně příslušných přístupů. Tuto skutečnost nelze vykládat jako rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma proměnnými odezvy; hodnoty jsou jednoduše matematicky odlišné. Koncepce průměrné specifické růstové rychlosti je založena na obecném průběhu exponenciálního růstu okřehku v nelimitovaných kulturách, u nichž se toxicita odhaduje na základě účinků na růstovou rychlost, aniž by závisela na absolutní úrovni specifické růstové rychlosti kontroly, na sklonu křivky závislosti koncentrace-odezva nebo na době trvání zkoušky. Naproti tomu výsledky založené na proměnné odezvy „výtěžek“ jsou závislé na všech těchto ostatních proměnných. E_yC_x závisí na specifické růstové rychlosti druhů okřehku použitých v každé zkoušce a na maximální specifické růstové rychlosti, která se může u jednotlivých druhů, a dokonce i u různých klonů lišit. Tato proměnná odezvy by se neměla používat pro srovnávání citlivosti na toxické látky mezi druhy okřehku nebo dokonce různými klony. Přestože se z vědeckého hlediska dává přednost použití průměrné specifické růstové rychlosti pro odhad toxicity, odhady toxicity založené na výtěžku jsou rovněž do této zkušební metody zahrnuty, aby uspokojily současně právní požadavky v některých zemích.

▼ **M1**

Odhady toxicity by měly být založeny na počtu lístků a na jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), protože některé látky mohou ovlivňovat jiné proměnné měření mnohem více než počet lístků. Pouhým určováním počtu lístků by se tento účinek nezjistil.

Počet lístků a jakákoliv další zaznamenaná proměnná měření, tj. celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost, se pro každé měření uvedou v tabulce společně s koncentracemi zkoušené látky. Následná analýza dat, např. odhad LOEC, NOEC nebo EC₅₀, by měla být založena na hodnotách pro jednotlivá opakování, a nikoliv na vypočítaných středních hodnotách pro každou exponovanou skupinu.

2.2.1 Průměrná specifická růstová rychlost

Průměrná specifická růstová rychlost pro konkrétní období se vypočítá jako logaritmické zvýšení proměnných růstu – počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost) – pomocí následujícího vzorce pro každé opakování kontrolních roztoků a exponovaných roztoků:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

- μ_{i-j} : průměrná specifická růstová rychlost od doby i do doby j ,
- N_i : proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v době i ,
- N_j : proměnná měření ve zkušební nebo kontrolní nádobě v době j ,
- t : čas od i do j .

Pro každou exponovanou skupinu a kontrolní skupinu vypočítejte střední hodnotu růstové rychlosti a odhady rozptylu.

Průměrná specifická růstová rychlost by se měla vypočítat pro celou dobu trvání zkoušky (doba „ t_i “ ve shora uvedeném vzorci je počátkem zkoušky a doba „ t_j “ je ukončením zkoušky). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu vypočítejte střední hodnotu průměrné specifické růstové rychlosti a odhady rozptylu. Dále je zapotřebí vyhodnocovat růstovou rychlost v jednotlivých časových úsecích s cílem zhodnotit účinky zkoušené látky, které se vyskytly během expoziční doby (např. kontrolou logaritmicky transformovaných růstových křivek). Významné rozdíly mezi růstovou rychlostí v jednotlivých časových úsecích a průměrnou růstovou rychlostí jsou známkou odchylky od konstantního exponenciálního růstu a vyžadují důkladné prozkoumání růstových křivek. V tomto případě by konzervativní přístup spočíval v porovnání specifických růstových rychlostí exponovaných kultur během doby maximální inhibice se specifickými růstovými rychlostmi kontrol pro totéž období.

▼ M1

Procentuální inhibici růstové rychlosti (I_r) lze potom vypočítat pro každou zkušební koncentraci (exponovaná skupina) podle následujícího vzorce:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kde:

- $\% I_r$: procentuální inhibice průměrné specifické růstové rychlosti,
- μ_C : střední hodnota μ v kontrolní skupině,
- μ_T : střední hodnota μ v exponované skupině.

2.2.2 Výtěžek

Účinky na výtěžek se určují na základě dvou proměnných měření, tj. počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), přítomných v každé zkušební nádobě na počátku a konci zkoušky. Pro suchou hmotnost nebo čerstvou hmotnost se počáteční biomasa určuje na základě vzorku lístků odebraných ze stejné vsázky použité k naočkování zkušebních nádob (viz bod 1.7.3 druhý odstavec). Pro každou zkušební koncentraci a kontrolu vypočítejte střední hodnotu výtěžku a odhady rozptylu. Střední procentuální inhibici výtěžku ($\%I_y$) lze vypočítat pro každou exponovanou skupinu následovně:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

kde:

- $\% I_y$: procentuální snížení výtěžku,
- b_C : konečná biomasa minus počáteční biomasa pro kontrolní skupinu,
- b_T : konečná biomasa minus počáteční biomasa pro exponovanou skupinu.

2.2.3 Vynášení křivek závislosti koncentrace-odezva

Je zapotřebí vynést křivky závislosti koncentrace na odezvě vyjadřující vztah střední procentuální inhibice proměnné odezvy (I_r nebo I_y) vypočítané podle pokynů v bodě 2.2.1 posledním odstavci nebo v bodě 2.2.2) a logaritmu koncentrace zkoušené látky.

2.2.4 Odhad EC_x

Odhady EC_x (např. EC_{50}) by měly být založeny jak na průměrné specifické růstové rychlosti (E_rC_x), tak na výtěžku (E_yC_x) a obě tyto hodnoty by zase měly vycházet z počtu lístků a jedné další proměnné měření (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost). Důvodem je skutečnost, že existují zkoušené látky, které mají odlišný dopad na počet lístků a na další proměnné měření. Požadovanými parametry toxicity jsou proto čtyři hodnoty EC_x pro každou vypočítanou hodnotu inhibice x : E_rC_x (počet lístků), E_rC_x (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost), E_yC_x (počet lístků) a E_yC_x (celková plocha lístků, suchá hmotnost nebo čerstvá hmotnost),

▼ **M1**

2.3 STATISTICKÉ POSTUPY

Cílem je získat kvantitativní vztah mezi koncentrací a odezvou pomocí regresní analýzy. Je možné použít váženou lineární regresi po provedení linearizující transformace dat odezvy, například do probitových nebo logitových či Weibullových jednotek (16), ale dává se přednost nelineárním regresním postupům, s jejichž pomocí se lépe zpracovávají nevyhnutelné nepravidelnosti dat a odchylky od hladkých distribucí. Při přiblížení se k nule či úplné inhibici mohou být takové nepravidelnosti zesíleny transformací a rušit při analýze (16). Je zapotřebí uvést, že standardní metody analýzy používající probitové, logitové nebo Weibullové transformace jsou určeny k použití s kvantálními daty (např. mortalita nebo přežití) a musí se upravit, aby mohly být použity s daty růstové rychlosti či výtěžku. Speciální postupy pro stanovení hodnot EC_x ze spojitých dat lze nalézt v literatuře (17, 18 a 19).

Pro každou proměnnou odezvy, která se má analyzovat, použijte vztah koncentrace a odezvy pro výpočet bodových odhadů hodnot EC_x . Je-li to možné, je zapotřebí určit 95 % intervaly spolehlivosti pro každý odhad. Jakost shodnosti dat odezvy s regresním modelem je zapotřebí vyhodnotit buď graficky, nebo statisticky. Regresní analýza by se měla provádět pomocí odezev jednotlivých opakování, nikoliv pomocí středních hodnot exponovaných skupin.

Odhady EC_{50} a intervaly spolehlivosti lze rovněž získat lineární interpolací s bootstrapem (20), pokud se dostupné regresní modely/metody pro příslušná data nehodí.

Pro odhad LOEC, a tedy i NOEC je nezbytné porovnat střední hodnoty exponovaných vzorků pomocí metod analýzy rozptylu (ANOVA). Střední hodnota pro každou koncentraci musí být poté porovnána se střední hodnotou pro kontrolní skupinu, a to vhodnou metodou vícenásobného porovnání nebo metodou zkoušky trendu. Užitečné mohou být Dunnettův nebo Williamsův test (21, 22, 23, 24). Je nezbytné vyhodnotit, zda je splněn předpoklad homogenity rozptylu nezbytný pro ANOVA. Toto hodnocení lze provádět graficky nebo formálním testem (25). Mezi vhodné testy patří Levenův a Bartlettův test. Nesplnění předpokladu o homogenitě rozptylů lze někdy napravit logaritmickou transformací dat. Jestliže je heterogenita rozptylů extrémní a nelze ji napravit transformací, pak je třeba zvážit analýzu takovými metodami, jako jsou testy sestupného trendu Jonckheere. Další pokyny pro stanovení NOEC lze nalézt v (19).

Vědecký vývoj poslední doby vedl k doporučení opustit koncepci NOEC a nahradit ji odhady bodů EC_x na základě regrese. Vhodná hodnota pro x nebyla pro tuto zkoušku s *Lemna* stanovena. Nicméně se zdá, že vhodné je rozmezí od 10 do 20 % (v závislosti na zvolené proměnné odezvy) a nejlépe by se měly uvádět jak EC_{10} , tak EC_{20} .

3. ZPRÁVY

3.1 PROTOKOL O ZKOUŠCE

Protokol o zkoušce musí obsahovat tyto údaje:

Zkoušená látka:

— fyzikální povaha a fyzikálně-chemické vlastnosti včetně meze rozpustnosti ve vodě,

▼ M1

— údaje o chemické identifikaci (např. číslo CAS) včetně čistoty.

Testovací druhy:

— vědecký název, klon (je-li znám) a zdroj.

Zkušební podmínky:

— použitý zkušební postup (statický, semistatický nebo průtokový),

— datum zahájení zkoušky a délka jejího trvání,

— zkušební médium,

— popis experimentálního provedení: zkušební nádoby a kryty, objemy roztoků, počty kolonií a lístků na zkušební nádobu na počátku zkoušky,

— zkušební koncentrace (nominální, popř. naměřené) a počet opakování na každou koncentraci,

— metody přípravy zásobních a zkušebních roztoků včetně použití jakýchkoliv rozpouštědel nebo dispergátorů,

— teplota během zkoušky,

— zdroj světla, intenzita světla a homogenita,

— hodnoty pH zkušebních a kontrolních médií,

— koncentrace zkoušené látky a metoda analýzy s příslušnými údaji pro hodnocení jakosti (validační studie, směrodatné odchylky nebo intervaly spolehlivosti analýz),

— metody pro určení počtu lístků a dalších proměnných měření, např. suchá hmotnost, čerstvá hmotnost nebo plocha lístků,

— všechny odchylky od této zkušební metody.

Výsledky:

— hrubá data: počet lístků a dalších proměnných měření v každé zkušební a kontrolní nádobě při každém pozorování a každé analýze,

— střední hodnoty a směrodatné odchylky pro každou proměnnou měření,

— růstové křivky pro každou koncentraci (doporučuje se s logaritmičticky transformovanou proměnnou měření, viz bod 2.2.1 druhý odstavec),

— doba zdvojnásobení/růstová rychlost v kontrole na základě počtu lístků,

— vypočítané proměnné odezvy pro všechna opakování s exponovanými vzorky, spolu se středními hodnotami a variačním koeficientem pro opakování,

— grafické znázornění vztahu koncentrace a účinku,

— odhady toxických účinků pro proměnné odezvy, např. EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀, a související intervaly spolehlivosti. Jestliže se počítají LOEC a/nebo NOEC, uvedou se jejich hodnoty a statistické metody použité k jejich stanovení,

▼ **M1**

- jestliže byla použita ANOVA, uvede se velikost účinku, který lze detekovat (např. nejmenší významný rozdíl),
- jakákoliv stimulace růstu zjištěná v jakémkoli exponovaném vzorku,
- jakékoliv vizuální známky fytotoxicity, jakož i pozorování zkušebních roztoků,
- diskuse výsledků včetně jakéhokoliv vlivu na výsledek zkoušky v důsledku odchylek od této zkušební metody.

4. **LITERATURA**

- (1) OECD TG 221 (2006) *Lemna* Sp. Growth Inhibition Test.
- (2) O použití studií na *Lemna* spp. u zbarvených látek pojednává oddíl 13.5.3 publikace EU *Manual of Decisions* z července 2006, která je dostupná na internetových stránkách <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals>.
- (3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment – kapitola R.7b: Endpoint specific guidance; tabulka 7.8.3: Summary of difficult substance testing issues, dostupné na internetových stránkách

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1234958685#A.
- (4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). s. 733–742. In: Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.
- (5) USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96–156. 8 stran.
- (6) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 stran.
- (7) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 stran (švédsky).
- (8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37, 120 stran.
- (9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.
- (10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.
- (11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23.
- (12) ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

▼ M1

- (13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.
- (14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353–359.
- (15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481–483.
- (16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol.* 19, 713–718.
- (17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 157–167.
- (18) Bruce R.D., Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485–1494.
- (19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.
- (20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. USEPA, Duluth, MN.
- (21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, 1096–1121.
- (22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482–491.
- (23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103–117.
- (24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510–531.
- (25) Brain P., Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93–96.

▼ M1

Dodatek 1

Popis *Lemna* spp.

Vodní rostlina označovaná jako okřehek, *Lemna* spp., patří do čeledi *Lemnaceae*, která zahrnuje celosvětově rozšířené druhy ve čtyřech rodech. Jejich vzhled a taxonomie byly popsány vyčerpávajícím způsobem (1, 2). *Lemna gibba* a *L. minor* jsou představitelé druhů mírných oblastí a běžně se používají pro zkoušky toxicity. Oba druhy mají plovoucí nebo ponořenou lodyžku diskového tvaru (lístek) a ze středu spodní části každého lístku vychází velmi tenký kořínek. *Lemna* spp. zřídka kvetou a rostliny se množí vegetativně vytvářením nových lístků (3). Při srovnání se staršími rostlinami jsou mladší rostliny světlejší, mají kratší kořínky a skládají se ze dvou až tří lístků různých velikostí. Díky své malé velikosti, jednoduché struktuře, asexuálnímu rozmnožování a krátké generační době jsou rostliny rodu *Lemna* velmi vhodné pro laboratorní zkoušení (4, 5).

Z důvodu pravděpodobných mezidruhových rozdílů v citlivosti jsou platná pouze srovnání citlivostí v rámci druhu.

Příklady druhů *Lemna*, které byly použity ke zkoušení: odkazy na druhy

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. *J. Phys. Chem.*, 29: 935–941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96–156. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Švédský normalizační institut (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 stran (švédsky).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415–91 (Reapproved 1998). s. 733–742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96–156. 8 stran.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10:1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 12:481–483.

▼ **M1**

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. *Verh.-Int. Ver. Limnol.*, 19:2102–2111.

Zdroje druhů Lemna

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
 Department of Botany, University of Toronto
 Toronto, Ontario, Kanada, M5S 3 B2
 Tel.: +1-416-978-3641
 Fax: +1-416-978-5878
 e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
<http://www.botany.utoronto.ca/utcc>

North Carolina State University
 Forestry Dept
 Duckweed Culture Collection
 Campus Box 8002
 Raleigh, NC 27695-8002
 USA
 Tel.: 001 (919) 515-7572
 astomp@unity.ncsu.edu

Institutionen före tillämpad miljövetenskap (ITM) Stockholms universitet
 SE-106 91 Stockholm
 ŠVÉDSKO
 Tel.: +46 86747240
 Fax: +46 86747636

Umweltbundesamt (UBA)
 FG III 3.4
 Schichauweg 58
 12307 Berlin
 Německo
 e-mail: lemna@uba.de
<http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm>

Literatura

- (1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. *The Botanical Review*, 27:221–287.
- (2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.
- (3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.
- (4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution*, Ser B, 11:1–14.
- (5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research*, 52:7–22.

▼ M1*Dodatek 2***Uchovávání zásobní kultury**

Zásobní kultury lze uchovávat za nízkých teplot (4–10 °C) po delší dobu, aniž by bylo zapotřebí je znovu zakládat. Růstové médium pro *Lemna* může být stejné jako médium používané ke zkoušení, ale pro zásobní kultury lze použít jiná média bohatá na živiny.

Pravidelně se odebere několik mladých, světlezelených rostlin a aseptickým postupem se umístí do nových kultivačních nádob obsahujících čerstvé médium. Za chladnějších podmínek, které se zde navrhují, lze provádět tvorbu dílčích kultur v intervalech až do tří měsíců.

Je třeba používat chemicky čisté (kyselinou promyté) a sterilní skleněné kultivační nádoby a pracovat aseptickými manipulačními postupy. V případě kontaminace zásobní kultury např. řasami či kvasinkami, je nezbytné přijmout opatření na odstranění kontaminujících organismů. V případě řas a většiny dalších kontaminujících organismů toho lze dosáhnout povrchovou sterilizací. Odebere se vzorek kontaminovaného rostlinného materiálu a odřízne se kořeny. Materiál se poté intenzivně protřepává v čisté vodě, poté následuje ponoření do 0,5 % (obj.) roztoku chlornanu sodného po dobu 30 sekund až 5 minut. Rostlinný materiál se dále opláche sterilní vodou a převede se jako řada vsázek do kultivačních nádob obsahujících čerstvé růstové médium. Mnoho lístků v důsledku tohoto ošetření odumře, zejména použijí-li se delší expoziční doby, ale některé z přeživších rostlin budou obvykle zbaveny kontaminace. Ty lze poté použít pro přeočkování nových kultur.

▼ **M1**

Dodatek 3

Média

Pro *L. minor* a *L. gibba* se doporučují různá růstová média. Pro *L. minor* se doporučuje upravené švédské standardní (SIS) médium, zatímco pro *L. gibba* se doporučuje médium 20X AAP. Složení obou médií je uvedeno níže. Při přípravě těchto médií je zapotřebí používat chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu.

Švédské standardní (SIS) růstové médium pro *Lemma*

- Zásobní roztoky I–V se sterilizují v autoklávu (120 °C, 15 minut) nebo membránovou filtrací (přibližná velikost pórů 0,2 µm).
- Zásobní roztok VI (a případně VII) se sterilizují pouze membránovou filtrací, neautoklávuji se.
- Sterilní zásobní roztoky se skladují v chladu a temnu. Zásobní roztoky I až V je třeba zlikvidovat po šesti měsících, zatímco zásobní roztoky VI (a případně VII) mají životnost jeden měsíc.

Zásobní roztok č.	Látka	Koncentrace v zásobním roztoku (g.l ⁻¹)	Koncentrace v připraveném médiu (mg.l ⁻¹)	Připravené médium	
				Prvek	Koncentrace (mg.l ⁻¹)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ • 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ • 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ • 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ • 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ • 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA•2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (pufr)	490	490	—	—

— Pro přípravu jednoho litru média SIS se do 900 ml deionizované vody přidá:

- 10 ml zásobního roztoku I,
- 5 ml zásobního roztoku II,
- 5 ml zásobního roztoku III,
- 5 ml zásobního roztoku IV,

▼ **M1**

- 1 ml zásobního roztoku V,
- 5 ml zásobního roztoku VI,
- 1 ml zásobního roztoku VII (volitelné).

Poznámka: Pro některé zkoušené látky možná bude zapotřebí další zásobní roztok VII (pufr MOPS) (viz bod 1.4 poslední odstavce).

- pH se upraví na $6,5 \pm 0,2$ přidáním 0,1M nebo 1M-HCl nebo NaOH a objem se doplní deionizovanou vodou do jednoho litru.

Růstové médium 20X AAP

Zásobní roztoky se připravují ve sterilní destilované nebo deionizované vodě.

Sterilní zásobní roztoky se skladují v chladu a temnu. Za těchto podmínek budou mít zásobní roztoky životnost nejméně 6 až 8 týdnů.

Pro médium 20X AAP se připraví pět zásobních roztoků živin (A1, A2, A3, B a C), přičemž se použijí chemické látky na úrovni činidel. Růstové médium se vytvoří přidáním 20 ml každého zásobního roztoku živin do přibližně 850 ml deionizované vody. pH se upraví na $7,5 \pm 0,1$ přidáním 0,1M nebo 1M-HCl nebo NaOH a objem se doplní do jednoho litru deionizovanou vodou. Médium se poté filtruje přes (přibližně) 0,2 μ m membránový filtr do sterilního zásobníku.

Růstové médium určené ke zkoušení by se mělo připravovat 1 až 2 dny před použitím, aby se mohlo stabilizovat pH. pH růstového média by se před použitím mělo zkontrolovat a znovu upravit, bude-li to nezbytné, přidávkem 0,1M nebo 1M-NaOH či HCl, jak je popsáno výše.

Zásobní roztok č.	Látka	Koncentrace v zásobním roztoku (g.l ⁻¹) (*)	Koncentrace v připraveném médiu (mg.l ⁻¹) (*)	Připravené médium	
				Prvek	Koncentrace (mg.l ⁻¹) (*)
A1	NaNO ₃	26	510	Na; N	190; 84
	MgCl ₂ •6H ₂ O	12	240	Mg	58,08
	CaCl ₂ •2H ₂ O	4,4	90	Ca	24,04
A2	MgSO ₄ •7H ₂ O	15	290	S	38,22
A3	K ₂ HPO ₄ •3H ₂ O	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H ₃ BO ₃	0,19	3,7	B	0,65
	MnCl ₂ •4H ₂ O	0,42	8,3	Mn	2,3
	FeCl ₃ •6H ₂ O	0,16	3,2	Fe	0,66
	Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0,30	6,0	—	—
	ZnCl ₂	3,3 mg.l ⁻¹	66 μ g.l ⁻¹	Zn	31 μ g.l ⁻¹
	CoCl ₂ •6H ₂ O	1,4 mg.l ⁻¹	29 μ g.l ⁻¹	Co	7,1 μ g.l ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	7,3 mg.l ⁻¹	145 μ g.l ⁻¹	Mo	58 μ g.l ⁻¹
CuCl ₂ •2H ₂ O	0,012 mg.l ⁻¹	0,24 μ g.l ⁻¹	Cu	0,080 μ g.l ⁻¹	
C	NaHCO ₃	15	300	Na; C	220; 43

(*) Pokud není uvedeno jinak.

▼ **M1**

Poznámka pod čarou: Teoreticky správná konečná koncentrace hydrogenuhličitanu (při nižší není nutná výrazná úprava pH) je 15 mg/l, nikoliv 300 mg/l. Ovšem historické používání média 20X AAP včetně kruhové zkoušky pro tuto metodu je založeno na 300 mg/l. (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemma* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency).

STEINBERGOVO médium (podle ISO 20079)*Koncentrace a zásobní roztoky*

— Upravené Steinbergovo médium se v normě ISO 20079 používá pouze pro *Lemma minor* (protože uvedená norma povoluje pouze *Lemma minor*), ale zkoušky ukázaly, že by se mohlo dosáhnout dobrých výsledků i s *Lemma gibba*.

— Při přípravě média je zapotřebí používat chemické látky analytické čistoty nebo na úrovni činidel a deionizovanou vodu.

— Připravte živné médium ze zásobních roztoků nebo desetinasobně koncentrovaného média, které umožňuje maximální koncentraci média bez srážení.

Tabulka 1

STEINBERGOVO médium se stabilizovaným pH (upraveno podle Altenburgera)

Látka		Živné médium	
Makroprvky	molekulová hmotnost	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41
Mikroprvky	molekulová hmotnost	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
dinatrium-EDTA dihydrát	372,24	1 500,00	4,03

▼ **M1**

Tabulka 2

Zásobní roztoky (makroprvky)

1. Makroprvky (50 násobně koncentrované)	g/l
<i>Zásobní roztok 1:</i>	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
<i>Zásobní roztok 2:</i>	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
<i>Zásobní roztok 3:</i>	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabulka 3

Zásobní roztoky (mikroprvky)

2. Mikroprvky (1 000 násobně koncentrované)	mg/l
<i>Zásobní roztok 4:</i>	
H ₃ BO ₃	120,0
<i>Zásobní roztok 5:</i>	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
<i>Zásobní roztok 6:</i>	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
<i>Zásobní roztok 7:</i>	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
<i>Zásobní roztok 8:</i>	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
Ethylendiamintetraoctan dvojsodný-dihydrát	1 500,00

— Zásobní roztoky 2 a 3 a odděleně 4 až 7 lze sdružovat (při zohlednění požadovaných koncentrací).

— K dosažení delší životnosti autoklávuje zásobní roztoky při teplotě 121 °C po dobu 20 minut nebo alternativně proveďte sterilní filtraci (0,2 µm). U zásobního roztoku 8 se důrazně doporučuje sterilní filtrace (0,2 µm).

Příprava konečné koncentrace STEINBERGOVA média (upraveného)

— Přidejte 20 ml zásobních roztoků 1, 2 a 3 (viz tabulka 2) do přibližně 900 ml deionizované vody, aby se zabránilo srážení.

— Přidejte 1,0 ml zásobních roztoků 4, 5, 6, 7 a 8 (viz tabulka 3).

— pH by mělo být 5,5 ± 0,2 (upravte přidáním minimálního objemu roztoku NaOH nebo HCl).

▼ M1

- Doplňte vodou do 1 000 ml.
- Jestliže se zásobní roztoky sterilizují a použije-li se vhodná voda, žádná další sterilizace není zapotřebí. Pokud se sterilizuje konečné médium, zásobní roztok 8 se přidá po autoklávování (při teplotě 121 °C po dobu 20 min).

Příprava 10násobně koncentrovaného STEINBERGOVA média (upraveného) pro přechodné uložení

- Přidejte 20 ml zásobních roztoků 1, 2 a 3 (viz tabulka 2) do přibližně 30 ml vody, aby se zabránilo srážení.
- Přidejte 1,0 ml zásobních roztoků 4, 5, 6, 7 a 8 (viz tabulka 3). Doplňte vodou do 100 ml.
- Jestliže se zásobní roztoky sterilizují a použije-li se vhodná voda, žádná další sterilizace není zapotřebí. Pokud se sterilizuje konečné médium, zásobní roztok 8 se přidá po autoklávování (při teplotě 121 °C po dobu 20 minut).
- pH média (konečná koncentrace) by mělo být $5,5 \pm 0,2$.