

A.18. POLYMEERIEN LUKUKESKIMÄÄRÄINEN MOLEKYYLIPAINO JA MOLEKYYLIPAINOJAKAUMA

1. MENETELMÄ

Tämä geelipermeaatiokromatografiamenetelmä (GPC) on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 118 (1996). Menetelmän periaatteet ja teknisiä lisätietoja on viitteessä (1).

1.1. JOHDANTO

Koska polymeerien ominaisuudet ovat hyvin vaihtelevia, on mahdotonta antaa yhtä ainoaa menetelmää ja täsmällisiä erotus- ja arviointiohjeita, jotka sopisivat kaikkiin polymeerien erotuksessa mahdollisesti esiintyviin tapauksiin. Erityisesti monimutkaisia polymeeriseoksia voi olla mahdoton erottaa geelipermeaatiomenetelmällä. Jos GPC:tä ei voi käyttää, voidaan molekyylipaino määrittää muilla tavoilla (katso liite). Tällaisissa tapauksissa on käytetystä menetelmästä annettava yksityiskohtaiset tiedot ja perustelut on esitettävä.

Jäljempänä esitettävä menetelmä perustuu DIN-standardiin 55672 (1). Yksityiskohtaiset ohjeet kokeiden suorittamiseksi ja tulostena arvioimiseksi annetaan kyseisessä DIN-standardissa. Jos koeolosuhteita täytyy muuttaa, on muutokset perusteltava. Muita standardeja saa käyttää, jos niistä annetaan täydelliset viitteet. Tässä menetelmässä käytetään kalibrointiin polystyreeninäytteitä, johon sisältyvien polymeerien koot tunnetaan, ja menetelmää voi joutua muuttamaan, jotta sitä voitaisiin käyttää tietyille polymeereille, esim. vesiliukoisille ja pitkäketjuisille haaraantuville polymeereille.

1.2. MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Lukukeskimääräinen molekyylipaino M_n ja painokeskimääräinen molekyylipaino M_w määritetään seuraavilla yhtälöillä:

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

joissa

H_i on detektorisignaalin korkeus perustasosta retentiotilavuudelle V_i ,
 M_i on retentiotilavuutta V_i vastaava polymeerifraktion molekyylipaino ja
 n on mittauspisteiden lukumäärä.

Molekyylipainojakauman leveys, joka kuvastaa seoksen dispersiivisyyttä, saadaan suhteesta M_w/M_n .

1.3. VERTAILUAINEET

Koska GPC on suhteellinen menetelmä, on tehtävä kalibrointi. Tähän käytetään tavallisesti kokojakaumaltaan kapeita lineaarisia polystyreenistandardeja, joiden keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w sekä molekyylipainojakauma tunnetaan. Kalibroitikäyrää voidaan käyttää tuntemattoman näytteen molekyylipainon määrittämiseen vain, jos näytteen ja standardin erotusolosuhteet on valittu samalla tavalla.

Molekyylipainon ja eluotiotilavuuden suhde on validi ainoastaan tietyn kokeen tietyissä koeolosuhteissa. Tärkeitä tekijöitä ovat ennen kaikkea lämpötila, liuotin (tai liuotinseos), kromatografiajärjestely sekä erotuspylväs tai pylväsjärjestelmä.

Tällä tavoin määritetyt näytteen molekyylipainot ovat suhteellisia arvoja ja niistä käytetään nimitystä "polystyreeniekvivalenttimolekyylipaino". Tämä tarkoittaa sitä, että riippuen näytteen ja standardien rakenne-eroista ja kemiallisista eroista molekyylipainot voivat poiketa absoluuttisista arvoista enemmän tai vähemmän. Jos käytetään muita standardeja, esim. polyetyleeniglykolia, polyetyleenioksidia, polymetyylimetakrylaattia tai polyakryylihappoa, on syy ilmoitettava.

1.4. TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Sekä näytteen molekyylipainojakauma että keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w voidaan määrittää GPC:llä. GPC on erityinen nestekromatografian laji, jossa näytteen erottaminen perustuu seoksen yksittäisten aineiden hydrodynaamisiin tilavuuksiin (2).

Erottuminen tapahtuu, kun näyte kulkee huokoisella aineella, tyypillisesti orgaanisella geelillä täytetyn pylvään läpi. Pienet molekyylit tunkeutuvat huokosiin, kun taas suuret molekyylit jäävät huokosten ulkopuolelle. Isojen molekyylien kulkema tie on siten lyhyempi ja ne tulevat ensimmäisenä ulos pylvästä. Keskikokoiset molekyylit tunkeutuvat joihinkin huokosiin ja eluotuvat myöhemmin. Pienimmät molekyylit, joiden keskimääräinen hydrodynaaminen säde on pienempi kuin geelin huokokset, voivat tunkeutua kaikkiin huokosiin. Ne eluotuvat viimeisinä.

Ihanteellisessa tilanteessa erottumiseen vaikuttaa ainoastaan molekyyli­lajin koko, mutta käytännössä on vaikea välttää ainakin jonkin verran adsorptiosta aiheutuvaa haittaa. Epätasaisesti pakattu pylväs ja kuolleet tilavuudet voivat pahentaa tilannetta (2).

Detektorina käytetään esim. taitekerroin- tai UV-detektoria, ja tuloksena saadaan yksinkertainen jakaumakäyrä. Jotta käyrästä voidaan lukea oikeita molekyyli­painoja, on pylväs kalibroitava molekyyli­painoltaan tunnetuilla polymeereillä, joilla on mieluiten suunnilleen samanlainen rakenne, esim. erilaiset polystyreenistandardit. Tuloksena on tyypillisesti Gaussin käyrä, joka on joskus vääristynyt siten, että pienen molekyyli­painon puolella on "häntä"; pystysuoralla akselilla on eluotujen molekyyli­lajien määrät painomitoissa ja vaaka-akselilla molekyyli­painon logaritmi.

1.5. LAATUKRITEERIT

Eluotiotilavuuden toistettavuuden (keskihajonnan keskivirhe: RSD) olisi oltava parempi kuin 0,3 %. Määrittämisen vaadittu toistettavuus on varmistettava sisäistä standardia käyttämällä, jos kromatogrammin arviointi on aikariippuvainen eikä täytä edellä mainittuja kriteerejä (1). Polydispersiivisyys riippuu standardien molekyyli­painoista. Polystyreenistandardien osalta tyypillisiä arvoja ovat:

$$M_p < 2000 \quad M_w/M_n < 1.20$$

$$2000 \leq M_p \leq 10^6 \quad M_w/M_n < 1.05$$

$$M_p > 10^6 \quad M_w/M_n < 1.20$$

(M_p on standardin molekyyli­paino piikin maksimissa).

1.6. TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1. Polystyreenistandardiliuosten valmistus

Polystyreenistandardit liuotetaan sekoittamalla huolellisesti haluttuun eluotintiliuokseen. Valmistajan ohjeet on otettava huomioon liuosten valmistuksessa.

Valittujen standardien pitoisuudet riippuvat eri tekijöistä, esim. injektio­tilavuudesta, liuoksen viskositeetistä ja detektorin herkkyydestä. Suurin injektio­tilavuus on sovitettava pylvään pituuden mukaan, ettei pylvästä kuormiteta liikaa. Tyypilliset injektio­tilavuudet käytettäessä GPC:tä analyttisiin erotuksiin pylväessä, jonka koko on 30 cm x 7.8 mm, ovat tavallisesti 40 - 100 µl. Suuremmat tilavuudet ovat mahdollisia, mutta eivät saisi olla enemmän kuin 250 µl. Injektio­tilavuuden ja aineen pitoisuuden paras suhde on määritettävä ennen pylvään varsinaista kalibrointia.

1.6.2. Näyteliuoksen valmistus

Periaatteessa samat vaatimukset koskevat näyteliuosten valmistamista. Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen (esim. tetrahydrofuraaniin (THF)) ravistamalla huolellisesti. Sitä ei saa missään tapauksessa liuottaa ultraäänihauuteessa. Tarpeen vaatiessa näyte puhdistetaan suodattamalla kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2 -2 µm.

Jos näytteessä on liukenemattomia hiukkasia, on tämä kirjattava loppuraporttiin, koska se saattaa johtua suurikokoisista molekyyleistä. Liukenemattomien hiukkasten painoprosenttiosuus on määritettävä jollakin sopivalla menetelmällä. Liuokset on käytettävä vuorokauden sisällä.

1.6.3. Laitteisto

- liuotinsäiliö
- kaasunpoistolaite (tarvittaessa)
- pumppu
- pulssinvaimennin (tarvittaessa)
- injektiojärjestelmä
- kromatografiapylväät
- ilmaisimien (detektorien)
- virtausmittari (tarvittaessa)
- tulosten tallennus/prosessointilaite
- jäteastia

On varmistettava, että GPC-laitteisto ei reagoi käytettävien liuottimien kanssa (esim. THF:n kanssa on käytettävä teräskapillaareja).

1.6.4. Injektiojärjestelmä ja liuottimen annostelu- ja virtausjärjestelmä

Määrätty näytetilavuus syötetään pylväeseen joko automaattisella näytteensyöttölaitteella tai käsin tarkasti määriteltynä vyöhykkeeseen. Jos ruiskun mäntää vedetään tai työnnetään liian nopeasti, se voi aiheuttaa muutoksia havaitussa molekyylipainojakaumassa. Liuotinta pumppaavien pumppujen olisi oltava mahdollisimman tasaisia ja niissä saisi mieluiten olla pulssinvaimennin. Virtausnopeuden pitäisi olla noin 1 ml/min.

1.6.5. Pylväs

Näytteestä riippuen polymeerin ominaisuudet määritetään käyttäen joko yhtä pylvästä tai useita peräkkäin kytkettyjä pylväitä. Kaupallisesti on saatavilla lukuisia pylväsmateriaaleja, joiden ominaisuudet on määritetty (esim. huokoskoko, ekskluusiorajat). Erotusgeelin ja pylvään pituuden valinta riippuu sekä näytteen ominaisuuksista (hydrodynaamiset tilavuudet, molekyylipainojakauma) että erotuksen erityisvaatimuksista kuten liuotimesta, lämpötilasta ja virtausnopeudesta (1) (2) (3).

1.6.6. Teoreettiset levyt

Käytettävästä pylvästä tai pylväsyhdistelmästä on tiedettävä teoreettisten levyjen lukumäärä. Tätä varten syötetään pituudeltaan tunnettuun pylväeseen - jos THF on eluutioliuotin - etyylibentseeniliuosta tai muuta sopivaa ei-polaarista liuotinta. Teoreettisten levyjen lukumäärä saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$N = 554 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{tai} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

jossa

N on teoreettisten levyjen lukumäärä

V_e on eluutiotilavuus piikin maksimin kohdalla

W on piikin leveys perusviivalla

$W_{1/2}$ on piikin leveys piikin korkeuden puolivälissä.

1.6.7. Erotusteho

Teoreettisten levyjen lukumäärän lisäksi, joka on vyöhykkeen leveyden määräävä suure, myös erotusteholla on osansa. Erotustehon määrää kalibraatiokäyrän jyrkkyys. Pylvään erotusteho saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6.0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right],$$

jossa

$V_{e,Mx}$ on sellaisen polystyreenin, jonka molekyylipaino on M_x , eluutiotilavuus

$V_{e,(10Mx)}$ on molekyylipainoltaan kymmenen kertaa suuremman polystyreenin eluutiotilavuus.

Järjestelmän erotuskyky määritellään yleensä seuraavasti:

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

jossa

V_{e1} , V_{e2} ovat kahden polystyreenistandardin eluutiotilavuudet piikin maksimissa

W_1 , W_2 ovat piikin leveydet perusviivalla

M_1 , M_2 ovat molekyylipainot piikin maksimissa (niiden ero pitäisi olla vähintään 10-kertainen).

Pylvään R-arvon olisi oltava suurempi kuin 1,7 (4).

1.6.8. Liuottimet

Kaikkien liuottimien on oltava korkeaa puhtauslaatua (THF:n puhtaus 99,5 %). Liuotinastian (tarvittaessa inertissä kaasussa) on oltava riittävän iso pylvään kalibroimiseen ja useiden näytteiden määrittämiseen. Liuottimesta on poistettava kaasut ennen kuin sitä pumpataan pylvääseen.

1.6.9. Lämpötilansäätö

Tärkeiden laitteiston sisäisten osien (injektiosilmukka, pylväät, detektorit ja letkut/putket) lämpötilan olisi oltava vakaa ja valitulle liuottimelle sopiva.

1.6.10. Detektorit

Detektorin tarkoitus on mitata pylväästä tulevan näytteen pitoisuus. Jotta piikit eivät leviäisi tarpeettomasti, on detektorin mittauskäytin tilavuuden oltava mahdollisimman pieni. Se ei saisi olla suurempi kuin 10 μl paitsi valon sirontaa tai viskositeettia mittaavilla detektoreilla. Detektorina käytetään tavallisesti differentiaalirefraktometriä. Muitakin detektoreja, esim. UV/VIS-, IR- ja viskositeettidetektoreja voidaan käyttää, mikäli näytteen tai eluutioliuottimen erityiset ominaisuudet edellyttävät sitä.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1. MÄÄRITYSTULOKSET

Yksityiskohtaisten arviointiperusteiden samoin kuin määritystulosten keräämisen ja käsittelyn osalta on noudatettava DIN-standardin (1) määräyksiä.

Kustakin näytteestä tehdään kaksi erillistä koetta, jotka on analysoitava erikseen.

M_n , M_w , M_w/M_n ja M_p on ilmoitettava jokaisesta mittauksesta. On ilmoitettava selvästi, että mitatut arvot ovat suhteellisia arvoja, jotka ovat suhteessa käytettyjen standardien molekyylipainoihin.

Kun retentiotilavuudet tai retentioajat (mahdollisesti korjattuina sisäisten standardien suhteen) on määritetty, esitetään $\log M_p$ -arvot (M_p on kalibrointistandardin piikin korkein kohta) jonkin edellä mainitun suureen funktiona. Kutakin molekyylipainon kymmenen potenssia kohti tarvitaan vähintään kaksi kalibrointipistettä ja koko käyrällä on oltava vähintään viisi mittauspistettä, joiden pitäisi kattaa näytteen arvioitu molekyylipainoalue. Kalibrointikäyrän loppupiste pienen molekyylipainon päässä määritetään n-heksyylibentseenin tai jonkin muun sopivan ei-polaarisella liuottimen avulla. M_n ja M_w määritetään tavallisesti tietokoneella osastossa 1.2 esitettyjen kaavojen perusteella. Jos käytetään manuaalista digitointia, voidaan ohjeeksi katsoa menetelmää ASTM D 3536-91 (3).

Jakaumakäyrä on esitettävä taulukon tai kuvan muodossa (differentiaalinen taajuus tai summaprocenttiosuudet $\log M$:n funktiona). Graafisessa esityksessä yksi molekyylipainon kymmenen potenssi pitäisi olla tavallisesti noin 4 cm leveä ja piikin maksimin pitäisi olla noin 8 cm korkea. Koko jakaumakäyrän osalta y-akselin korkeuden 0 ja 100 %:n välillä olisi oltava noin 10 cm.

2.2. TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat asiat:

2.2.1. Testattava aine

- saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet);
- näytteen käsittelyn kuvaus, mahdolliset huomiot ja ongelmat.

2.2.2. Laitteisto

- eluentisäiliö, inertti kaasu, kaasun poisto eluentista, eluutin koostumus, epäpuhtaudet
- pumppu, pulssinvaimennin, injektiojärjestelmä
- erotuspylväät (valmistaja, kaikki tiedot pylväiden ominaisuuksista kuten huokoskoko, erotusmateriaalin tyyppi jne, käytettävien pylväiden lukumäärä, pituus ja järjestys)
- pylvään (tai pylväsyhdistelmän) teoreettisten levyjen lukumäärä, erotusteho (järjestelmän erotuskyky)
- piikkien symmetriaa koskevat tiedot
- pylvään lämpötila, lämpötilan säätötapa
- detektori (mittausperiaate, tyyppi, kyvetin tilavuus)
- mahdollinen virtausmittari (valmistaja, mittausperiaate)
- mittaustulosten tallennus- ja käsittelyjärjestelmä (laitteet ja ohjelmat)

2.2.3. Järjestelmän kalibrointi

- kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyn menetelmän tarkka kuvaus
- tiedot menetelmän laatuksiteereistä (esim. korrelaatiokerroin, jäännösneliösumma jne.)
- tiedot kaikista kokeen aikana sekä tulosten arvioinnissa ja käsittelyssä suoritetuista ekstrapolaatioista, oletuksista ja aproksimaatioista
- kaikki kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyt mittaukset on esitettävä taulukossa, jossa esitetään myös seuraavat tiedot kustakin kalibrointipisteestä:

- näytteen nimi
- aineen valmistaja
- valmistajan ilmoittamat tai mittauksista johdetut standardien M_p , M_n , M_w ja M_w/M_n ominaisarvot sekä tarkat tiedot niiden määrittämenetelmästä
- injektioilavuus ja injektoitavan liuoksen pitoisuus
- kalibrointiin käytetty M_p arvo
- eluutioilavuus tai piikin maksimissa mitattu korjattu retentioaika
- piikin maksimissa laskettu M_p
- laskemalla saadun M_p :n ja kalibrointi-arvon prosenttivarhe

2.2.4.

Arviointi

- aikaperusteinen arviointi: toistettavuuden varmistamiseen käytetyt menetelmät (korjausmenetelmä, sisäinen standardi jne.)
- suoritetaanko arviointi eluutioilavuuden vai retentioajan perusteella
- tiedot arvion rajoituksista, jos piikkiä ei analysoida täydellisesti
- mahdollisten tasoitusmenetelmien kuvaus
- näytteen valmistus ja esikäsitteily
- mahdolliset liukenemattomat hiukkaset
- injektioilavuus (μl) ja injektoitavan näytteen pitoisuus (mg/ml)
- huomiot seikoista, joista aiheutuu poikkeamista ihanteellisesta GPC-käyttäytymisestä
- tarkka kuvaus kaikista testausmenetelmien muutoksista
- virherajoja koskevat yksityiskohtaiset tiedot
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomiot.

3. KIRJALLISUUSVIITTEET

- (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.

LIITE

ESIMERKKEJÄ MUISTA MENETELMISTÄ POLYMEERIEEN

LUKUKESKIMÄÄRÄISEN MOLEKYYLIPAINON (M_n) MÄÄRITTÄMISEKSI

Geelipermeaatiokromatografia (GPC) on paras menetelmä M_n :n määrittämiseksi, erityisesti jos on käytettävissä sarja standardeja, joiden rakenne vastaa polymeerin rakennetta. Jos kuitenkin GPC:n käytössä on käytännön hankaluuksia tai on odotettavissa, että aine ei täytä säädettyä M_n -kriteeriä (joka on varmistettava), voidaan käyttää muita menetelmiä, kuten

1. Kolligatiivisten ominaisuuksien käyttö

- 1.1 **Ebullioskopia/krvoskopia:** Tässä mitataan kiehumispisteen ylenemä (ebullioskopia) tai jäämispisteen alenema (kryoskopia), kun liuokseen lisätään tutkittavaa polymeeriä. Menetelmä perustuu siihen, että liuenneen polymeerin vaikutus nesteen kiehumis/jäämispisteeseen riippuu polymeeri molekyylipainosta(1)(2).

Soveltamisala: $M_n < 20,000$

- 1.2 **Höyrynpaineen aleneminen:** Tässä mitataan valitun vertailuaineen höyrynpaine ennen ja jälkeen, kun on lisätty tunnettu määrä polymeeriä (1)(2).

Soveltamisala: $M_n < 20,000$ (teoreettisesti; käytännössä tästä menetelmästä on vähän hyötyä)

- 1.3 **Kalvo-osmometria:** Tämä menetelmä perustuu osmoosiin, ts. liuotinmolekyylien luonnolliseen taipumukseen diffundoitua puoliläpäisevän kalvon läpi laimeasta väkevään liuokseen päin tasapainon saavuttamiseksi. Testin laimeassa liuoksessa ei ole lainkaan polymeeriä, ja väkevä liuos sisältää polymeeriä. Kun liuos menee kalvon läpi, muodostuu paine-ero, joka riippuu polymeerin konsentraatiosta ja molekyylipainosta (1) (3) (4).

Soveltamisala: $M_n 20,000 - 200,000$

- 1.4 **Höyryfaasiosmometria:** Tässä menetelmässä verrataan puhtaan liuotinaerosolin haihtumisnopeutta vähintään kolmeen aerosoliin, joissa polymeerin pitoisuus vaihtelee (1) (5) (6).

Soveltamisala: $M_n < 20,000$

2. Pääteryhmäanalyysi

Jotta tätä menetelmää voitaisiin käyttää, on tunnettava sekä polymeerin koko rakenne että ketjujen päissä olevien ryhmien laatu (joka pitää voida olla erotettavissa päärakenteesta esim. NMR:llä tai titraamalla/derivatisoimalla). Kun määritetään polymeerissä olevien pääteryhmien molekulaarinen konsentraatio, voidaan johtaa arvo molekyylipainolle (7) (8) (9).

Soveltamisala: M_n korkeintaan 50 000 (luotettavuus vähenee molekyylipainon noustessa)

KIRJALLISUUSVIITTEET

- (1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.
- (2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.
- (3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (4) Coll, H. (1989). membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, pp. 25-52.
- (5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.
- (6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.
- (7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.
- (8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.
- (9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139-2146.

A.19. PIENIMOLEKYYYLISTEN AINEIDEN PITOISUUS POLYMEERISSÄ

1. MENETELMÄ

Tämä geelipermeaatiokromatografiamenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 119 (1996). Peruseriaatteet ja teknisiä lisätietoja saa kirjallisuusviitteistä.

1.1. JOHDANTO

Koska polymeerien ominaisuudet vaihtelevat suuresti, on mahdotonta kuvata yhtä ainoaa menetelmää, jossa selitettäisiin täsmällisesti kaikki polymeerien erotuksessa mahdollisesti esiintyvät erityiset seikat kattavat erotus- ja analysointiedellytykset. Erityisesti kompleksiset polymeerijärjestelmät eivät useinkaan sovi geelipermeaatiokromatografiaan. Kun GPC:tä ei voida käyttää, molekyylipaino voidaan määrittää muilla menetelmillä (katso Liite). Tällöin on esitettävä käytettyä menetelmää koskevat yksityiskohdat ja perustelut.

Seuraavassa kuvattava menetelmä perustuu DIN-standardiin 55672 (1). Tässä standardissa esitetään yksityiskohtaisesti, miten kokeet suoritetaan ja tulokset arvioidaan. Jos koeolosuhteita täytyy muuttaa, on muutokset perusteltava. Muita standardeja voi käyttää, jos niistä annetaan täydelliset viitteet. Tässä kuvattavassa menetelmässä käytetään tunnetun polydispersiivisyyden omaavia polystyreeninäytteitä kalibrointiin, ja menetelmää on mahdollisesti muutettava tiettyjä polymeerejä varten, esim. vesiliukoisia ja pitkäketjuisia haaraisia polymeerejä varten.

1.2. MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Matalaksi molekyylipainoksi määritellään pienempi kuin 1000 (daltonia).

M_n (lukukeskimääräinen molekyylipaino) ja M_w (painokeskimääräinen molekyylipaino) määritellään seuraavilla yhtälöillä:

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

joissa

H_i on detektorisignaalin korkeus perustasosta retentiotilavuudelle V_i ,

M_i on polymeerifraktion molekyylipaino retentiotilavuudessa V_i , ja

n on mittauspisteiden lukumäärä.

Molekyylipainojakauman leveys, joka on suhteessa järjestelmän dispersiivisyyteen, saadaan suhteesta M_w/M_n .

1.3. VERTAILUAINEET

Koska GPC on suhteellinen menetelmä, on tehtävä kalibrointi. Tähän käytetään tavallisesti kokojakaumaltaan kapeita lineaarisia polystyreenistandardeja, joiden keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w sekä molekyylipainojakauma tunnetaan. Kalibrointikäyrää voidaan käyttää tuntemattoman näytteen molekyylipainon määrittämiseen vain, jos näytteen ja standardin erotusolosuhteet on valittu samalla tavalla.

Molekyylipainon ja eluutiilavuuden suhde on validi ainoastaan tietyn kokeen tietyissä koeolosuhteissa. Tärkeitä tekijöitä ovat ennen kaikkea lämpötila, liuotin (tai liuotinseos), kromatografijärjestely sekä erotuspylväs tai pylväsjärjestelmä.

Tällä tavoin määritetyt näytteen molekyylipainot ovat suhteellisia arvoja ja niistä käytetään nimitystä "polystyreeniekvivalenttimolekyylipaino". Tämä tarkoittaa sitä, että riippuen näytteen ja standardien rakenne-eroista ja kemiallisista eroista molekyylipainot voivat poiketa absoluuttisista arvoista enemmän tai vähemmän. Jos käytetään muita standardeja, esim. polyetyleeniglykolia, polyetyleenioksidia, polymetyylimetakrylaattia tai polyakryylihappoa, on syy ilmoitettava.

1.4. TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Sekä näytteen molekyylipainojakauma että keskimääräiset molekyylipainot M_n ja M_w voidaan määrittää GPC:llä. GPC on erityinen nestekromatografian laji, jossa näytteen erottaminen perustuu seoksen yksittäisten aineiden hydrodynaamisiin tilavuuksiin (2).

Erottuminen tapahtuu, kun näyte kulkee huokoisella aineella, tyypillisesti orgaanisella geelillä täytetyn pylvään läpi. Pienet molekyylit tunkeutuvat huokosiin, kun taas suuret molekyylit jäävät huokosten ulkopuolelle. Isojen molekyylien kulkema tie on siten lyhyempi ja ne tulevat ensimmäisenä ulos pylvästä. Keskikokoiset molekyylit tunkeutuvat joihinkin huokosiin ja eluotuvat myöhemmin. Pienimmät molekyylit, joiden keskimääräinen hydrodynaaminen säde on pienempi kuin geelin huokokset, voivat tunkeutua kaikkiin huokosiin. Ne eluotuvat viimeisinä.

Ihanteellisessa tilanteessa erottumiseen vaikuttaa ainoastaan molekyyli­lajin koko, mutta käytännössä on vaikea välttää ainakin jonkin verran adsorptiosta aiheutuvaa haittaa. Epätasaisesti pakattu pylväs ja kuolleet tilavuudet voivat pahentaa tilannetta (2).

Detektorina käytetään esim. taitekerroin- tai UV-detektoria, ja tuloksena saadaan yksinkertainen jakaumakäyrä. Jotta käyrästä voidaan lukea oikeita molekyyli­painoja, on pylväs kalibroitava molekyyli­painoltaan tunnetuilla polymeereillä, joilla on mieluiten suunnilleen samanlainen rakenne, esim. erilaiset polystyreenistandardit. Tuloksena on tyypillisesti Gaussin käyrä, joka on joskus väärästynyt siten, että pienen molekyyli­painon puolella on "häntä"; pystysuoralla akselilla on eluotujen molekyyli­lajien määrät painomitoissa ja vaaka-akselilla molekyyli­painon logaritmi.

1.5. LAATUKRITEERIT

Eluotiotilavuuden toistettavuuden (keskihajonnan keskivirhe: RSD) olisi oltava parempi kuin 0,3 %. Määrittämisen vaadittu toistettavuus on varmistettava sisäistä standardia käyttämällä, jos kromatogrammin arviointi on aikariippuvainen eikä täytä edellä mainittuja kriteerejä (1). Polydispersiivisyys riippuu standardien molekyyli­painoista. Polystyreenistandardien osalta tyypillisiä arvoja ovat:

$$M_p < 2000 \qquad M_w/M_n < 1.20$$

$$2000 \leq M_p \leq 10^6 \qquad M_w/M_n < 1.05$$

$$M_p > 10^6 \qquad M_w/M_n < 1.20$$

(M_p on standardin molekyyli­paino piikin maksimissa).

1.6. TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1. Polystyreenistandardiliuosten valmistus

Polystyreenistandardit liuotetaan sekoittamalla huolellisesti haluttuun eluointiliuokseen. Valmistajan ohjeet on otettava huomioon liuosten valmistuksessa.

Valittujen standardien pitoisuudet riippuvat eri tekijöistä, esim. injektio­tilavuudesta, liuoksen viskositeetistä ja detektorin herkkyydestä. Suurin injektio­tilavuus on sovitettava pylvään pituuden mukaan, ettei pylvästä kuormiteta liikaa.

Tyypilliset injektio-tilavuudet käytettäessä GPC:tä analyttisiin erotuksiin pylväessä, jonka koko on 30 cm x 7.8 mm, ovat tavallisesti 40 - 100 µl. Suuremmat tilavuudet ovat mahdollisia, mutta eivät saisi olla enemmän kuin 250 µl. Injektio-tilavuuden ja aineen pitoisuuden paras suhde on määritettävä ennen pylvään varsinaista kalibrointia.

1.6.2. *Näyteliuoksen valmistus*

Periaatteessa samat vaatimukset koskevat näyteliuosten valmistamista. Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen (esim. tetrahydrofuraaniin (THF)) ravistamalla huolellisesti. Sitä ei saa missään tapauksessa liuottaa ultraäänihauteessa. Tarpeen vaatiessa näyte puhdistetaan suodattamalla kalvolla, jonka huokoskoko on 0,2 - 2 µm.

Jos näytteessä on liukenemattomia hiukkasia, on tämä kirjattava loppuraporttiin, koska se saattaa johtua suurikokoisista molekyyleistä. Liukenemattomien hiukkasten painoprosenttiosuus on määritettävä jollakin sopivalla menetelmällä. Liuokset on käytettävä vuorokauden sisällä.

1.6.3. *Epäpuhtauksista ja lisäaineista johtuvat korjaukset*

Molekyylipainoltaan alle 1000 olevien molekyylien suhteen on yleensä tehtävä korjaus, joka aiheutuu ei-polymeerisistä komponenteista (esim. epäpuhtaudet ja/tai lisäaineet), ellei pitoisuus jo ole pienempi kuin 1 %. Tämä tehdään analysoimalla suoraan polymeeriliuos tai GPC-eluaatti.

Jos eluaatti on pylvästä tultuaan liian laimea analysoitavaksi edelleen, se on konsentroitava. Voi olla tarpeen haihduttaa se kuiviin ja liuottaa uudelleen. Konsentroiminen on tehtävä siten, ettei eluaatissa tapahdu muutoksia. Eluaatin käsittely GPC-vaiheen jälkeen riippuu kvantitatiiviseen määrittämiseen käytettävästä analyttisestä menetelmästä.

1.6.4. *Laitteisto*

GPC-laitteistoon kuuluu seuraavat osat:

- liuotinsäiliö
- kaasunpoistolaite (tarvittaessa)
- pumppu
- pulssinvaimennin (tarvittaessa)
- injektiojärjestelmä
- kromatografiapylväät
- ilmaisimien (detektorien)
- virtausmittari (tarvittaessa)
- tulosten tallennus/prosessointilaite
- jätteastia

On varmistettava, että GPC-laitteisto ei reagoi käytettävien liuottimien kanssa (esim. THF:n kanssa on käytettävä teräskapillaareja).

1.6.5. *Injektiojärjestelmä ja liuottimen annostelujärjestelmä*

Määrätty näytetilavuus syötetään pylväeseen joko automaattisella näytteensyöttölaitteella tai käsin tarkasti määriteltynä vyöhykkeeseen. Jos ruiskun mäntää vedetään tai työnnetään liian nopeasti, se voi aiheuttaa muutoksia havaitussa molekyylipainojakaumassa. Liuotinta pumppaavien pumppujen olisi oltava mahdollisimman tasaisia ja niissä saisi mieluiten olla pulssinvaimennin. Virtausnopeuden pitäisi olla noin 1 ml/min.

1.6.6.*Pylväs*

Näytteestä riippuen polymeerin ominaisuudet määritetään käyttäen joko yhtä pylvästä tai useita peräkkäin kytkettyjä pylväitä. Kaupallisesti on saatavilla lukuisia pylväsmateriaaleja, joiden ominaisuudet on määritelty (esim. huokoskoko, eksklusiorajat). Erotusgeelin ja pylvään pituuden valinta riippuu sekä näytteen ominaisuuksista (hydrodynaamiset tilavuudet, molekyylipainojakauma) että erotuksen erityisvaatimuksista kuten liuottimesta, lämpötilasta ja virtausnopeudesta (1) (2) (3).

1.6.7.*Teoreettiset levyt*

Käytettävästä pylvästä tai pylväsyhdistelmästä on tiedettävä teoreettisten levyjen lukumäärä. Tätä varten syötetään pituudeltaan tunnettuun pylväeseen - jos THF on eluutioliuotin - etyylibentseeniliuosta tai muuta sopivaa ei-polaarista liuotinta. Teoreettisten levyjen lukumäärä saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$N = 554 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{or} \quad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

jossa

N on teoreettisten levyjen lukumäärä

V_e on eluutiotilavuus piikin maksimin kohdalla

W on piikin leveys perusviivalla

$W_{1/2}$ on piikin leveys piikin korkeuden puolivälissä.

1.6.8.*Erotusteho*

Teoreettisten levyjen lukumäärän lisäksi, joka on vyöhykkeen leveyden määräävä suure, myös erotusteholla on osansa. Erotustehon määrää kalibraatiokäyrän jyrkkyys. Pylvään erotusteho saadaan seuraavasta yhtälöstä:

$$\frac{V_{e,Mx} - V_{e,(10Mx)}}{\text{cross sectional area of the column}} \geq 6.0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right],$$

jossa

$V_{e,Mx}$ on sellaisen polystyreenin, jonka molekyylipaino on M_x , eluutiotilavuus

$V_{e,(10Mx)}$ on molekyylipainoltaan kymmenen kertaa suuremman polystyreenin eluutiotilavuus.

Järjestelmän erotuskyky määritellään yleensä seuraavasti:

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

jossa

V_{e1} , V_{e2} ovat kahden polystyreenistandardin eluutiotilavuudet piikin maksimissa

W_1 , W_2 ovat piikin leveydet perusviivalla

M_1 , M_2 ovat molekyylipainot piikin maksimissa (niiden ero pitäisi olla vähintään 10-kertainen).

Pylvään R-arvon olisi oltava suurempi kuin 1,7 (4).

1.6.9. *Liuottimet*

Kaikkien liuottimien on oltava korkeaa puhtauslaatua (THF:n puhtaus 99,5 %). Liuotinastian (tarvittaessa inertissä kaasussa) on oltava riittävän iso pylvään kalibroimiseen ja useiden näytteiden määrittämiseen. Liuottimesta on poistettava kaasut ennen kuin sitä pumpata an pylvääseen.

1.6.10. *Lämpötilansäätö*

Tärkeiden laitteiston sisäisten osien (injektiosilmukka, pylväät, detektori ja letkut/putket) lämpötilan olisi oltava vakaa ja valitulle liuottimelle sopiva.

1.6.11. *Detektori*

Detektorin tarkoitus on mitata pylväästä tulevan näytteen pitoisuus. Jotta piikit eivät leviäisi tarpeettomasti, on detektorin mittauskyvetin tilavuuden oltava mahdollisimman pieni. Se ei saisi olla suurempi kuin 10 µl paitsi valon sirontaa tai viskositeettia mittaavilla detektoreilla. Detektorina käytetään tavallisesti differentiaalirefraktometriä. Muitakin detektoreja, esim. UV/VIS-, IR- ja viskositeetidetektoreja voidaan käyttää, mikäli näytteen tai eluutioliuottimen erityiset ominaisuudet edellyttävät sitä.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1. Määrittystulokset

Yksityiskohtaisten arviointiperusteiden samoin kuin määrittystulosten keräämisen ja käsittelyn osalta on noudatettava DIN-standardin (1) määräyksiä.

Kustakin näytteestä tehdään kaksi erillistä koetta, jotka on analysoitava erikseen.

M_n , M_w , M_w/M_n ja M_p on ilmoitettava jokaisesta mittauksesta. On ilmoitettava selvästi, että mitatut arvot ovat suhteellisia arvoja, jotka ovat suhteessa käytettyjen standardien molekyylipainoihin.

Kun retentiotilavuudet tai retentioajat (mahdollisesti korjattuina sisäisten standardien suhteen) on määritetty, esitetään $\log M_p$ -arvot (M_p on kalibroitistandardin piikin korkein kohta) jonkin edellä mainitun suureen funktiona. Kutakin molekyylipainon kymmenen potenssia kohti tarvitaan vähintään kaksi kalibroitipistettä ja koko käyrällä on oltava vähintään viisi mittauspistettä, joiden pitäisi kattaa näytteen arvioitu molekyylipainoalue. Kalibroitikäyrän loppupiste pienen molekyylipainon päässä määritetään n-heksyylibentseenin tai jonkin muun sopivan ei-polaarisella liuottimen avulla. M_n ja M_w määritetään tavallisesti tietokoneella osastossa 1.2 esitettyjen kaavojen perusteella. Jos käytetään manuaalista digitointia, voidaan ohjeeksi katsoa menetelmää ASTM D 3536-91 (3).

Jakaumakäyrä on esitettävä taulukon tai kuvan muodossa (differentiaalinen taajuus tai summaprosenttiosuudet $\log M$:n funktiona). Graafisessa esityksessä yksi molekyylipainon kymmenen potenssi pitäisi olla tavallisesti noin 4 cm leveä ja piikin maksimin pitäisi olla noin 8 cm korkea. Koko jakaumakäyrän osalta y-akselin korkeuden 0 ja 100 %:n välillä olisi oltava noin 10 cm.

2.2. TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat asiat:

2.2.1.

Testattava aine

- saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet)
- näytteen käsittelyn kuvaus, mahdolliset huomiot ja ongelmat

2.2.2.

Laitteisto

- eluenttisäiliö, inertti kaasu, kaasun poisto eluentista, eluentin koostumus, epäpuhtaudet
- pumppu, pulssinvaimennin, injektiojärjestelmä
- erotuspylväät (valmistaja, kaikki tiedot pylväiden ominaisuuksista kuten huokoskoko, erotusmateriaalin tyyppi jne. käytettävien pylväiden lukumäärä, pituus ja järjestys)
- pylvään (tai pylväsyhdistelmän) teoreettisten levyjen lukumäärä, erotusteho (järjestelmän erotuskyky)
- piikkien symmetriaa koskevat tiedot
- pylvään lämpötila, lämpötilan säätötapa
- detektori (mittausperiaate, tyyppi, kyvetin tilavuus)
- mahdollinen virtausmittari (valmistaja, mittausperiaate)
- mittaustulosten tallennus- ja käsittelyjärjestelmä (laitteet ja ohjelmat)

2.2.3.

Järjestelmän kalibrointi

- kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyn menetelmän tarkka kuvaus
- tiedot menetelmän laatukriteereistä (esim. korrelaatiokerroin, jäännösumma jne.)
- tiedot kaikista kokeen aikana sekä tulosten arvioinnissa ja käsittelyssä suoritetuista ekstrapolaatioista, oletuksista ja aproksimaatioista
- kaikki kalibrointikäyrän määrittämiseksi käytetyt mittaukset on esitettävä taulukossa, jossa esitetään myös seuraavat tiedot kustakin kalibrointipisteestä:
 - näytteen nimi
 - aineen valmistaja
 - valmistajan ilmoittamat tai mittauksista johdetut standardien M_p , M_n , M_w ja M_w/M_n ominaisarvot sekä tarkat tiedot niiden määrittämisestä
 - injektio-tilavuus ja injektoidavan liuoksen pitoisuus
 - kalibrointiin käytetty M_p -arvo
 - eluutio-tilavuus tai piikin maksimissa mitattu korjattu retentioaika
 - piikin maksimissa laskettu M_p
 - laskemalla saadun M_p :n ja kalibrointi-arvon prosenttivirhe

2.2.4.

Tiedot pienimolekyylipainoisen polymeerin pitoisuudesta

- käytettyjen analyysimenetelmien kuvaus ja kokeiden suoritustapa
- tiedot pienimolekyylipainoisen aineen pitoisuusprosentista (w/w) suhteessa koko näytteeseen
- tiedot epäpuhtauksista, lisäaineista ja muista ei-polymeerisistä aineista painoprosenteina koko näytteestä.

2.2.5.

Arviointi

- aikaperusteinen arviointi: toistettavuuden varmistamiseen käytetyt menetelmät (korjausmenetelmä, sisäinen standardi jne.)

- suoritetaanko arviointi eluutiotilavuuden vai retentioajan perusteella
- tiedot arvion rajoituksista, jos piikkiä ei analysoida täydellisesti
- mahdollisten tasoitusmenetelmien kuvaus
- näytteen valmistus ja esikäsittely
- mahdolliset liukenemattomat hiukkaset
- injektio-tilavuus (μl) ja injektoidavan näytteen pitoisuus (mg/ml)
- huomiot seikoista, joista aiheutuu poikkeamista ihanteellisesta GPC-käyttäytymisestä
- tarkka kuvaus kaikista testausmenetelmien muutoksista
- virherajoja koskevat yksityiskohtaiset tiedot
- kaikki tulosten tulkintaan vaikuttavat tiedot ja huomiot.

3. KIRJALLISUUSVIITTEET

- (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.

LIITE

OHJEET PIENIMOLEKYYLIPAINOISTEN AINEIDEN PITOISUUDEN KORJAAMISEKSI, JOS

NÄYTTEESSÄ ON LIUKENEMATONTA POLYMEERIÄ

Jos näytteessä on liukenematonta polymeeriä, aiheuttaa se massakatoa GPC-analyysissä. Liukenematon polymeeri tarttuu pylvääseen tai näytesyodattimeen, kun taas näytteen liukoinen osa menee pylvään läpi. Jos polymeerin taitekerroindifferentiaali (inkrementti) (dn/dc) voidaan arvioida tai mitata, voidaan arvioida pylvääseen hävinnyt näytemassa. Tällöin tehdään korjaus ulkoisella kalibroinnilla käyttäen standardiaineita, joiden konsentraatio ja dn/dc tunnetaan, refraktometrin vasteen kalibroimiseksi. Seuraavassa esimerkissä käytetään poly(metyylimetakrylaatti) (pMMA) -standardia.

Akryylipolymeerianalyysin ulkoisessa kalibroinnissa analysoidaan tetrahydrofuraanissa oleva, tietyn konsentraation omaava pMMA-standardi GPC:llä, ja tuloksien avulla määritetään refraktometrivakio seuraavalla yhtälöllä:

$$K = R / (C \times V \times dn/dc),$$

jossa

K on refraktometrivakio (mikrovoltia-sekunti/ml),

R on pMMA-standardin vaste (mikrovoltia-sekunti),

C on pMMA-standardin konsentraatio (mg/ml),

V on injektiovolyymi (ml) ja

dn/dc on tetrahydrofuraanissa olevan pMMA-standardin taitekerroindifferentiaali (ml/mg).

Seuraavat tiedot ovat tyypillisiä pMMA-standardille:

$$R = 2937891$$

$$C = 1.07 \text{ mg/ml}$$

$$V = 0.1 \text{ ml}$$

$$dn/dc = 9 \times 10^{-5} \text{ ml/mg}$$

Tulokseksi saatua K-arvoa (3.05×10^{11}) käytetään sitten teoreettisen detektorivasteen laskemiseksi, kun oletetaan, että injisoitu polymeeri eluoituu detektorista 100-prosenttisesti.

A.20. VESILIUOKSESSA OLEVIEN POLYMEERIEN

LIUKENEMIS/UUTTUMISOMINAISUDET

1. MENETELMÄ

Seuraava menetelmä on toisinto OECD:n ohjeen N:o 120 (1997) muutetusta versiosta. Teknisiä lisätietoja on viitteessä (1).

1.1. JOHDANTO

Tietyille polymeereille, kuten emulsiopolymeerit, on tehtävä esikäsittelyjä ennen kuin seuraavassa selostettua menetelmää voi käyttää. Menetelmä ei sovellu nestemäisiin polymeereihin eikä veden kanssa testausolosuhteissa reagoiviin polymeereihin.

Jos menetelmä ei ole kohtuullisesti tai lainkaan mahdollinen, liukenemis/uuttumisominaisuuksia voi tutkia muilla menetelmillä. Tällöin on esitettävä käytetyn menetelmän yksityiskohdat ja perustelut.

1.2. VERTAILUAINEET

Ei vertailuaineita.

1.3. TESTAUSMENETELMÄN PERIAATE

Vesiliuoksessa olevien polymeerien liukenemis/uuttumisominaisuudet määritetään pullomenetelmällä (katso A.6 Vesiliukoisuus, pullomenetelmä) seuraavin muutoksin.

1.4. LAATUKRITEERIT

Ei laatukriteerejä.

1.5. TESTAUSMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1. *Laitteisto*

Menetelmässä tarvitaan seuraavat laitteet:

- murskauslaite, esim. jauhin, tietyn koon omaavien hiukkasten valmistamiseksi
- ravistelulaite, jossa on lämpötilansäätö
- kalvosuodatusjärjestelmä
- sopiva analyysilaitteisto
- standardisoidut seulat.

1.5.2. *Näytteen valmistus*

Edustava näyte on ensin saatettava hiukkaskokoon 0,125 - 0,25 mm sopivilla seuloilla. Näytteen stabiilisuuden varmistamiseksi tai jauhamisen aikana voidaan tarvita jäähdystä. Kumimaisia aineita voi murskata nestetyypilämpötilassa (1).

Jos vaadittua hiukkaskokoa ei voida saavuttaa, olisi pyrittävä saamaan hiukkaskoko mahdollisimman pieneksi, ja ilmoitettava tulos. Raportissa on selostettava, miten murskattua näytettä säilytettiin ennen testausta.

1.5.3.

Menetelmä

Kolme 10 gramman näytettä testattavaa ainetta punnitaan kolmeen pulloon, joissa on lasitulpat, ja 1000 ml vettä lisätään kuhunkin pulloon. Jos on hankala käsitellä 10 grammaa polymeeriä, käytetään suurempaa määrää ja lisätyn veden tilavuutta muutetaan vastaavasti.

Pullot suljetaan tiiviisti ja niitä ravistetaan 20 °C:ssa. Olisi käytettävä ravistelu- tai sekoituslaitetta, jonka lämpötila pysyy käytettäessä vakiona. Kunkin pullon sisältö sentrifugoidaan tai suodatetaan 24 tunnin kuluttua ja polymeerin pitoisuus kirkkaassa vesifaasissa määritetään sopivalla määrittämenetelmällä. Jos vesifaasille ei ole olemassa sopivaa määrittämenetelmää, kokonaisliukoisuus/uuttuvuus voidaan arvioida suodatusjäännöksen tai sentrifugoidun sakan kuivapainosta.

Tavallisesti on tehtävä kvantitatiivinen ero epäpuhtauksien ja lisäaineiden ja toisaalta pienimolekyylipainoisten aineiden välillä. Gravimetrisia määrittämiä tehtäessä on tärkeää tehdä myös nollakoe ilman testattavaa ainetta, jotta voidaan määrittää koemenetelmästä johtuvat jäämät.

Polymeerien liukenemis/uuttumisominaisuuksia vedessä 37 °C:ssa pH:ssa 2 ja 9 voidaan määrittää samalla tavalla kuin 20 °C:een kokeessa. pH-arvot voidaan säätää lisäämällä joko sopivia puskureita tai sopivia happoja tai emäksiä kuten suolahappoa, etikkahappoa, pro analyysi -laatuista natrium- tai kaliumhydroksidia tai NH₃:a.

Määrittämenetelmästä riippuen on tehtävä yksi tai kaksi testiä. Jos on olemassa riittävän spesifinen menetelmä polymeerikomponentin määrittämiseksi suoraan vesiliuoksesta, pitäisi yhden edellä kuvatun kaltaisen testin riittää. Jos tällaista menetelmää ei kuitenkaan ole käytettävissä ja jos polymeerin liukenemis/uuttumisominaisuuksien määrittäminen rajoittuu epäsuoraan analyysiin eli ainoastaan orgaanisen hiilen kokonaismäärän (TOC) määrittämiseen vesiuutteesta, pitäisi tehdä lisätesti. Tämä lisätesti pitäisi myös tehdä kolmoismäärittämiä käyttäen kymmenen kertaa pienempiä polymeerinäytteitä ja samaa määrää vettä kuin ensimmäisessä testissä.

1.5.4.

Määrittäminen

1.5.4.1.

Testi, jossa on yksi näytekokko

Menetelmiä vesifaasissa olevan polymeerikomponentin suoraa määrittämistä varten voi olla olemassa. Vaihtoehtoisesti voidaan harkita myös liuenneiden/uuttuneiden polymeerikomponenttien epäsuoraa analyysiä, jolloin määritetään liukoisten osien kokonaispitoisuus ja korjataan ei-polymeerispesifisten komponenttien suhteen.

Kokonaispolymeeri voidaan määrittää vesiliuoksesta:

joko riittävän herkällä menetelmällä, esim.

- TOC käyttämällä persulfaatti- tai dikromaattidigestiota, jolloin muodostuva CO₂ määritetään IR:llä tai kemiallisesti;
- atomiabsorptiospektrometrialla (AAS) tai ICP (inductively coupled plasma)-emissiomenetelmällä, jos polymeeri sisältää piitä tai metalleja;
- UV-absorptio- tai spektrofluorometrialla, jos on kyseessä aryyli- tai aryyli- polymeeri;
- LC-MS:llä, jos on kyseessä pienimolekyylipainoiset näytteet;

tai haihduttamalla vesiuute tyhjässä kuiviin ja tekemällä jäännöksestä spektroskooppinen (IR, UV jne.) tai AAS/ICP-analyysi.

Jos vesifaasia ei voida sellaisenaan analysoida, pitäisi vesiuute uuttaa veteen sekoittamalla orgaanisella liuottimella, esim. klooratulla hiilivedyllä. Liuotin haihdutetaan ja jäännöksestä määritetään ilmoitetun polymeerin pitoisuus kuten edellä on selostettu. Jos tässä jäännöksessä tunnistetaan epäpuhtauksia tai lisäaineita, on niiden osuus vähennettävä itse polymeerin liukenemis/uuttumisasteen määrittämiseksi.

Jos näytteessä on suhteellisen paljon tällaisia aineita, voi olla tarpeen tehdä jäännökselle esim. HPLC- tai GC-analyysi epäpuhtauksien erottamiseksi monomeeristä ja monomeeristä peräisin olevasta aineesta, jotta monomeerin todellinen pitoisuus voidaan määrittää.

Joskus voi riittää, että orgaaninen liuotin haihdutetaan kuiviin ja kuiva jäännös punnitaan.

1.5.4.2. **Testi, jossa on kaksi eri näytekoko**

Kaikista vesiuutteista määritetään TOC.

Näytteen liukenemattomalla osalle (joka ei uuttunut) tehdään gravimetrinen analyysi. Jos kunkin pullon sisällön sentrifugoinnin tai suodattamisen jälkeen polymeerijäännöksiä on tarttunut pullon seinämiin, pitäisi pullo huuhtoa suodoksella, kunnes siinä ei enää näy mitään jäännöstä. Sen jälkeen suodos sentrifugoidaan tai suodatetaan uudelleen. Suodattimeen tai sentrifuugiputkeen jäänyt jäännös kuivataan 40 °C:ssa tyhjässä ja punnitaan. Kuivaamista jatketaan, kunnes saavutetaan vakiopaino.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1. TESTI, JOSSA ON YKSI NÄYTEKOKO

Ilmoitetaan erilliset tulokset kutakin kolmea pulloa kohti ja keskiarvot ilmaistuna massayksiköllä liuostilavuutta kohti (tyypillisesti mg/l) tai massayksiköllä polymeerinäytteen massaa kohti (tyypillisesti mg/g). Lisäksi pitäisi ilmoittaa näytteen painohävikki (liunneen aineen paino jaettuna alkuperäisen näytteen painolla) Suhteelliset keskihajonnat (RSD) pitäisi laskea. Tulokset pitää antaa koko ainemäärää kohti (polymeeri + olennaiset lisäaineet jne.) ja pelkkää polymeeriä kohti (ts. sen jälkeen, kun on vähennetty tällaisten lisäaineiden vaikutus).

2.2. TESTI, JOSSA ON KAKSI NÄYTEKOKOA

Ilmoitetaan erilliset TOC-arvot kahden kolminkertaisilla näytteillä tehdyn kokeen vesiliuosuutteille ja kunkin kokeen keskiarvo ilmaistuna massayksiköllä liuostilavuutta kohti (tyypillisesti mgC/l) sekä massayksikköinä alkuperäisen näytteen painoa kohti (tyypillisesti mgC/g).

Jos tuloksissa ei ole eroa, kun näytteen suhde vesimäärään on suuri tai pieni, tämä voi merkitä sitä, että kaikki uuttuvat komponentit ovat todella uuttuneet. Tällöin ei suora määrittäminen ole yleensä tarpeen.

Kunkin jäännöksen painot olisi ilmoitettava erikseen ja ilmaistava prosentteina näytteiden alkuperäispainoista. Keskiarvot lasketaan koetta kohti. Erotus sadan prosentin ja havaittujen prosenttimäärien välillä on alkuperäisen näytteen liukoisen ja uuttuvan aineksen prosenttimäärä.

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

3.1. TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

3.1.1. *Testattava aine:*

- saatavissa olevat tiedot testattavasta aineesta (tunnistetiedot, lisäaineet, epäpuhtaudet, pienimolekyylipainoisen aineen pitoisuus)

3.1.2. *Koeolosuhteet:*

- kuvaus käytetyistä menetelmistä ja koeolosuhteista;

- kuvaus analyttisistä ja detektiomenetelmistä.

3.1.3.

Tulokset:

- liukoisuus/uuttuvuustulokset mg/l; yksittäiset arvot ja keskiarvot uuttumiskokeista eri liuksissa, eritellen polymeeripitoisuus ja epäpuhtaudet, lisäaineet ym.,
- liukoisuus/uuttuvuustulokset mg/g polymeeriä,
- vesiliuosuutteen TOC-arvot, liuennan aineen paino ja lasketut prosenttiosuudet, jos ne on mitattu,
- kunkin näytteen pH,
- tiedot nollanäytteistä,
- tarvittaessa kirjallisuudesta saatavat tiedot testattavan aineen kemiallisesta epästabiilisuudesta sekä testausprosessin aikana että analyysin aikana,
- muut tiedot, jotka ovat tärkeitä tulosten tulkitsemisen kannalta.

4. KIRJALLISUUSVIITTEET

- (1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststoffzeugnissen für Prüfzwecke.

OSA B: TOKSISUUDEN JA MUIDEN TERVEYSVAIKUTUSTEN MÄÄRITYS YLEISJOHDANTO: OSA B

A. SELITTÄVÄ HUOMAUTUS

Tässä johdannossa käytetään seuraavaa numerointia:

- B.15 Geenimutaatio - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.16 Mitoottinen rekombinaatio - *Saccharomyces cerevisiae*
- B.17 Geenimutaatiokoe nisäkässoluilla in vitro
- B.18 DNA-vaurio ja sen korjaantuminen - UDS-koe nisäkässoluilla in vitro
- B.19 Sisarkromatidinvaihdostesti in vitro
- B.20 Sukupuoleen kytkeytynyt resessiivinen letaalitutkimus *Drosophila melanogaster*illa
- B.21 Solun transformaatiotutkimukset nisäkässoluilla in vitro
- B.22 Dominoiva letaalitutkimus jyrsijöillä
- B.23 Nisäkkäiden spermatogonioiDEN kromosomipoikkeavuudesta
- B.24 Spot-testi hiirellä (hiiren turkin väritäplätesti)
- B.25 Periytyvä translokaatio hiirellä
- B.26 Subkrooninen oraallinen toksisuustutkimus: toistuva annostelu 90 vuorokauden ajan suun kautta jyrsijöille
- B.27 Subkrooninen oraallinen toksisuustutkimus: toistuva annostelu 90 vuorokauden ajan suun kautta muille kuin jyrsijöille
- B.28 Subkrooninen dermaalinen toksisuustutkimus: toistuva annostelu 90 vuorokauden ajan iholle jyrsijöille
- B.29 Subkrooninen inhalaatiotoksisuustutkimus: toistuva annostelu 90 vuorokauden ajan hengitysteitse jyrsijöille
- B.30 Krooninen toksisuustutkimus
- B.31 Teratogeenisuustutkimus jyrsijöillä ja muilla kuin jyrsijöillä
- B.32 Karsinogeenisuustutkimus
- B.33 Yhdistetty pitkäaikaistoksisuus- ja karsinogeenisuustutkimus
- B.34 Lisääntymistoksisuustutkimus yhdellä sukupolvella
- B.35 Lisääntymistoksisuustutkimus kahdella sukupolvella
- B.36 Toksikokinetiikka

B. YLEISMÄÄRITELMÄT TÄMÄN LIITTEEN TUTKIMUSMENETELMISSÄ KÄYTETYILLE TERMEILLE

- i) Akuutti toksisuus käsittää haittavaikutukset, joita esiintyy tietyn ajan (yleensä 14 päivän) kuluessa kerta-annoksen antamisesta.
- ii) Ilmeinen toksisuus on yleistermi, jolla tarkoitetaan testiaineen antamisen jälkeen ilmeneviä selviä toksisuuden merkkejä. Merkkien tulee olla riittäviä riskin arvioimiseksi ja sellaisia, että annosteltavan annoksen suurentamisen voidaan odottaa aiheuttavan vaikea-asteisia merkkejä toksisuudesta ja mahdollisesti kuoleman.
- iii) Annos on annettavan testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painona (grammoina tai milligrammoina) tai testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. milligrammaa painokiloa kohti) tai vakiopitoisuuksina ravinnossa (ppm tai milligrammaa kilogrammassa ravintoa).
- iv) Erotteleva annos on korkein neljästä vakioannostasosta, joita voidaan antaa ilman aineeseen liittyvää kuolleisuutta (mukaan lukien lopettaminen humaaneista syistä).
- v) Annostus on yleistermi, joka käsittää annoksen, antovälin ja annostelun keston.
- vi) LD50 (median lethal dose) on tilastollinen kerta-annos, jonka voidaan odottaa tappavan puolet annoksen saaneista eläimistä. LD50-arvo ilmoitetaan testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (milligrammoja painokiloa kohti).
- vii) LD50 (median lethal concentration) on tilastollinen ainepitoisuus, jonka voidaan odottaa tappavan puolet koe-eläimistä joko altistusajana tai määrätyn ajan kuluessa tietyn pituisesta altistuksesta. LC50-arvo ilmoitetaan testiaineen painona ilman vakiotilavuutta kohti

(milligrammoja litraa kohti).

viii) NOAEL-arvo (no observed adverse effect) tarkoittaa suurinta annosta tai altistustasoa, jolla ei havaita käsittelyyn liittyviä haitallisia löydöksiä.

ix) Toistuvan annostelun aiheuttama subkrooninen toksisuus käsittää koe-eläimillä ilmenevät haittavaikutukset, jotka johtuvat toistuvasta päivittäisestä annostelusta tai altistuksesta jollekin kemikaalille lyhytkestoisesti eläinten odotettavissa olevaan elinikään verrattuna.

x) Suurin siedetty annos (MTD, maximum tolerated dose) on korkein annostaso, joka aiheuttaa eläimille toksisuuden merkkejä ilman merkittäviä vaikutuksia eloonjääneisyyteen kyseisessä kokeessa.

xi) Ihoärsytys tarkoittaa testiaineen käytöstä aiheutuneita tulehduksellisia ihomuutoksia.

xii) Silmä-ärsytys tarkoittaa silmän etupinnalle viedyn testiaineen aiheuttamia muutoksia.

xiii) Ihon herkistyminen (allerginen kosketusihottuma) on jonkin aineen aiheuttama immunologisesti välittyvä ihereaktio.

xiv) Ihon syöpyminen tarkoittaa kolmesta minuutista enintään neljään tuntia kestäneen testiaineen käytön aiheuttamia pysyviä ihokudosvauriota.

xv) Toksikokinetiikka tarkoittaa testiaineiden imeytymisen, jakautumisen, metabolian ja erittymisen tutkimista.

xvi) Imeytyminen tarkoittaa prosessia (prosesseja), jo(i)ssa annettu aine siirtyy elimistöön.

xvii) Erittyminen tarkoittaa prosessia (prosesseja), jo(i)ssa annosteltu aine ja/tai sen aineenvaihduntatuotteet poistuvat elimistöstä.

xviii) Jakautuminen tarkoittaa prosessia (prosesseja), jo(i)ssa imeytynyt aine ja/tai sen aineenvaihduntatuotteet jakautuvat elimistössä.

xix) Metabolia tarkoittaa prosessia (prosesseja), jo(i)ssa annosteltujen aineiden rakenne muuttuu elimistössä entsyymaattisten tai muiden kuin entsyymaattisten reaktioiden kautta.

B.I Akuutti - toistuva annostelu/subkrooninen ja krooninen toksisuus

Aineen akuutteja toksisia vaikutuksia, elintoksisuutta tai systeemistä toksisuutta voidaan tutkia erilaisilla toksisuuskokeilla (B.1-B.5), joissa toksisuus voidaan osoittaa alustavasti jo kerta-annoksen jälkeen.

Aineen toksisuudesta riippuen voidaan käyttää rajakoetta täyteen LD50:een asti, joskaan rajakoetta ei ole eritelty inhalaatiotutkimuksissa, koska kerta-inhalaation altistusraja-arvoa ei ole voitu määrittää.

Tutkimuksissa tulisi suosia menetelmiä, joihin tarvitaan mahdollisimman vähän eläimiä ja jotka aiheuttavat eläimille mahdollisimman vähän kärsimystä. Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi vakioannosmenetelmä (B.1 bis) ja akuutti toksisuusluokka (B.1 tris). Ensimmäisen tason tutkimuksissa toisella eläinlajilla tehdyt tutkimukset voivat täydentää ensimmäisestä tutkimuksesta tehtyjä johtopäätöksiä. Tällöin voidaan käyttää vakiokoemenetelmää tai menetelmää voidaan muuttaa pienemmälle eläinmäärälle sopivaksi.

Toistuvan annostelun toksisuustutkimuksessa (B.7-B.9) tutkitaan toistuvan altistuksen aiheuttamia toksisia vaikutuksia. Eläimiä on tarkkailtava kliinisesti tarkoin, jotta tietoa saataisiin mahdollisimman paljon. Tällaiset tutkimukset helpottavat toksisuuden kohde-elinten, myrkyn ja ei-toksisten annosten tunnistamista. Näitä seikkoja on ehkä tutkittava tarkemmin pitkäaikaistutkimuksissa (B.26-B.30 ja B.33).

B.II Mutageenisuus - genotoksisuus

Mutageenisuus tarkoittaa solujen ja eliöiden perinnöllisen aineksen määrässä tai rakenteessa aiheutettuja pysyviä muutoksia, jotka voivat periytyä. Nämä muutokset eli mutaatiot voivat koskea yhtä geeniä tai sen osia, geeniryhmää tai kokonaisia kromosomeja. Vaikutukset kokonaiseen kromosomeihin voivat olla rakenteellisia ja/tai numeerisia.

Aineen mutageeninen aktiivisuus tutkitaan bakteereilla tehtävillä geenien in vitro - (piste)mutaatiotesteillä (B.13/14) ja/tai nisäkäsosolujen kromosomien rakennepoikkeavuuksilla (B.10).

Hyväksyttäviä ovat myös in vivo -toimenpiteet, esim. mikrotumatesti (B.12) tai luuydinsolujen

metafaasianalyysi (B.11). Jos kontraindikaatioita ei ole, on kuitenkin erittäin suositeltavaa käyttää in vitro -menetelmiä.

Lisätutkimukset mutageenisuuden tutkimiseksi tarkemmin tai karsinogeenisuuden esiseulomiseksi voivat olla tarpeen suuremmissa tuotantomäärissä ja/tai riskinarvioinnin tai seurannan suorittamista varten. Tällaisia tutkimuksia voidaan käyttää useisiin eri tarkoituksiin: perussarjatulosten vahvistamiseen, perussarjaan kuulumattomien päätemuuttujien tutkimiseen ja in vivo -tutkimusten käynnistämiseen tai laajentamiseen.

Näitä tarkoituksia varten menetelmissä B.15 ja B.25 käytetään aiotumallisia eliöitä sekä in vivo että in vitro ja laajennettua biologisten päätemuuttujien sarjaa. Näistä tutkimuksista saadaan tietoa pistemutaatioista ja muista päätemuuttujista eliöissä, jotka ovat monimutkaisempia kuin perussarjassa käytetyt bakteerit.

Yleisperiaate on, että mutageenisuuden jatkotutkimusohjelma on suunniteltava siten, että se antaa olennaista lisätietoa kyseisen aineen mahdollisesta mutageenisuudesta ja/tai karsinogeenisuudesta.

Varsinaiset tutkimukset, jotka voivat olla tarkoituksenmukaisia tietyssä tilanteessa, riippuvat lukuisista tekijöistä, mukaan lukien aineen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, ensimmäisten bakteeri- ja sytogeneettisten testien tulokset, aineen metaboliaprofiili, muiden toksisuustutkimusten tulokset ja aineen käyttötavat. Testien jäykkä valintaohjelma ei siten ole tarkoituksenmukainen, kun otetaan huomioon mahdollisesti huomioon otettavien tekijöiden moninaisuus.

Tutkimusstrategian joitakin yleisperiaatteita on määritelty direktiivissä 93/67/ETY, ja selkeät tutkimusstrategiat löytyvät riskinarviointia koskevasta teknisestä ohjeasiakirjasta, joka on kuitenkin joustava ja mukautettavissa erityisolosuhteisiin.

Jatkotutkimusmenetelmät on kuitenkin ryhmitelty seuraavassa niiden pääasiallisen geneettisen päätemuuttujan perusteella:

Geenien (piste)mutaatiotutkimukset

a) Suora- tai takaisinmutaatiotutkimukset aiotumallisilla mikrobeilla (*Saccharomyces cerevisiae*) (B.15)

b) Suoramutaatiotutkimukset nisäkässoluilla in vitro (B.17)

c) Sukupuoleen kytkeytynyt resessiivinen letaalitesti *Drosophila melanogaster*illa (B.20)

d) Somaattinen mutaatiotesti in vivo: spot-testi hiirellä (hiiren turkin väritäplätesti) (B.24).

Kromosomipoikkeavuuksien tutkimukset

a) Sytogeneettiset in vivo -tutkimukset nisäkkäillä. Luuydinsolujen in vivo -metafaasianalyysia olisi harkittava, jos sitä ei ole tehty alkuarvioinnissa (B.11). Lisäksi voidaan tutkia sukusolun sytogenetiikkaa in vivo (B.23)

b) Sytogeneettiset in vitro -tutkimukset nisäkässoluilla, jos niitä ei ole tehty alkuarvioinnissa (B.10)

c) Dominoivat letaaliutkimukset jyrsijöillä (B.22)

d) Periytyvä translokaatiotutkimus hiirellä (B.25).

Genotoksiset vaikutukset - DNA-vaikutukset

Genotoksisuus, jolla tarkoitetaan perintöainekseen kohdistuvia mahdollisia haittavaikutuksia, jotka eivät välttämättä liity mutageenisuuteen, voi ilmetä DNA-vauriona ilman suoraa näyttöä mutaatiosta. Genotoksisuutta voidaan tutkia seuraavilla menetelmillä, joissa käytetään aiotumallisia eliöitä tai nisäkässoluja:

a) Mitoottinen rekombinaatio *Saccharomyces cerevisiae*ssa (B.16)

b) DNA-vaurio ja sen korjaantuminen - UDS-testi nisäkässoluilla in vitro (B.18)

c) Sisarkromatidinvaihdos nisäkässoluilla in vitro (B.19).

Vaihtoehtoisia menetelmiä karsinogeenisuusriskin tutkimiseksi

Saatavana on nisäkässolujen transformaatiotestejä, joilla mitataan aineen kykyä aiheuttaa soluviljelyssä morfologisia ja käyttäytymismuutoksia, joiden arvellaan liittyvän pahanlaatuiseen in vivo -transformaatioon (B.21). Tutkimuksessa voidaan käyttää monia erilaisia solutyyppejä ja

transformaatiooperusteita.

Periytyvien vaikutusten riskinarviointi nisäkkäillä

Saatavana on menetelmiä, joilla mitataan koko nisäkkäälle geeni(piste)mutaatioilla (esim. hiiren spesifinen lokus -testi) aiheutettuja periytyviä vaikutuksia, sukusolumutaatioita ensimmäisessä sukupolvessa (ei tässä liitteessä) tai kromosomipoikkeavuuksia (esim. periytyvä translokaatiotesti hiirellä) (B.25). Näillä menetelmillä voidaan arvioida aineen ihmiselle aiheuttamaa perinnöllistä riskiä. Tutkimusten monimutkaisuuden ja niissä tarvittavan suuren eläinmäärän (etenkin spesifisen lokuksen testissä) vuoksi niiden suorittamiselle on oltava erittäin hyvät perustelut.

B.III Karsinogeenisuus

Kemikaaleja voidaan kuvailla genotoksisiksi tai ei-genotoksisiksi karsinogeneiksi oletetun vaikutusmekanismin mukaan.

Esiseulontatietoa aineen mahdollisesta genotoksisesta karsinogeenisuudesta saadaan mutageenisuus-/genotoksisuustutkimuksista. Lisätietoa saadaan toistuvan annostelun tutkimuksista, subkroonisista ja kroonisista toksisuustutkimuksista. Toistuvan annostelun toksisuustutkimuksessa, menetelmä B.7:ssä ja pitempikestoissa toistuvan annostelun tutkimuksissa arvioidaan histopatologisia muutoksia (esim. tiettyjen kudosten huolestuttava liikakasvu), joita on havaittu toistuvan annostelun toksisuustutkimuksissa. Nämä tutkimukset ja toksikokineettiset tiedot voivat auttaa tunnistamaan mahdollisesti karsinogeenisiä kemikaaleja, jotka vaativat tässä suhteessa tarkempaa tutkimista karsinogeenisuustutkimuksissa (B.32) tai usein yhdistetyssä kroonisessa toksisuus/karsinogeenisuustutkimuksessa (B.33).

B.IV Lisääntymistoksisuus

Lisääntymistoksisuus voidaan havaita eri tavoin, esimerkiksi jomman kumman sukupuolen lisääntymistoimintojen tai -kyvykkyyden heikkenemisenä, mitä nimitetään "hedelmällisyysvaikutukseksi", tai seuraaviin jälkeläisiin kohdistuvina periytymättöminä haittavaikutuksina, joita nimetään "kehitystoksisuudeksi" ja johon sisältyvät myös teratogeenisuus ja vaikutukset imetyaikana.

Kehitystoksisuustutkimuksiin kuuluvassa teratogeenitutkimuksessa tutkimusmenetelmä (B.31) suuntautuu lähinnä suun kautta tapahtuvaan annosteluun. Myös muita antotapoja voidaan käyttää testiaineen fysikaalisista ominaisuuksista ja ihmisen todennäköisestä altistumistavasta riippuen. Tällöin tutkimusmenetelmää tulee muuttaa sopivalla tavalla ottaen huomioon 28 päivän tutkimusmenetelmien asianmukaiset osat.

Kolmen sukupolven lisääntymis(hedelmällisyys)tutkimusta tarvittaessa voidaan kahden sukupolven lisääntymistutkimus (B.35) laajentaa käsittämään myös kolmas sukupolvi.

B.V Neurotoksisuus

Neurotoksisuus voidaan havaita eri tavoin, esimerkiksi keskus- tai ääreishermoston toiminnallisina ja/tai rakenteellisina ja biokemiallisina muutoksina. Neurotoksisuus voidaan alustavasti osoittaa akuuteissa toksisuustutkimuksissa. Toistuvan annostelun toksisuustutkimuksessa (B.7) arvioidaan neurotoksisia vaikutuksia. Eläimiä tulisi havainnoida kliinisesti tarkoin, jotta tietoa saataisiin mahdollisimman paljon. Menetelmä auttaa tunnistamaan mahdollisesti neurotoksiset kemikaalit, jotka ehkä vaativat tässä suhteessa tarkempaa tutkimista. Lisäksi on otettava huomioon, että aineilla voi olla erityisiä neurotoksisia vaikutuksia, joita ei voida havaita muissa toksisuustutkimuksissa. Esimerkiksi tiettyjen organofosfaattien on havaittu aiheuttavan viivästynyttä neurotoksisuutta, jota voidaan arvioida menetelmillä B.37 ja B.38 kerta-annoksella tai toistuvassa annostelussa tapahtuvan altistuksen jälkeen.

B.VI Immunotoksisuus

Immunotoksisuus voidaan havaita eri tavoin, esimerkiksi immuunijärjestelmän vasteen heikkenemisenä ja/tai vahvistumisena, mikä aiheuttaa joko yliherkkyyttä tai autoimmunitietin. Toistuvan annostelun toksisuustutkimuksessa (B.7) arvioidaan immunotoksisia vaikutuksia. Menetelmä auttaa tunnistamaan mahdollisesti immunotoksisia kemikaaleja, jotka ehkä vaativat tässä suhteessa tarkempaa tutkimista.

B.VII Toksikokinetiikka

Toksikokineettiset tutkimukset auttavat tulkitsemaan ja arvioimaan toksisuustietoja.

Toksikokineettisillä tutkimuksilla pyritään selvittämään tiettyjä seikkoja tutkittavan kemikaalin toksisuudesta. Tutkimustuloksista voi olla apua toksikologisten jatkotutkimusten suunnittelussa. Kaikissa tapauksissa tuskin tarvitsee määrittää kaikkia parametrejä. Kaikkien toksikokineettisten tutkimusten (imeytyminen, erittyminen, jakautuminen ja metabolia) suorittaminen on vain harvoin välttämätöntä. Tiettyjen yhdisteiden kohdalla voi olla suositeltavaa tehdä muutoksia tutkimussarjaan tai kerta-annostutkimus voi riittää (B.36).

Myös tiedot kemiallisesta rakenteesta (SAR) ja fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista voivat antaa viitteitä aineen imeytymisominaisuuksista kyseisellä antotavalla sekä aineen metaboliasta ja kudoksen jakautumisesta. Saatavana voi myös olla tietoja aiemmista toksisuus- ja toksikokineettisistä tutkimuksista.

C. TESTIAINEEN KARAKTERISAATIO

Testiaineen koostumus, mukaan lukien tärkeimmät epäpuhtaudet, ja sen olennaiset fysikaalis-kemialliset ominaisuudet, mukaan lukien stabiliteetti, on oltava tiedossa ennen toksisuustutkimusten aloittamista.

Testiaineen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet antavat tärkeää tietoa antotavan, tutkimusasetelman ja testiaineen käsittely- ja säilyttämistavan valintaa varten.

Annosteluaineessa ja biologisessa materiaalissa olevan testiaineen (ja mahdollisuuksien mukaan myös tärkeimpien epäpuhtauksien) määrittämiseen käytettävä määrällinen ja laadullinen analyysimenetelmä tulee kehittää ennen tutkimuksen aloittamista.

Kaikki testiaineen tunnistamiseen, fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin, puhtauteen ja käyttäytymiseen liittyvät tiedot tulee sisällyttää tutkimusraporttiin.

D. ELÄINTEN HOITO

Ympäristöolosuhteiden ja eläinten oikeiden hoitomenetelmien tiukka seuranta on oleellista toksisuustutkimuksissa.

(i) Elinolosuhteet

Koe-eläintilojen ja häkkien ympäristöolosuhteiden on oltava testattavalle lajille tarkoituksenmukaiset. Rotalle, hiirelle ja marsulle sopiva huoneenlämpötila on $+22 \pm 3^\circ\text{C}$ ja suhteellinen ilmankosteus 30-70 %. Kaniineille sopiva huoneenlämpötila on $+20 \pm 3^\circ\text{C}$ ja suhteellinen ilmankosteus 30-70 %.

Jotkut tutkimusmenetelmät ovat erityisen herkkiä lämpötilavaikutuksille. Näissä tapauksissa asianmukaiset olosuhteet on selostettu yksityiskohtaisesti tutkimusmenetelmän kuvauksen yhteydessä. Kaikissa toksisuustutkimuksissa on valvottava huoneenlämpötilaa ja ilmankosteutta, rekisteröitävä tiedot ja kirjattava ne tutkimuksen loppuraporttiin.

Valaistuksen tulee olla keinovaloa. Eläimen tulee saada olla 12 tuntia valossa ja 12 tuntia pimeässä. Valaistusmallin yksityiskohdat on rekisteröitävä ja kirjattava tutkimuksen loppuraporttiin.

Jollei menetelmässä erikseen muuta mainita, eläimiä voidaan säilyttää yksin tai pienryhmänä häkeissä, joissa on samaa sukupuolta. Yhdessä ryhmähäkissä saa olla enintään viisi eläintä.

Koe-eläintutkimusraporteissa on tärkeää ilmoittaa käytetty häkkityyppi ja eläinten määrä häkkiä kohti sekä kemiallisen altistuksen että sitä seuranneiden havainnointijaksojen aikana.

(ii) Ruokintaolosuhteet

Ravinnon tulee tyydyttää testattavan eläinlajin kaikki ravitsemukselliset tarpeet. Jos testiainetta annetaan eläimille ravinnossa, ravinnon ravintoarvo voi heiketä testiaineen ja ruoka-aineen interaktion vuoksi. Tällaisen reaktion mahdollisuus on otettava huomioon tutkimustuloksia tulkittaessa. Eläimille voidaan antaa tavanomaista koe-eläinravintoa ja juomavettä on oltava kaiken aikaa tarjolla. Ravinnon valintaan voi vaikuttaa tarve varmistaa testiaineelle sopiva sekoitus, kun se annostellaan ravinnon mukana.

Ravintoa saastuttavia aineita, joiden tiedetään vaikuttavan toksisuuteen, ei saa olla läsnä häiritsevinä pitoisuuksina.

E. ELÄINTEN HYVINVOINTI

Tutkimusmenetelmiä kehitettäessä otettiin asiaankuuluvasti huomioon myös eläinten hyvinvointi. Seuraavassa on tästä vain muutamia lyhyitä esimerkkejä. Tarkka sanamuoto ja/tai olosuhteet tulee lukea kutakin menetelmää koskevasta tekstistä erikseen:

- Akuutti oraalinen toksisuus voidaan määrittää joko vakioannosmenetelmällä tai akuutin toksisuusluokan menetelmällä. Vakioannosmenetelmässä kuolema ei ole spesifinen päätemuuttuja ja siinä käytetään vähemmän eläimiä. Akuutin toksisuusluokan menetelmässä käytetään keskimäärin 70 % vähemmän eläimiä kuin akuutin oraalisen toksisuuden tutkimiseen käytettävässä menetelmässä B.1. Nämä molemmat vaihtoehtomenetelmät tuottavat eläimelle vähemmän kipua ja kärsimystä kuin perinteiset menetelmät.
- Käytettävien eläinten määrä pienennetään tieteellisesti hyväksyttävään minimiin: vain viisi samaa sukupuolta olevaa eläintä testataan annostasoa kohti menetelmissä B.1 ja B.3. Marsulla tehtävässä maksimisaaotitestissä (B.6) ihon herkistymisen määrittämiseksi käytetään vain kymmentä eläintä (ja vain viittä negatiivisessa verrokkiryhmässä). Myös in vivo -mutageenisuustutkimuksissa positiiviseen kontrolliin tarvittavien eläinten määrää pienennetään (B.11 ja B.12).
- Testien eläimille tuottama kipu ja kärsimys minimoidaan: eläimet, jotka osoittavat merkkejä voimakkaasta ja jatkuvasta kärsimyksestä ja kivusta, voidaan joutua lopettamaan humanilla tavalla. Testiaineita ei pidä annostella tavalla, jonka tiedetään aiheuttavan kovaa kipua ja kärsimystä aineen syövyttävien tai ärsyttävien ominaisuuksien vuoksi (B.1, B.2 ja B.3).
- Epätarkoituksenmukaisen suurilla annoksilla testaamiselta välttyään ottamalla käyttöön raja-annoskokeet, joita voidaan käyttää akuuttien toksisuustutkimusten (B.1, B.2 ja B.3) lisäksi myös in vivo -mutageenisuustutkimuksissa (B.11 ja B.12).
- Ärsyttävyyden tutkimusstrategia sallii nykyään testin poisjättämisen tai sen suorittamisen vain yhdellä eläimellä silloin kun saatavana on riittävä tieteellinen näyttö. Tällainen tieteellinen näyttö voi perustua aineen fysikaalis-kemiallisiin ominaisuuksiin aiempiin tutkimustuloksiin tai hyvin validoitujen in vitro -testien tuloksiin. Jos esimerkiksi akuutissa dermaalissa toksisuustutkimuksessa tehdyssä raja-annoskokeen annoksen (B.3) ei ole havaittu aiheuttavan ihoärsytystä, ihoärsytyksen jatkotutkimukset (B.4) voivat olla tarpeettomia. Materiaaleja, joiden on ihoärsytystutkimuksessa (B.4) osoitettu olevan selvästi syövyttäviä tai aiheuttavan vaikea-asteista ihon ärsyyntymistä, ei pidä enää testata silmä-ärsyttävyyden osalta (B.5).

F. VAIHTOEHTOISET TUTKIMUKSET

Euroopan unionin tieteellinen tavoite on sellaisten vaihtoehtomenetelmien kehittäminen ja validointi, joista saadaan samantasoista tietoa kuin nykyisistä eläinkokeista, mutta joihin tarvitaan vähemmän eläimiä ja jotka aiheuttavat vähemmän kärsimystä tai joissa eläimiä ei tarvita lainkaan.

Sitä mukaa kuin tällaisia menetelmiä tulee saataville, on niitä mahdollisuuksien mukaan käytettävä vaaran luonnehdinnassa ja siihen perustuvassa ominaisvaarojen luokittelussa ja merkitsemisessä.

G. ARVIONTI JA TULKINTA

Testien arvionnissa ja tulkinnessa on otettava huomioon ekstrapolaatorajoitukset eläinkokeiden ja in vitro -tutkimusten tulosten soveltamisessa suoraan ihmiseen ja siksi mahdollisesti saatavia todisteita haittavaikutuksista ihmisellä voidaan käyttää tutkimustulosten vahvistamiseen. Näitä tuloksia voidaan käyttää uusien ja olemassa olevien kemikaalien luokitteluun ja merkitsemiseen sen mukaan miten ne vaikuttavat ihmisen terveyteen ominaisvaikutustensa perusteella, jotka on tunnistettu ja kvantifioitu näillä menetelmillä. Vastaavan liitteen VI luokittelu- ja merkitsemisperusteet liittyvät myös näiden tutkimusmenetelmien tutkimussuunnitelmien kohdevaikutuksiin.

Näitä tuloksia voidaan käyttää myös uusien ja olemassa olevien kemikaalien riskinarviontitutkimuksissa. Tähän tarkoitukseen sopivista tutkimusstrategioista on kerrottu

vastaavissa ohjeasiakirjoissa.

H. LÄHDELUETTELO

Useimmat näistä menetelmistä on kehitetty OECD:n `Testing Guidelines` -ohjelman puitteissa ja niitä tulisi käyttää yhtenevästi GLP (Good Laboratory Practice) -periaatteiden kanssa mahdollisimman laajan `keskinäisen tietojen hyväksymisen` varmistamiseksi.

Lisätietoa löytyy OECD-ohjeiston kirjallisuusluettelossa mainituista lähteistä ja muusta asiaankuuluvasta kirjallisuudesta

B. 1 tris

AKUUTTI ORAALINEN TOKSISUUS — AKUUTIN TOKSISUUSLUOKAN MENETELMÄ

1. MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Akuutin toksisuusluokan menetelmä antaa tietoa sekä riskien arviointia että luokittelua varten.

Menetelmässä käytetään kolmea toisistaan riittävällä tavalla eroavaa vakioannosta yhdisteen luokittelemiseksi tutkimustulosten perusteella. Tässä koemenetelmässä kuvatussa toimenpiteessä voidaan käyttää myös kolmea lisävakioannosta vaihtoehtoina joko tiettyinä valintahetkinä tai lisäkokeita varten. Lisäannoksen/-annosten käyttöä voidaan harkita haluttaessa tai tarvittaessa lisäselvennystä.

Menetelmässä käytetään määriteltyjä alkuannoksia eikä sen avulla ole tarkoitus laskea tarkkaa LD₅₀-annosta. Sen sijaan sen avulla voidaan määrittää altistusalue, jolla on odotettavissa kuolleisuutta, koska osan eläimistä kuolema on edelleen tämän kokeen tärkein kohdevaikutus. Koetulosten tulee mahdollistaa luokittelu liitteen VI perusteiden mukaan. Koejärjestelyjen peräkkäisyyden vuoksi koe voi kestää pidempää kuin B.1:ssä kuvattu toimenpide. Tämän menetelmän suurin etu on, että siinä tarvitaan vähemmän eläimiä kuin akuutin oraalisen toksisuuden menetelmässä (B.1) ja vaihtoehtoisessa vakioannosmenetelmässä (B.1 bis).

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 Määritelmät

Ks. yleisjohdanto, osa B.

1.3 Testimenetelmän periaate

Ainetta annetaan ryhmälle koe-eläimiä suun kautta yhdellä määritellyistä annostasoista. Ainetta testataan vaiheittain siten, että kussakin vaiheessa käytetään kolmea samaa sukupuolta olevaa eläintä. Alustavaa katsastutkimusta ei tarvitse tehdä. Eläinten aineesta johtuva kuolleisuus kussakin vaiheessa määrää seuraavan vaiheen, eli:

- jatkokokeita ei tarvita
- seuraava vaihe toteutetaan samalla annoksella, mutta vastakkaista sukupuolta olevilla eläimillä
- seuraavassa vaiheessa käytetään astetta korkeampaa tai alemmaa annostasoa.

1.4 Testimenetelmän kuvaus

1.4.1 Valmistelut

Kokeeseen valitaan satunnaisotannalla terveitä nuoria täysikasvuisia eläimiä, jotka merkitään yksilötunnistusta varten ja joita pidetään häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen kokeen aloittamista eläinten totuttamiseksi laboratorio-oloihin. Eläimet voidaan erotella eri häkkeihin sukupuolen ja annoksen mukaan, mutta eläinten lukumäärä häkkiä kohti ei saa häiritä yksittäisen eläimen selkeää havainnointia.

Testiaine annetaan kerta-annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta.

Testiaine liuotetaan tai suspensoidaan tarvittaessa sopivaan vehikkeliin. Suositusten mukaan ensin tulee mahdollisuuksien mukaan käyttää vesipitoista nestettä/suspensiota, sitten öljypohjaista nestettä/emulsiota (esim. maissiöljyä) ja viimeiseksi muihin vehikkeleihin sekoitettua nestettä. Muiden kuin vesipitoisten vehikkeleiden toksiset ominaisuudet tulee olla tiedossa ja jolleivät ne ole, on ne määritettävä ennen koetta.

Eläimiä ei saa ruokkia ennen annostelua (esim. rottaa yli yön tai hiirtä 3—4 tuntiin), mutta juomavettä tulee olla tarjolla.

1.4.2 *Koeolosubteet*

1.4.2.1 *Koe-eläimet*

Jollei kontraindikaatioita ole, kokeessa tulee käyttää jyräjälajeista rottaa. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Kokeen alussa eläinten paino ei juurikaan saisi vaihdella eikä ylittää ± 20 prosenttia kummankaan sukupuolen keskipainosta.

1.4.2.2 *Lukumäärä ja sukupuoli*

Kussakin vaiheessa käytetään kolmea samaa sukupuolta olevaa eläintä. Ensimmäisessä vaiheessa voidaan käyttää kumpaa tahansa sukupuolta.

1.4.2.3 *Annostasot*

Alkuannostasoksi valitaan yksi kolmesta vakiotasosta, jotka ovat 25, 200 ja 2 000 mg/kg. Alkuannostason tulee olla sellainen, että se tappaa todennäköisesti ainakin muutaman annostellusta eläimestä. Koe voidaan suorittaa jonkin liitteessä 1 kuvatun toimenpidekaavion mukaan alkuannostasesta riippuen.

Sukupuolen ja alkuannoksen valinnassa tulisi käyttää kaikkea mahdollista saatavissa olevaa tietoa, mukaan lukien tiedot rakenne-aktiivisuus-suhteista (SAR). Kun tiedot viittaavat siihen, että kuolleisuus on epätodennäköinen korkeimmalla annostasolla (2 000 mg/kg), on tehtävä raja-annoskoe. Kun testiaineesta ei ole tietoja, alkuannokseksi suositellaan eläinten hyvinvointisyistä 200 mg/kg.

Joskus voidaan haluta tarkempia tietoja kuin on mahdollista saada kolmella vakioannostasolla (25, 200 ja 2 000 mg/kg). Tällöin voidaan tehdä jatkokokeita lisävakioannostasoilla 5, 50 tai 500 mg/kg.

Annoksia, joiden tiedetään aiheuttavan voimakasta kipua ja kärsimystä syövyttävien tai vaikea-asteisten ärsytysvaikutusten vuoksi, ei pidä annostella.

Koeryhmien aikavälit määritetään toksisten oireiden alkamishetken, keston ja vaikeusasteen mukaan. Vastakkaista sukupuolta olevien eläinten käsitelyä tai seuraavan annoksen antamista tulee siirtää, kunnes jo annosteltujen eläinten eloonjäämisestä on saatu varmuus.

1.4.2.4 *Raja-annoskoe*

Raja-annoskokeessa yhdellä 2 000 mg/kg:n annostasolla voidaan käyttää kolmea naarasta ja kolmea urosta. Jos aineeseen liittyvää kuolleisuutta esiintyy, voidaan tarvita jatkokokeita 200 mg/kg:lla (tai 500 mg/kg:lla).

1.4.2.5 *Havainnointijakso*

Eläimiä tulee normaalisti havainnoida 14 päivää, paitsi silloin kun eläin on poistettava kokeesta ja lopetettava humanilla tavalla sen hyvinvoinnin vuoksi tai kun eläin löydetään kuolleena. Havainnointijakson kestoa ei pitäisi kuitenkaan määritellä tiukasti. Se tulee määrittää toksisten reaktioiden, niiden alkamishetken ja toipumisen keston perusteella ja sitä tulisi voida pidentää tarvittaessa. Toksisuusoireiden ilmaantumisen- ja häviämisaikakohdat ovat tärkeitä, etenkin jos toksiset oireet pyrkivät viivästyämään. Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti kunkin eläimen omaan tutkimuskorttiin.

1.4.3 *Kokeen suorittaminen*

Paaston jälkeen eläimet punnitaan ennen testiaineen antoa. Aineen annostelun jälkeen ruokintaa voidaan siirtää vielä 3–4 tuntia. Jos annos annostellaan osina tietyn ajan kuluessa, eläimelle voidaan joutua antamaan ravintoa ja vettä jakson pituudesta riippuen.

Kerralla annettavan nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläinten koosta. Jyräjällä määrä ei saa normaalisti olla yli 1 ml sataa painogrammaa kohti. Vesiliuosten kohdalla voidaan kuitenkin antaa 2 ml sataa painogrammaa kohti. Testiaineen määrän vaihtelevuus tulee minimoida pitoisuutta sovitamalla vakiomäärän takaamiseksi kaikilla annostasoilla. Jos kerta-annos ei ole mahdollinen, annos voidaan antaa pienemmissä osissa vuorokauden kuluessa.

Koemenetelmän yksityiskohdat on kuvailtu liitteessä 1.

1.4.3.1 Yleishavainnot

Eläimiä tulee havainnoida tarkoin kliinisesti vähintään kahdesti annostelupäivänä tai tätä useammin silloin kun se on aiheellista käsittelyn eläimessä aiheuttaman vasteen vuoksi ja vähintään kerran päivässä sen jälkeen. Kuolevat eläimet ja eläimet, jotka osoittavat merkkejä voimakasta kivusta ja jatkuvasta kovasta kärsimyksestä, tulee lopettaa humanilla tavalla. Humanaeista syistä lopetettuja eläimiä käsitellään samalla tavalla kuin kokeessa kuolleita eläimiä.

Humanaeista syistä lopettujen tai kuollessaan löydettyjen eläinten kuolinaika tulee kirjata muistiin mahdollisimman tarkasti. Lisähavainnointi on tarpeen, jos eläinten toksisuusoireet jatkuvat. Havaintoihin tulee sisältyä ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, hengitys- ja verenkiertojärjestelmän, autonomisen ja keskushermoston, somatomotorisen toiminnan ja käyttäytymismallien muutokset. Huomiota tulee kiinnittää vapinaan, kouristuksiin, syljeneritykseen, ripuliin, letargiaan, uneen ja koomaan.

Kaikki havainnot kirjataan järjestelmällisesti muistiin kunkin eläimen omaan tutkimuskorttiin.

1.4.3.2 Ruumiinpaino

Kaikki eläimet tulee punnita hieman ennen testiaineen annostelua ja vähintään kerran viikossa sen jälkeen. Ruumiinpainon muutokset tulee laskea ja kirjata muistiin. Testin päätyttyä elossa olevat eläimet punnitaan ennen kuin ne lopetetaan humanilla tavalla.

1.4.3.3 Silmämääräinen ruumiinavaus

Kaikille koe-eläimille mukaan lukien kokeen aikana kuolleet tai kokeesta poistetut eläimet tulee tehdä silmämääräinen ruumiinavaus. Kunkin eläimen kaikki silmin havaittavat patologiset muutokset tulee kirjata muistiin. Vähintään 24 tuntia hengissä säilyneiden eläinten silmin havaittavasti patologiset elimet tulee tutkia mikroskooppisesti niistä mahdollisesti saatavan hyödyllisen tiedon vuoksi.

2. TULOKSET

Koetulokset tulee esittää yksittäisten eläinten mukaan. Kaikki tulokset tulee esittää myös yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi kussakin koeryhmässä käytettyjen eläinten lukumäärä, toksisuusoireita osoittaneiden eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuollessaan löydettyjen tai humanaeista syistä lopettujen eläinten lukumäärä, yksittäisten eläinten kuolinaika ja toksisten vaikutusten kuvaus, ajallinen esiintyminen ja korjaantuminen sekä ruumiinavauslöydökset.

Yleisohjeita tulosten tulkitsemiseksi luokittelua varten on annettu liitteessä 2.

3. RAPORTOINTI

Koeraportti

Koeraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

- laji/kanta,
- eläinten mahdollisesti tiedossa oleva mikrobiologinen status,
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,
- lähde, elinolosuhteet, ravinto jne,
- kunkin eläimen paino kokeen alussa, viikon välein kokeen aikana ja kokeen loputtua.

Koelosubteet:

- perustelut muun kuin veden valinnalle vehikkeliksi,
- testiaineen annostelun yksityiskohdat, mukaan lukien annostusmäärät ja ajankohta
- ravinnon ja veden laadun yksityiskohdat (mukaan lukien tyyppi/lähde, vesilähde),
- alkunäytteen valintaperusteet.

Tulokset:

- kunkin eläimen vastetulosten taulukointi (esim. toksisuusoireita osoittavat eläimet, mukaan lukien kuolleisuus, vaikutusten luonne, vaikeusaste ja kesto) sukupuolen ja annostason mukaan,
- toksisuusoireiden alkamisajankohta ja mahdollinen korjaantuminen kullakin eläimellä,
- ruumiinavauslöydökset ja muut histopatologiset löydökset kullakin eläimellä, jos saatavilla.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

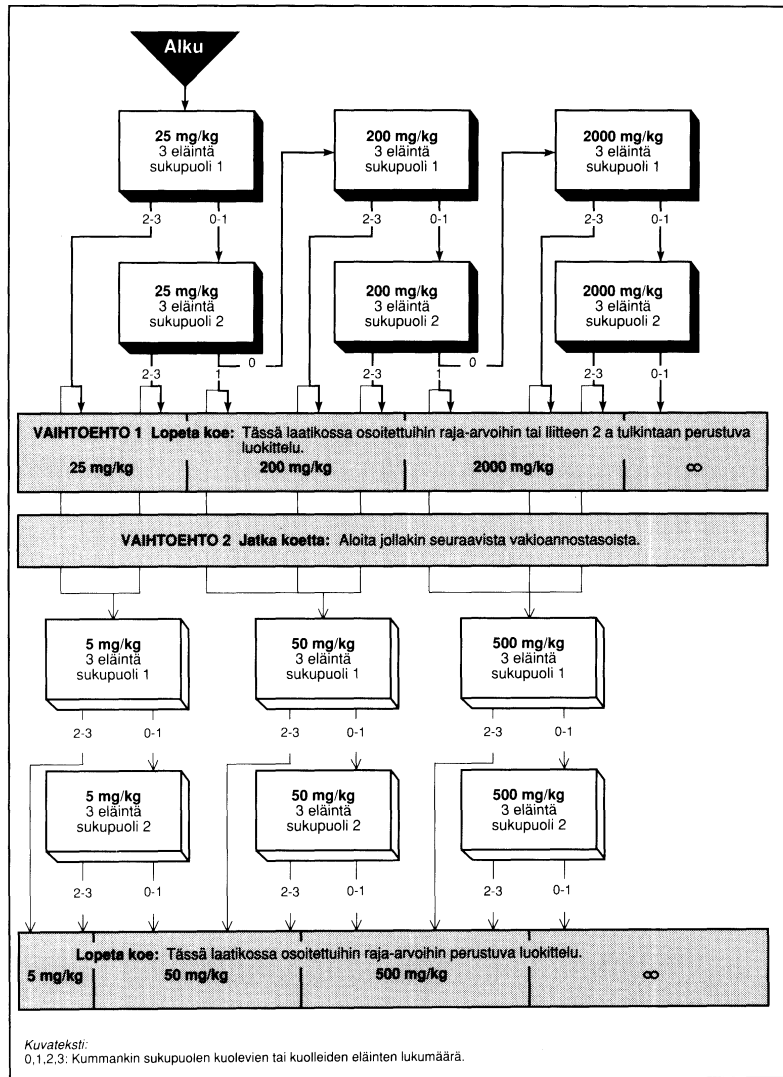
Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 423:n kanssa.

LIITE 1

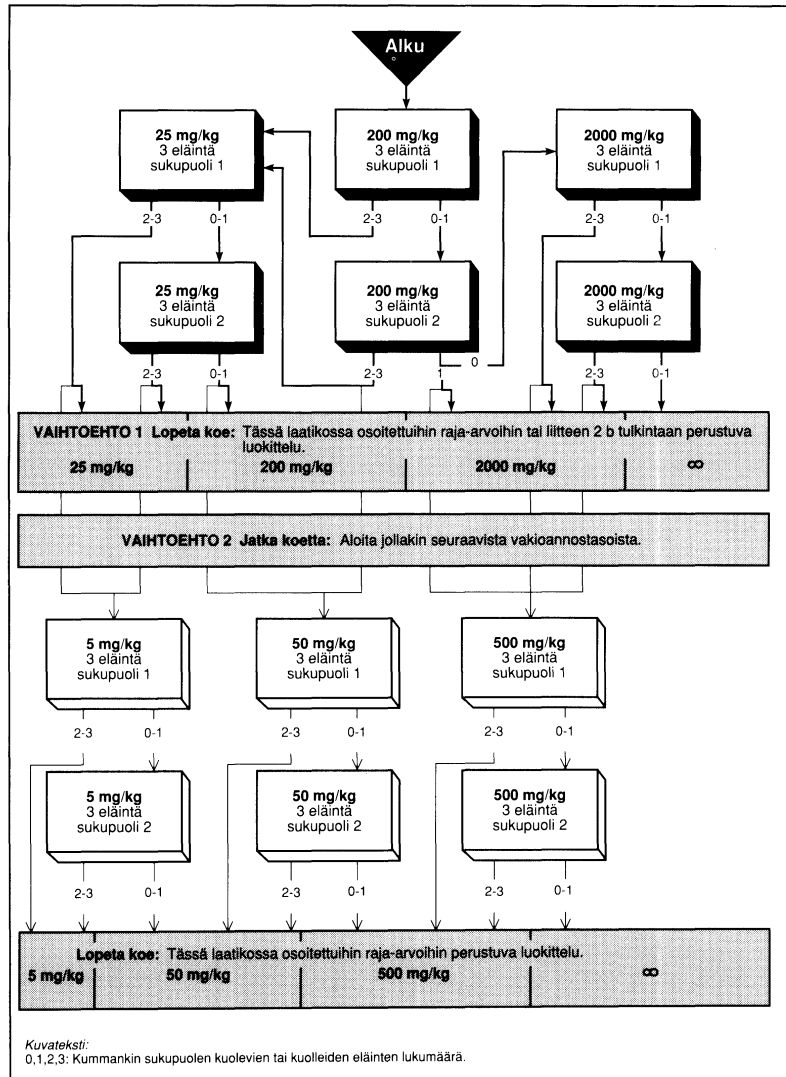
KOKEEN SUORITTAMINEN

1. Kuten kohdassa 1.4.2.3 osoitettiin, alkuannoksen tulee olla sellainen, joka todennäköisesti tappaa ainakin muutaman annostelluista eläimistä. Alkuannoksen valintaan mahdollisesti vaikuttavia tietoja ovat:
 - aineen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet,
 - rakenne-aktiivisuus-suhteet (SAR),
 - kaikki aiempien toksisuuskokeiden tulokset ja
 - testiaineen odotettu käyttö.
2. Hahmottele kutakin alkuannosta varten käytettävät koejärjestelyt siten kuin ne on liitteessä esitetty. Humaanilla tavalla lopetettujen tai kuolleiden eläinten lukumäärästä riippuen koe etenee nuolten osoittamalla tavalla.
3. Kun vain yksi toista sukupuolta oleva eläin kuolee alkuannoksella 25 tai 200 mg/kg, jatkokokeita ei normaalisti enää tehdä. Jos muissa viidessä eläimessä ei kuitenkaan havaita merkkejä toksisuudesta, ruumiinavauksessa tulee ottaa huomioon se mahdollisuus, ettei kuolema ole aiheutunut aineesta. Tällöin koetta tulee jatkaa astetta korkeammalla annostasolla.
4. Kun yksi eläin kuudesta kuolee annoksella 2 000 mg/kg, LD₅₀-arvo odotettavasti ylittää 2 000 mg/kg. Koska tämä tulos on rajatapaus, jäljellä olevien kahden naaraan ja kahden uroksen vastetta tulee havainnoida tarkoin, ja selkeät ja voimakkaat toksisuusoireet näillä eläimillä voivat tällöin johtaa luokitteluun, joka vastaa enintään 2 000 mg/kg:n LD₅₀-arvoa tai oikeuttaisi jatkokokeisiin samalla tasolla.
5. Kokeessa voidaan käyttää kolmea lisävakioannosta (vaihtoehto 2). Tätä vaihtoehtoa voidaan käyttää joko vaihtoehtoannoksen valitsemiseen tietyllä valintahetkellä tai jatkokokeisiin varsinaisen kokeen päätyttyä (vaihtoehto 1). Ensimmäinen vaihtoehto on kaaviossa osoitettu lihavoiduin nuolin ja toinen vaihtoehto ohuin nuolin.

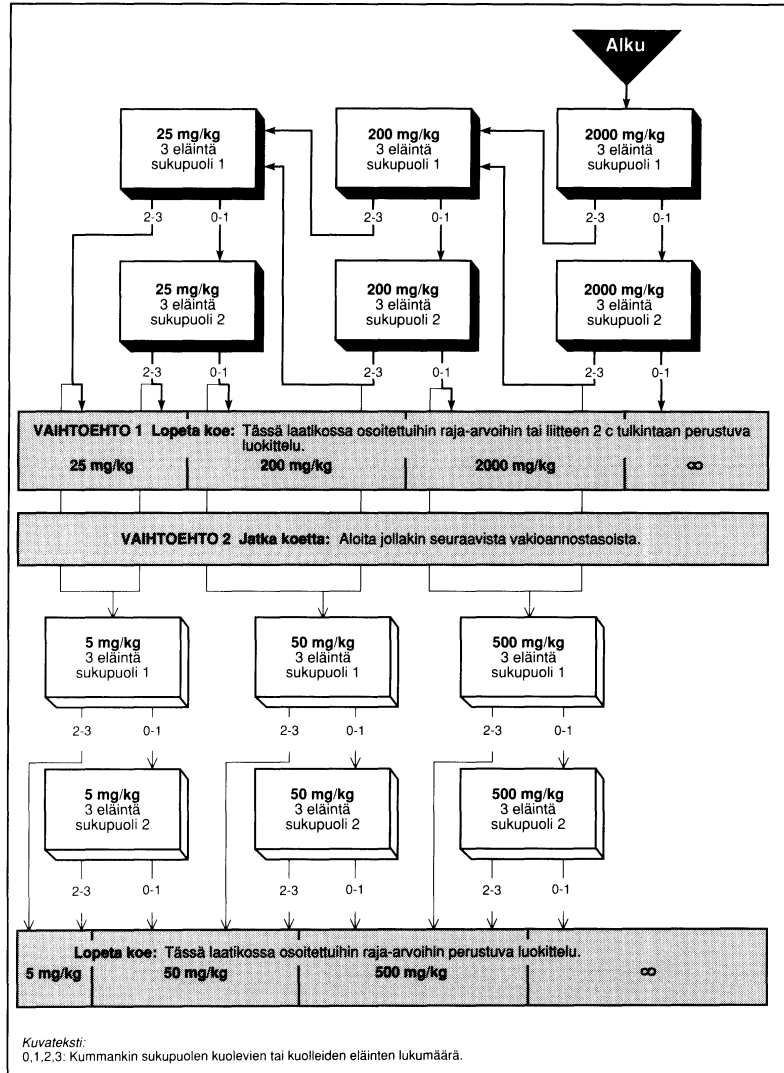
a) Koe alkuannoksella 25 mg/kg



b) Koe alkuannoksella 200 mg/kg



c) Koe alkuannoksella 2 000 mg/kg



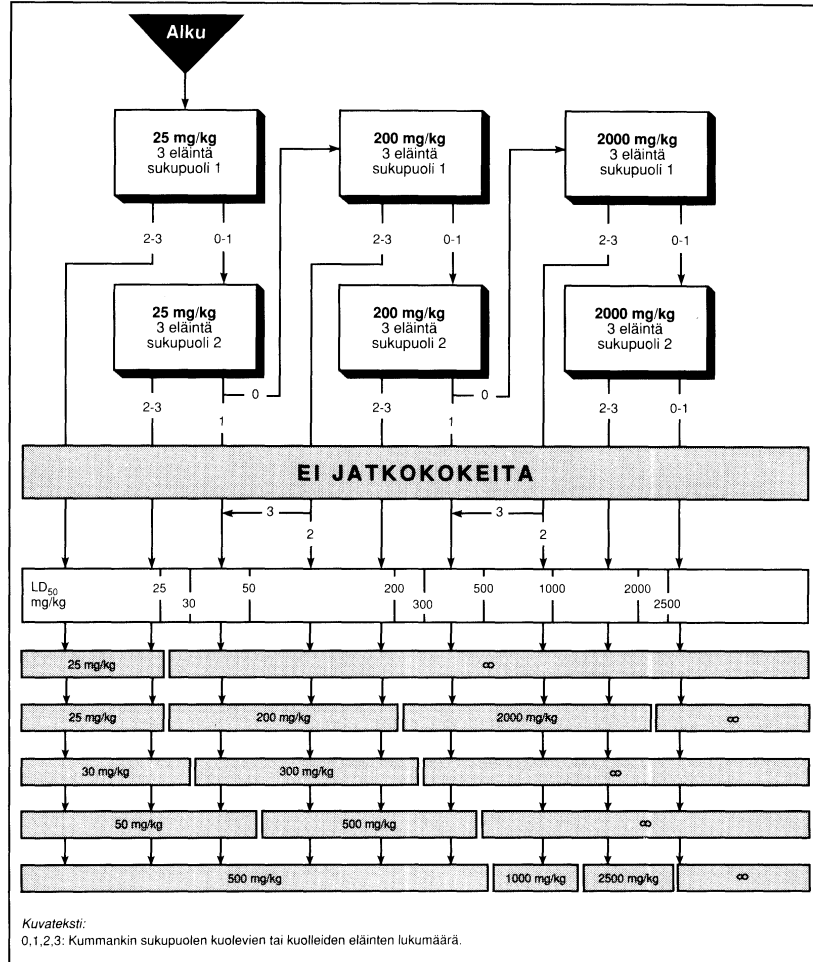
LIITE 2

TULOSTEN TULKINTA 1. KOEVAIHTOEHDON MUKAAN

Tämän liitteen 'ei jatkokokeita' -laatikon alla olevat harmaat laatikot tarkoittavat luokittelun raja-arvoja. Seuraa ensimmäisessä koevaihtoehdossa sopivaa nuolta alaspäin kyseiseen harmaaseen laatikkoon asti.

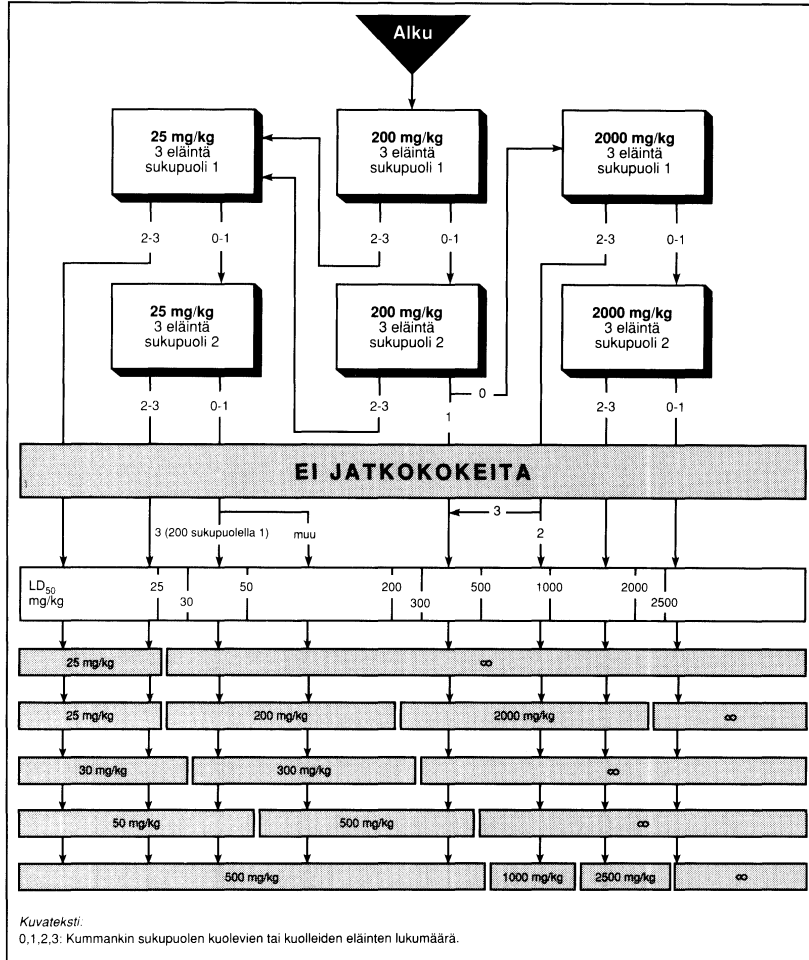
a) 1. koevaihtoehdon tulosten tulkinta

Alkuannos: 25 mg/kg



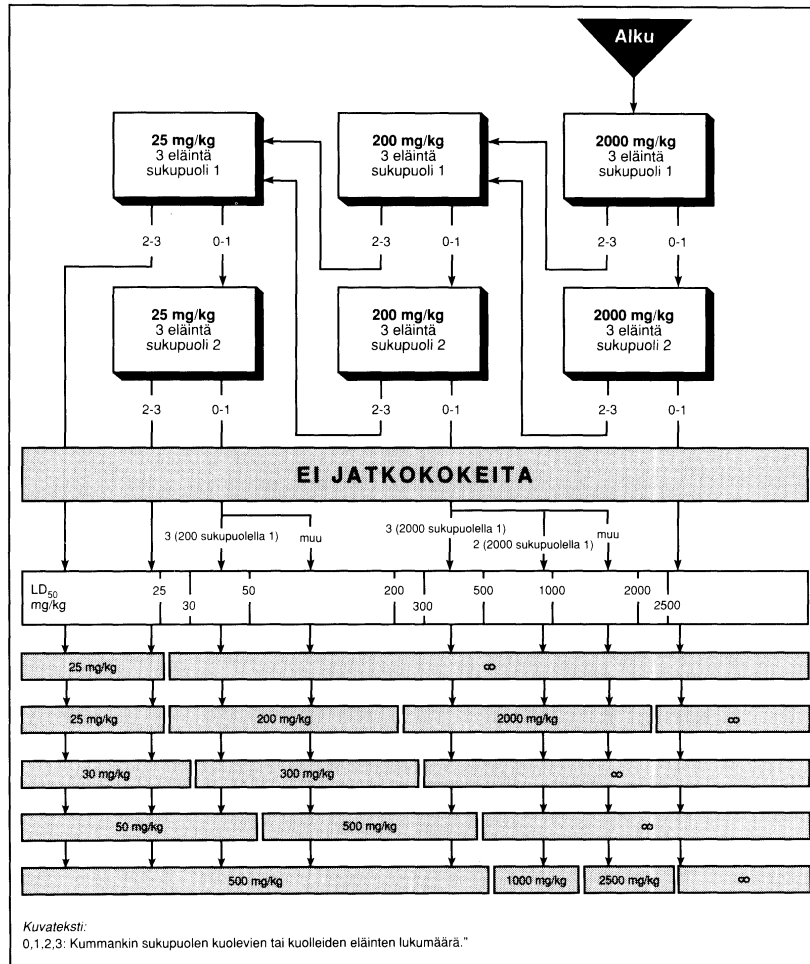
b) 1. koevaihtoehdon tulosten tulkinta

Alkuannos: 200 mg/kg



c) 1. koevaihtoehdon tulosten tulkinta

Alkuannos: 2 000 mg/kg



B. 6 IHON HERKISTYMINEN

1. MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Huomautukset:

Testien herkkyys ja kyky havaita ihmisen ihoa mahdollisesti herkistäviä aineita on tärkeä kansanterveyteen liittyvän toksisuuden luokitusjärjestelmän kannalta.

Kaikkia ihmisen ihoa mahdollisesti herkistäviä aineita ei voida adekvaatisti tunnistaa millään yksittäisellä testimenetelmällä, joka myös sopisi kaikille aineille.

Sellaiset tekijät kuten aineen fysikaaliset ominaisuudet, mukaan lukien sen ihon läpäisykyky, on otettava huomioon testin valinnassa.

On kehitetty kahdentyyppisiä marsutestejä: adjuvanttityyppiset testit, joissa allergista tilaa voimistetaan liuottamalla tai suspensoimalla testiaine Freundin täydelliseen adjuvanttiin (FCA, Freund Complete Adjuvant), ja muut kuin adjuvanttitestit.

Adjuvanttityyppiset testit todennäköisesti ennustavat aineen ihmisen ihoa mahdollisesti herkistävää vaikutusta tarkemmin kuin menetelmät, joissa ei käytetä FCA:ta, minkä vuoksi adjuvanttityyppisiä testejä suositaan.

Marsun maksimaatiotesti (Guinea-Pig Maximisation test, GPMT) on laajalti käytetty adjuvanttityyppinen testi. Vaikka aineen ihon herkistämisen riski voidaan todeta useilla muillakin menetelmillä, marsun maksimaatiotesti on suositeltavin adjuvanttimenetelmä.

Monien kemikaalien kohdalla muita kuin adjuvanttitestejä (joista suositeltavin on Buehlerin testi) pidetään vähemmän herkkinä.

Tietyissä tapauksissa voi olla perusteltua valita Buehlerin testi, jossa aine annostellaan paikallisesti eikä inhonsisäisesti kuten marsun maksimaatiotestissä. Buehlerin testin käytölle on esitettävä tieteelliset perusteet.

Marsun maksimaatiotesti ja Buehlerin testi kuvataan tässä menetelmässä. Myös muita menetelmiä voidaan käyttää edellyttäen, että ne on validoitu hyvin ja niiden käyttö on tieteellisesti perusteltua.

Jos tunnustetussa seulontatutkimuksessa saadaan positiivinen tulos, testiaine voidaan määrittää mahdollisesti herkistäväksi aineeksi eikä ole tarpeen enää tehdä marsutestiä. Jos tunnustetussa seulontatutkimuksessa saadaan negatiivinen tulos, marsutesti on tehtävä tämän testimenetelmän yhteydessä kuvattua menetelmää käyttäen.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 Määritelmät

Ihon herkistyminen: (allerginen kosketushottuma) Aineen aiheuttama immunologisesti välittyvä ihoreaktio. Ihmisellä vastereaktio voi olla kutina, punoitus, turvotus, näppylät, vesirakkulat, vesikkelot tai jokin näiden yhdistelmä. Muilla eläinlajeilla reaktiot voivat olla erilaisia ja vain punoitusta ja turvotusta voi esiintyä.

Induktioaltistus: Koehenkilön kokeellinen altistaminen testiaineelle tarkoituksena aikaansaada yliherkistymistila.

Induktiojakso: Induktioaltistusta seuraava vähintään viikon kestävä jakso, jonka aikana yliherkistymistila voi kehittyä.

Haastealtistus: Aiemmin käsitellyn koehenkilön kokeellinen altistaminen testiaineelle induktiojakson jälkeen koehenkilön mahdollisen yliherkistymisreaktion määrittämiseksi.

1.3. Vertailuaineet

Käytetyn koemenetelmän herkkyys ja luotettavuus tulee tutkia puolen vuoden välein aineilla, joiden tiedetään herkistävän ihoa lievästi tai kohtalaisesti.

Oikein suoritettussa adjuvantititestissä vasteen voidaan odottaa olevan vähintään 30 % ja muussa kuin adjuvantitestissä vähintään 15 % lievillä/kohtalaisilla herkistäjillä.

Seuraavia aineita suositellaan:

CAS-numerot	EINECS-numerot	EINECS-nimet	Generiset nimet
101-86-0	202-983-3	α -heksyyliisinaamialdehydi	α -heksyyliisinaamialdehydi
149-30-4	205-736-8	bentsotiatsoli-2-tioli (merkaptobentsotiatsoli)	kaptaksi
94-09-7	202-303-5	bentsokaiini	norkaiini

Joissakin olosuhteissa voidaan riittävin perustein käyttää muita vertailuaineita, jotka täyttävät edellä mainitut perusteet.

1.4. Koemenetelmän periaate

Koe-eläimet altistetaan testiaineelle aluksi ruiskuttamalla ainetta ihonsisäisesti ja/tai levittämällä sitä iholle (induktioaltistus). Lepojakson (10—14 vrk:n induktiojakso) aikana voi kehittyä immuunivaste. Lepojakson jälkeen eläimet altistetaan haasteannokselle. Haastealtistuksen testiryhmässä aiheuttamaa ihoreaktion laajuutta ja voimakkuutta verrataan verrokkieläimiin, joille annetaan induktion aikana lumekäsittely, mutta jotka saavat kuitenkin haastealtistuksen.

1.5. Koemenetelmien kuvaus

Jos testiaine on välttämättä poistettava, se tulee tehdä vedellä ja sopivalla liuottimella niin ettei saavutettu vaste muutu eikä ihon pinta rikkoonnu.

1.5.1. Marsun maksimaaliotesti

1.5.1.1. Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset albinomarsut totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen testiä. Ennen testiä eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Karvat poistetaan leikkaamalla, ajelemalla tai mahdollisesti kemiallisella depilaatiolla käytetyistä testimenetelmästä riippuen. Varovaisuutta on noudatettava, ettei iho naarmuunnu rikki. Eläimet punnitaan ennen testiä ja sen jälkeen.

1.5.1.2. Koeolosuhteet

1.5.1.2.1. Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytetään yleisesti käytettyjä albinomarsun laboratorioskantoja.

1.5.1.2.2. Lukumäärä ja sukupuoli

Testissä voidaan käyttää sekä uroksia että naaraita. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Testiryhmässä on oltava vähintään kymmenen eläintä ja verrokkiryhmässä vähintään viisi. Testeissä, joissa on käytetty alle 20 testimarsua ja alle 10 verrokkimarsua, eikä testiaineen herkistävyydestä voida tehdä johtopäätöksiä, suositellaan voimakkaasti lisätesteistä siten, että testieläimiä on yhteensä vähintään 20 ja verrokkieläimiä kymmenen.

1.5.1.2.3 Annostasot

Testiaineen pitoisuus kutakin induktioaltistusta kohti tulee olla hyvin siedetty systeemisesti ja korkein mahdollinen lievän tai kohtalaisen ihoärsytyksen aiheuttamiseksi. Haastealtistuspitoisuuden tulee olla suurin ärsyttämätön annos. Mikäli on tarpeen, sopivat pitoisuudet voidaan määrittää esitutkimuksessa kahdella tai kolmella eläimellä. Tähän tarkoitukseen tulisi käyttää FCA:lla käsiteltyjä eläimiä.

1.5.1.3 Kokeen suorittaminen

1.5.1.3.1 Induktio

Päivä 0 — testiryhmä

Lapojen alueelle, jolta on poistettu karvat, pistetään kuusi ihonsisäistä 0,1 ml:n ruisketta pareittain siten, että puolet (3) on keskiviivan vasemmalla ja puolet (3) oikealla puolella.

1. ruiske: 1:1 sekoitus (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta

2. ruiske: testiaine sopivassa vehikkelissä valitulla pitoisuudella

3. ruiske: testiaine valitulla pitoisuudella 1:1 seoksessa (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta.

Kolmannen ruiskeen vesiliukoiset aineet liuotetaan vesifaasiin ennen FCA:han sekoittamista. Rasvaliukoiset tai liukenemattomat aineet suspensoidaan FCA:han ennen vesifaasiin yhdistämistä. Testiaineen lopullisen pitoisuuden on oltava sama kuin toisessa ruiskeessa.

Ensimmäinen ja toinen ruiske pistetään lähekkäin lähimmäksi päätä. Kolmas ruiske pistetään testialueen hännänpuoleiseen osaan.

Päivä 0 — verrokkiryhmä

Kuusi ihonsisäistä 0,1 ml:n ruisketta pistetään samoihin kohtiin kuin testiryhmään kuuluville eläimille.

1. ruiske: 1:1 seos (v/v) FCA:ta ja vettä tai fysiologista keittosuolaliuosta

2. ruiske: laimentamatonta vehikkelää

3. ruiske: 50-prosenttinen w/v -sekoitus vehikkelää FCA:n ja veden tai fysiologisen keittosuolaliuoksen seoksessa suhteessa 1:1 (v/v).

Päivät 5.—7. — testi- ja verrokkiryhmät

Jos aine on ihoa ärsyttämätön, testialuetta käsitellään noin 24 tuntia ennen paikallista induktiota karvojen huolellisen poisleikkaamisen ja/tai ajelemisen jälkeen 0,5 ml:lla 10-prosenttista natrium-lauriylisulfaatti-vaseliinia paikallisärsytyksen aiheuttamiseksi.

Päivät 6.—8. — testiryhmä

Testialueelta poistetaan jälleen karvat. Sopivassa vehikkelissä olevalla testiaineella läpikotaisin kyllästetty suodatinpaperi (2 × 4 cm) asetetaan testialueelle ihoa vasten ja peitetään okklusiositeellä 48 tunniksi. Vehikkelin valinta tulee perustella. Kiinteät aineet hienonnetaan ja yhdistetään sopivaan vehikkeliin. Nesteitä voidaan käyttää laimentamattomina, jos se on tarkoituksenmukaista.

Päivät 6.—8. — verrokkiryhmä

Testialueelta poistetaan jälleen karvat. Pelkkä vehikkeli asetetaan testiaineen tavoin testialueelle ja peitetään okklusiositeellä 48 tunniksi.

1.5.1.3.2 Haastealtistus

Päivät 20.—22. — testi- ja verrokkiryhmät

Testi- ja verrokkieläinten kyljistä poistetaan karvapeite. Testiaineella kyllästetty lappu tai kupu asetetaan eläinten toiseen kylkeen ja tarvittaessa pelkällä vehikkelillä kyllästetty lappu tai kupu toiseen kylkeen. Lappujen annetaan olla ihoa vasten okklusiositeen alla 24 tuntia.

1.5.1.3.3 Havainnointi ja pisteytys: testi- ja verrokkiryhmät

- noin 21 tuntia lapun poistamisen jälkeen haastealue puhdistetaan ja tarvittaessa karvat leikataan huolellisesti pois ja/tai ajellaan tai poistetaan depilaatiolla;
- noin kolme tuntia myöhemmin (noin 48 tunnin kuluttua haastealtistuksen aloittamisesta) havainnoidaan ihoreaktiota ja kirjataan se liitteen pisteytysasteikon mukaisesti;
- noin 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä havainnoinnista ihoreaktiota havainnoidaan uudestaan (72 h) ja tulokset kirjataan jälleen.

Testi- ja verrokkieläinten sokkoarviointia suositellaan.

Jos ensimmäisen haastealtistuksen tulokset vaativat selvittämistä, on harkittava haastealtistuksen uusimista mahdollisesti uudella verrokkiryhmällä, jos se on tarkoituksenmukaista, noin viikon kuluttua ensimmäisestä haastealtistuksesta. Haastealtistus voidaan uusia myös alkuperäisellä verrokkiryhmällä.

Kaikki induktiosta ja haastetoimenpiteistä johtuvat ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset, mukaan lukien systeemiset reaktiot, tulee havainnoida ja kirjata Magnusson/Kligman -pisteytysasteikon mukaan (ks. liite). Muita toimenpiteitä, esimerkiksi histopatologinen tutkimus ja ihopoimuunmittaus, voidaan suorittaa epäilyttävien reaktioiden selvittämiseksi.

1.5.2 *Buehlerin testi*

1.5.2.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset albinomarsut totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen testiä. Ennen testiä eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Karvat poistetaan leikkaamalla, ajelemalla tai mahdollisesti kemiallisella depilaatiolla käytetyistä testimenetelmästä riippuen. Varovaisuutta on noudatettava, ettei ihon pinta naarmuunnu rikki. Eläimet punnitaan ennen testiä ja sen jälkeen.

1.5.2.2 Koeolosuhteet

1.5.2.2.1 Koe-eläimet

Koe-eläiminä käytetään yleisesti käytettyjä albinomarsun laboratorioskantoja.

1.5.2.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Testissä voidaan käyttää sekä uroksia että naaraita. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä.

Testiryhmässä on oltava vähintään 20 eläintä ja verrokkiryhmässä vähintään kymmenen.

1.5.2.2.3 Annostasot

Testiaineen pitoisuuden kutakin induktioaltistusta kohti tulee olla korkein mahdollinen lievä, mutta ei liiallisen ärsytyksen tuottamiseksi. Haastealtistuspitoisuuden tulee olla suurin ärsyttämätön annos. Mikäli on tarpeen, sopivat pitoisuudet voidaan määrittää esitutkimuksessa kahdella tai kolmella eläimellä.

Vesiliukoisten testiaineiden vehikkeliksi sopii vesi tai laimennettu ärsyttämätön pinta-aktiivinen liuos. Muiden testiaineiden vehikkeliksi suositellaan 80-prosenttista etanoli-vesiliuosta induktioon ja asetonia haastealtistukseen.

1.5.2.3 Kokeen suorittaminen

1.5.2.3.1 Induktio

Päivä 0 — testiryhmä

Eläimen toisesta kyljestä leikataan huolellisesti karvat pois. Testilapun tulee olla läpikotaisin kyllästetty sopivaan vehikkeliin (vehikkelin valinta tulee perustella; nestemäisiä testiaineita voidaan käyttää laimentamattomina, jos se on tarkoituksenmukaista) sekoitetulla testiaineella. Testilappu asetetaan testialueelle ihoa vasten ja peitetään tiiviillä lapulla tai kuvulla ja sopivalla siteellä kuudeksi tunniksi.

Testilappujärjestelmän on oltava okklusiivinen. Tarkoitukseen sopii pyöreä tai neliskulmainen vanulappu, jonka pinta-ala on 4–6 cm². Tiiviyden varmistamiseen suositellaan sopivaa kiinnitysmekanismeja. Kääreitä käytettäessä voidaan tarvita lisäalustuskertoja.

Päivä 0 — verrokkiryhmä

Eläimen toisesta kyljestä leikataan huolellisesti karvat pois. Pelkkä vehikkeli asetetaan samoin kuin testiryhmässä. Testilapun annetaan olla ihoa vasten tiiviin lapun tai kuvun ja sopivan siteen alla kuusi tuntia. Jos voidaan osoittaa, ettei lumeverrokkiryhmää tarvita, voidaan käyttää käsittelemätöntä verrokkiryhmää.

Päivät 6.—8. ja 13.—15. — testi- ja verrokkiryhmät

Päivän 0 toimenpiteet tehdään samalle testialueelle (jolta poistetaan tarvittaessa karvat) eläimen samaan kylkeen päivinä 6.—8. ja uudelleen päivinä 13.—15.

1.5.2.3.2 Haastealustus

Päivä 27.—29. — testi- ja verrokkiryhmät

Testi- ja verrokkiryhmien eläinten käsittelemättömistä kyljestä poistetaan karvat (huolellisesti leikkaamalla). Tiivis lappu tai kupu, joka sisältää sopivan määrän testiainetta korkeimpana mahdollisena ärsyttämättömänä pitoisuutena, asetetaan molempien ryhmien eläinten käsittelemättömän kyljen takaosaan.

Tarvittaessa asetetaan myös pelkkää vehikkeliä sisältävä tiivis lappu tai kupu molempien ryhmien eläinten käsittelemättömän kyljen etuosaan. Lappujen tai kupujen annetaan olla ihoa vasten sopivalla siteellä peitettyinä kuusi tuntia.

1.5.2.3.3 Havainnointi ja pisteytys

— noin 21 tuntia lapun poistamisen jälkeen haastealueelta poistetaan karvat;

— noin kolme tuntia myöhemmin (noin 30 tunnin kuluttua haastelapun asettamisesta) havainnoidaan ihoreaktioita ja kirjataan ne liitteen pisteytysasteikon mukaisesti;

— noin 24 tunnin kuluttua 30 ensimmäisen tunnin jälkeen suoritetusta havainnointikerrasta (noin 54 tuntia haastelapun asettamisesta) havainnoidaan ihoreaktioita uudelleen ja tulokset kirjataan.

Testi- ja verrokkieläinten sokkoarviointia suositellaan.

Jos ensimmäisen haastealustuksen tulokset vaativat selventämistä, on harkittava haastealustuksen uusimista mahdollisesti uudella verrokkiryhmällä, jos se on tarkoituksenmukaista, noin viikon kuluttua ensimmäisestä haastealustuksesta. Haastealustus voidaan uusia myös alkuperäisellä verrokkiryhmällä.

Kaikki induktiosta ja haastetoimenpiteistä johtuvat ihoreaktiot ja epätavalliset löydökset, mukaan lukien systeemiset reaktiot, tulee havainnoida ja kirjata Magnusson/Kligman -pisteytysasteikon mukaan (ks liite). Muita toimenpiteitä, esimerkiksi histopatologinen tutkimus ja ihopoimimittaus, voidaan suorittaa epäilyttävien reaktioiden selventämiseksi.

2. TULOKSET (GPMT JA BUEHLERIN TESTI)

Yhteenveto tuloksista tulee esittää taulukossa, josta ilmenee kunkin eläimen ihoreaktiot kullakin havainnointikerralla.

3. **RAPORTOINTI (GPMT JA BUEHLERIN TESTI)**

Jos seulontatesti tehdään ennen marsutestiä, testin (esim. paikallinen imusolmuketesti, LLNA; hiiren korvan turpoamistesti, MEST) kuvaus tai viite, mukaan lukien toimenpiteen yksityiskohdat, on ilmoitettava testi- ja vertailuaineella saatujen tulosten yhteydessä.

Testiraportti (GPMT ja Buehlerin testi)

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

- käytetty marsukanta,
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli
- lähde, elinolosuhteet, ravinto jne. ja
- kunkin eläimen paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

- lapun asettamiskohdan valmistelumenetelmä,
- käytettyjen lappumateriaalien ja lappujen asettamismenetelmän yksityiskohdat,
- esitutkimustulokset ja niiden pohjalta tehty johtopäätös testissä käytettävistä induktio- ja haaste-
pitoisuuksista,
- testiaineen valmistamisen, asettamisen ja poistamisen yksityiskohdat,
- vehikkelin valintaperusteet ja
- induktio- ja haastealtistuksissa käytetyt vehikkeli- ja testiainepitoisuudet sekä induktiossa ja
haastealtistuksessa käytetyn aineen kokonaismäärä.

Tulokset:

- yhteenveto tuoreimman herkkyys- ja luotettavuustarkistuksen tuloksista (ks. 1.3) mukaan
lukien tiedot käytetystä aineesta, pitoisuudesta ja vehikkelistä,
- kunkin eläimen kohdalta mukaan lukien pisteytysjärjestelmä,
- selostuskuvaus havaittujen vaikutusten luonteesta ja voimakkuudesta ja
- mahdolliset histopatologiset löydökset.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. **LÄHDELUETTELO**

Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 406:n kanssa.

Lisäys

TAULUKKO:

Magnusson/Kligman -pisteytysasteikko haastelapputestireaktioiden arvioimiseksi

- 0 = ei silmin havaittavia muutoksia
 - 1 = lievä tai laikukas punoitus
 - 2 = kohtalainen ja yhtenäinen punoitus
 - 3 = voimakas punoitus ja turvotus"
-

B.7 ORAALINEN TOISTUVAN ANNOSTELUN TOKSISUUSTUTKIMUS (28 VRK)

1. MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Ks. yleisjohdanto, osa B.

1.2 Määritelmät

Ks. yleisjohdanto, osa B.

1.3 Koemenetelmän periaate

Testiaine annostellaan useille koe-eläinryhmille suun kautta päivittäin asteittain suurenevinä annoksina siten, että yksi ryhmä saa aina yhtä annostasoa 28 päivän ajan. Annostelujakson aikana eläimiä havainnoidaan tarkoin päivittäin toksisuusoireiden varalta. Kokeen aikana kuolleille tai lopetetuille eläimille tehdään ruumiinavaus. Kokeen lopussa vielä elossa olevat eläimet lopetetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

Tämä menetelmä painottaa neurologisia vaikutuksia spesifisenä kohdevaikutuksena ja eläinten tarkan kliinisen havainnoinnin tarvetta, jotta tietoa saataisiin mahdollisimman paljon.

Menetelmällä tunnistetaan mahdollisesti neurotoksisia kemikaaleja, jotka voivat vaatia tarkempia tutkimuksia tässä suhteessa. Menetelmällä voidaan saada viitteitä myös aineen immunologisista vaikutuksista ja toksisuudesta lisääntymiselimille.

1.4 Koemenetelmän kuvaus

1.4.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaisotannalla testi- ja verrokkiryhmiin. Häkit tulee järjestää siten, että niiden sijoittamisesta mahdollisesti aiheutuvat vaikutukset minimoituvat. Jokainen eläinyksilö tunnistetaan, ja eläinten annetaan olla häkeissään vähintään viiden päivän ajan ennen kokeen aloittamista niiden totuttamiseksi laboratorio-oloihin.

Testiaine annetaan mahaletkun kautta tai ravinnon tai juomaveden mukana. Oraalinen annostelutapa riippuu tutkimuksen tarkoituksesta ja aineen fysikaalis-kemiallisista ominaisuuksista.

Testiaine liuotetaan tai suspensoidaan tarvittaessa sopivaan vehikkeliin. Suositusten mukaan ensin tulee mahdollisuuksien mukaan käyttää vesipohjaista nestettä/suspensiota, sitten öljypohjaista nestettä/emulsiota (esim. maissiöljyä) ja viimeiseksi muihin vehikkeleihin sekoitettua nestettä. Jos vehikkeli on muu kuin vesi, toksiset ominaisuudet on oltava tiedossa. Testiaineen stabiliteetti vehikkelissä on määritettävä.

1.4.2 Koeolosuhteet

1.4.2.1 Koe-eläimet

Suosittelavin jyrksijälaji on rotta, tosin muitakin jyrksijöitä voidaan käyttää. Kokeessa tulee käyttää yleisesti käytettyjä nuoria ja terveitä täysikasvuisia koe-eläinkantoja. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Annostelun tulee alkaa mahdollisimman pian vieroituksen jälkeen ja ainakin ennen yhdeksättä elinviikkoa.

Käytettävien eläinten paino ei saisi juurikaan vaihdella eikä ylittää ± 20 prosenttia kummankaan sukupuolen keskipainosta kokeen alussa.

Silloin kun toistuvan oraalisen annostelun koetta seuraa pitkäaikaistutkimus, molemmissa tutkimuksissa tulee mieluiten käyttää samasta kannasta ja lähteestä olevia eläimiä.

1.4.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kutakin annostasoa tulee testata vähintään kymmenellä eläimellä (viisi naarasta ja viisi urosta). Jos osa eläimistä aiotaan lopettaa kesken kokeen, eläinten määrää tulee lisätä saman verran kuin niitä aiotaan lopettaa ennen kokeen päättymistä.

Lisäksi kymmenen eläimen satelliittiryhmää (viisi kumpaakin sukupuolta) voidaan käsitellä suurella annoksella 28 päivän ajan ja havainnoida toksisten vaikutusten korjaantuvuutta, jatkuvuutta ja ilmenemisen viivästymistä 14 päivän ajan käsittelyn jälkeen. Myös kymmenen verrokkieläimen satelliittiryhmää käytetään.

1.4.2.3 Annostasot

Yleensä tulee käyttää vähintään kolmea testiryhmää ja yhtä verrokkiryhmää. Testiaineen

annostelua lukuunottamatta verrokkieläimiä on käsiteltävä täsmälleen samoin kuin testiryhmän eläimiä. Jos testiaineen annostelussa käytetään vehikkeliä, sitä tulee antaa verrokkiryhmälle suurin käytetty määrä.

Jos muiden tietojen arvioinnin pohjalta vaikutuksia ei ole odotettavissa 1 000 mg/kg:n vuorokausiannoksella, voidaan tehdä raja-annoskoe. Jos saatavilla ei ole sopivia tietoja, voidaan tehdä annosalueen haarukointikoe käytettävien annosten määrittämisen helpottamiseksi.

Annostasot tulee valita ottaen huomioon testiaineesta tai samanlaisista aineista jo olemassa olevat toksisuus- ja (toksiko)kineettiset tiedot. Korkein toksisia vaikutuksia, mutta ei kuolemaa eikä voimakasta kärsimystä aiheuttava annostasot olisi valittava. Sitten valitaan asteittain alenevat annostasot annostukseen liittyvän vasteen ja NOAEL-arvon (no observed adverse effect) osoittamiseksi alhaisimmalla annostasolla. Kaksin-nelinkertaiset välit ovat yleensä ihanteellisia alenevissa annostasosissa ja neljännes testiryhmän käyttöä suositellaan usein erittäin pitkien annosvälien sijasta (esim. kerroin yli 10).

On tärkeää varmistautua, etteivät ravinnon tai juomaveden mukana annosteltavat testiainemäärät häiritse eläimen normaalia ravitsemustilaa tai nestetasapainoa. Ravinnon mukana annosteltava testiaine voidaan vakioda joko sen pitoisuutena ravinnossa (ppm) tai vakioannostasona eläinten ruumiinpainon suhteen. Käytetty vaihtoehto on ilmoitettava erikseen. Mahaletkun kautta annosteltava aine on annettava suurin piirtein samaan aikaan joka päivä ja annosta tulee tarvittaessa muuttaa vakioannostason säilyttämiseksi suhteessa eläimen ruumiinpainoon. Silloin kun toistuvan annostelun koetta seuraa pitkäaikaistutkimus, eläimille tulee antaa samanlaista ravintoa molemmissa tutkimuksissa.

1.4.2.4 Raja-annoskoe

Jos koe yhdellä vähintään 1000 mg/kg/vrk:n annostasolla tai annosteltaessa ravinnon tai juomaveden mukana testiainetta prosentuaalisesti saman verran (ruumiinpainomääritysten perusteella) ei tässä menetelmässä kuvatuilla toimenpiteillä aiheuta havaittavia toksisia vaikutuksia ja jos toksisuutta ei odoteta rakenteellisesti samanlaisista aineista käytössä olevien tietojen perusteella, täydellinen tutkimus kolmella annostasolla ei ehkä ole tarpeen. Raja-annoskoe tehdään paitsi silloin kun ihmisen altistus edellyttää korkeampaa annostasoa.

1.4.2.5 Havainnointijakso

Havainnointijakson on kestettävä 28 päivää. Seurantahavainnointiin tarkoitettuja satelliittiryhmän eläimiä tulisi pitää vähintään 14 päivää ilman annostelua, jotta viivästyneet toksiset vaikutukset, niiden jatkuminen tai niistä toipuminen voidaan todeta.

1.4.3 Kokeen suorittaminen

Testiainetta annetaan eläimille päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan. Viiden päivän viikkoannostusohjelman käyttö on perusteltava. Pakkoruokinta-annostelussa testiaine annetaan kerta-annoksena mahaletkun tai sopivan intubaatiokanyylin kautta. Kerralla annettavan nesteen enimmäismäärä riippuu koe-eläimen koosta. Määrän on oltava alle 1 ml sataa painogrammaa kohti, lukuun ottamatta vesiliuoksia, joita voidaan antaa 2 ml sataa painogrammaa kohti. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden haittavaikutukset yleensä pahenevat korkeammilla pitoisuuksilla, testiainemäärän vaihtelevuus on minimoitava pitoisuutta säätämällä vakiomäärän takaamiseksi kaikilla annostasosilla.

1.4.3.1 Yleishavainnot

Eläimistä on tehtävä kliinisiä yleishavainnoita vähintään kerran päivässä meiluiten suurin piirtein samaan aikaan / samoihin aikoihin joka päivä ja ottaen huomioon, että odotettuja vaikutuksia esiintyy eniten annostelun jälkeen. Eläinten sairastavuus ja kuolleisuus tarkistetaan vähintään kahdesti päivässä. Kuolemaisillaan olevat ja suuresti kärsivät tai kivuliaat eläimet on poistettava tutkimuksesta ja lopetettava humanilla tavalla ja niille on tehtävä ruumiinavaus.

Kutakin eläintä on havainnoitava kliinisesti seikkaperäisesti kerran ennen ensimmäistä altistuskertaa (samaa koe-eläintä koskevia vertailuja varten) ja sen jälkeen vähintään kerran viikossa. Havainnot tulee tehdä eläimen oman häkin ulkopuolella vakioalueella mieluiten samaan kellonaikaan joka kerta. Havainnot on kirjattava muistiin tarkoin, mieluiten

koelaboration erikseen määrittelemiä pisteytysjärjestelmiä käyttäen. Vaihtelut koeolosuhteissa on pyrittävä minimoimaan ja havainnoijien on mieluiten oltava annostelusta tietämättömiä henkilöitä. Huomiota tulee kiinnittää mm. ihon, karvapeitteen, silmien, limakalvojen, mahdollisten sisäeritteiden ja kuona-aineiden ja autonomisen toiminnan (esim. kyynelvuoto, piiloerektio, mustuaisen koko, hengitys) muutoksiin. Käynnin, asennon ja käsittelyvasteen muutokset, mahdolliset klooniset tai tooniset liikkeet, stereotypiat (esim. ylenmääräinen turkin hoito, jatkuva kehän kiertäminen) tai omituinen käytös (esim. itsensä silpominen, takaperin käveleminen) tulee myös kirjata muistiin.

Neljännellä altistusviikolla arvioidaan aistien reaktiivisuutta erityyppisille ärsykeille (esim. kuulo, näkö ja asentotunto), tarttumaotteen voimakkuutta ja motorista toimintaa. Mahdollisten toimenpiteiden tarkemmat yksityiskohdat löytyvät kirjallisuudesta (ks. yleisjohdanto, osa B). Toiminnallisia havaintoja ei tarvitse tehdä neljännellä altistusviikolla, jos kyseessä on subkroonisen (90 päivän) tutkimuksen esitutkimus. Tällöin toiminnalliset havainnot tehdään seurantatutkimuksessa. Toisaalta toistuvan annostelun tutkimuksesta saatavat toiminnallisia havaintoja koskevat tiedot voivat helpottaa annostasojen valintaa subkroonista tutkimusta varten. Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei myöskään tarvitse tehdä ryhmällä, joissa muutoin ilmenee merkkejä toksisuudesta laajuudessa, joka häiritsee merkittävästi toiminnallisten kokeiden suorittamista.

1.4.3.2 Ruumiinpaino ja ravinnon/veden kulutus

Kukin eläin on punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnon ja veden kulutus on mitattava vähintään viikottain. Jos testiaine annostellaan juomavedessä, myös veden kulutus on mitattava vähintään viikoittain.

1.4.3.3 Hematologia

Seuraavat verikokeet on tehtävä koejakson päätyttyä: hematokriitti, hemoglobiini, erytrosyyttien määrä, leukosyyttien kokonaismäärä ja erittelylaskenta, trombosyyttien määrä ja veren hyytymisajan/-potentiaalimittaus.

Verinäytteet tulee ottaa nimetystä kohdasta juuri ennen eläinten lopettamista tai sen yhteydessä. Näytteet tulee säilyttää asianmukaisissa olosuhteissa.

1.4.3.4 Kliininen biokemia

Kliiniset biokemialliset määritykset tärkeimpien toksisten kudosvaikutusten ja erityisesti munuais- ja maksavaikutusten tutkimiseksi tulee tehdä verinäytteistä, jotka otetaan kustakin eläimestä juuri ennen lopettamista tai sen yhteydessä (lukuun ottamatta eläimiä, jotka on löydetty kuolemaisillaan ja/tai lopetettu kesken kokeen).

Eläinten ruokinnan siirtämistä yön yli ennen verinäytteen ottoa suositellaan (1). Plasma- ja seerumikokeiden tulee kattaa natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, kreatiniini, kokonaisproteiini ja albumiini, vähintään kaksi hepatosellulaarisia vaikutuksia osoittavaa entsyymiä (kuten alaniiniaminotransferaasi, aspartaattiaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gammaglutamylitranspeptidaasi ja sorbitolidehydrogenaasi). Muiden entsyymien (maksasta tai muualta peräisin olevien) ja sappihappojen mittauksista voidaan saada hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa.

(1) Ruokinnan siirtämistä yön yli suositellaan monissa seerumi- ja plasmamittauksissa, etenkin glukoosimittauksessa. Tärkein syy tälle suositukselle on, että syöminen väistämättä lisää vaihtelua, mikä voi estää lievien vaikutusten havaitsemisen ja vaikeuttaa tulosten tulkintaa. Toisaalta ruokinnan siirtäminen yön yli voi häiritä eläinten yleistä metaboliaa ja etenkin ruokintatutkimuksissa häiritä päivittäistä altistusta testiaineelle. Jos eläimen ruokinta siirretään yön yli, kliiniset biokemialliset määritykset tulee tehdä neljännellä tutkimusviikolla suoritettavien toiminnallisten havaintojen jälkeen.

Vaihtoehtoisesti voidaan tehdä seuraavat virtsa-analyysit viimeisellä tutkimusviikolla ajastetun virtsankeräyksen avulla: ulkonäkö, määrä, osmolaliteetti tai suhteellinen tiheys, pH-arvo, proteiini, glukoosi ja veri/verisolut.

Lisäksi tulee tutkia, esiintyykö seerumissa yleisiä kudosvaurioita osoittavia merkkiaineita. Muita

määrityksiä, jotka on tehtävä, jos testiaineen tunnetut ominaisuudet voivat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan siihen liittyviin metaboliaprofiileihin, ovat kalsium, fostaatti, triglyseridien paastoarvot, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliiniesteraasi. Nämä on selvitettävä tiettyjen luokkien aineille tai tapauskohtaisesti.

Kaiken kaikkiaan käytännön tulee olla joustava lajin ja annetun aineen havaitun ja/tai odotetun vaikutuksen mukaan.

Jos aiemmat lähtötason tiedot ovat riittämättömiä, hematologiset ja kliiniset biokemialliset muuttujat on määritettävä ennen annostelun aloittamista.

1.4.3.5 Silmämääräinen ruumiinavaus

Jokaiselle koe-eläimelle tehdään täydellinen ja seikkaperäinen silmämääräinen ruumiinavaus, johon kuuluu ruumiin ulkopinnan, kaikkien aukkojen ja kallon-, rinta- ja vatsaontelon ja niiden sisällön huolellinen tutkimus. Jokaisen eläimen maksa, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, kateenkorva, perna, aivot ja sydän puhdistetaan kaikista niihin kiinnittyvistä kudoksista tarkoituksenmukaisella tavalla ja elinten märkäpaino punnitaan mahdollisimman pian dissektion jälkeen kuivumisen estämiseksi.

Seuraavat kudokset säilytetään sekä kudostyyppin että aiotun histopatologisen tutkimuksen kannalta sopivimmassa kiinnitysaineessa: kaikki silmin havaittavat vauriot, aivot (edustavat alueet, mukaan lukien iso- ja pikkuaiivot ja aivosilta), selkäydin, mahalaukku, ohutsuoli, paksusuoli (mukaan lukien Peyerin levy), maksa, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, kateenkorva, kilpirauhanen, henkitorvi ja keuhkot (säilytetään puhaltamalla keuhkot täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla sitten kiinnitysaiheeseen), sukurauhaset, avustavat sukuelimet (esim. kohtu, eturauhanen), virtsarakko, imusolmukkeet (mieluiten yksi annostelureitin kattava imusolmuke ja yksi annostelureitistä distaalinen imusolmuke systeemisten vaikutusten kattamiseksi), ääreisherma (lonkka- tai säärihermo) mieluiten läheltä lihasta ja osa luuydintä (tai vaihtoehtoisesti tuore luuydinaspiraatti). Kliinisten ja muiden löydösten perusteella on vielä ehkä tutkittava muita kudoksia. Myös testiaineen tunnettujen ominaisuuksien perusteella olevat todennäköiset kohde-elimet on säilytettävä.

1.4.3.6 Histopatologiset tutkimukset

Kaikkien verrokkien ja suuriannoksiseen ryhmään kuuluneiden eläinten säilytetyt elimet ja kudokset tutkitaan perusteellisesti histopatologisesti. Histopatologiset tutkimukset tulee tehdä myös kaikille muiden annostusryhmien eläimille, jos käsittelyyn liittyviä muutoksia havaitaan suuriannoksisessa ryhmässä.

Kaikki silmin havaittavat vauriot on tutkittava.

Mahdollisen satelliittiryhmään kuuluvalta eläimiltä tulee tutkia histopatologisesti sellaiset kudokset ja elimet, joissa ilmenee samoja vaikutuksia kuin käsitellyillä ryhmillä.

2. TULOKSET

Koetulokset tulee esittää yksilöidysti. Yhteenvedo tuloksista on esitettävä myös taulukossa, josta ilmenee kussakin koeryhmässä tutkimuksen alussa käytettyjen eläinten lukumäärä, kokeen aikana kuolleen löydettyjen tai humaaneista syistä lopetettujen eläinten lukumäärä ja niiden kuolinaika, toksisuusmerkkejä osoittaneiden eläinten lukumäärä, havaittujen toksisten vaikutusten kuvaus, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, kesto ja vaikeusaste, vaurioita saaneiden eläinten lukumäärä, vauriotyypit ja eläinten prosentuaaliset osuudet vauriotyypeittäin. Numeeriset tulokset on mahdollisuuksien mukaan arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastollisella menetelmällä. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimusasetelman suunnitteluvaiheessa.

3. RAPORTOINTI

Koeraportti

Koeraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

- käytetty laji/kanta,
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli,

- lähde, elinolosuhteet, ravinto jne,
- kunkin eläimen paino kokeen alkaessa ja sen jälkeen viikon välein ja kokeen loputtua.

Koeolosuhteet:

- vehikkelin valinnan perustelut, jos se on muu kuin vesi,
- annostason valintaperustelut,
- yksityiskohdat testiaineen koostumuksesta/ravintovalmisteesta, valmisteessa saavutetusta pitoisuudesta, sen stabiiliteetista ja homogeenisuudesta,
- testiaineen annostelun yksityiskohdat,
- ravinnossa/juomavedessä olevan testiaineen määrän (ppm) muuntaminen varsinaiseksi annokseksi (mg/kg/vrk) tarvittaessa,
- yksityiskohdat ravinnon ja veden laadusta.

Tulokset:

- ruumiinpaino/ruumiinpainon muutokset,
- ravinnon ja tarvittaessa veden kulutus,
- toksiset vastetiedot sukupuolen ja annostason mukaan, mukaan lukien toksisuusoireet,
- kliinisten havaintojen luonne, vaikeusaste ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta),
- arvioinnit aistitoiminnoista, tarttumaotteen voimakkuudesta ja motorisesta toiminnasta,
- verikokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot,
- kliiniset biokemialliset kokeet ja niihin liittyvät lähtötasoarvot,
- ruumiinpaino eläimen lopettamisen yhteydessä ja eri elinten painotiedot,
- ruumiinavauslöydökset,
- kaikkien histopatologisten löydösten seikkaperäinen kuvaus,
- mahdollisesti saatavilla olevat tiedot imeytymisestä,
- tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. LÄHDELUETTELO

Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 407:n kanssa."

B. 10MUTAGEENISUUS –KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO*

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

In vitro kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa aineet, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia viljeltyissä nisäkkäsoluissa (1)(2)(3). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityyppisiä, mutta myös kromosomityyppisiä poikkeavuuksia esiintyy. Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että kemiallinen aine voi aiheuttaa numeerisia poikkeavuuksia. Tätä menetelmää ei ole kuitenkaan suunniteltu numeeristen poikkeavuuksien mittaamiseen, eikä sitä käytetä rutiinimaisesti tähän tarkoitukseen. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat, jotka aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeneisissä ja kasvunrajoitegeneisissä, ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja koe-eläimillä.

In vitro kromosomipoikkeavuustestissä voidaan käyttää pysyvien solulinjojen viljelmiä, solukantoja tai primaarisia soluviljelmiä. Käytettävien solujen valintakriteerejä ovat solujen kasvukyky viljelmässä, karyotyypin pysyvyys, kromosomiluku, kromosomien diversiteetti ja kromosomipoikkeavuuksien spontaanifrekvenssi.

In vitro testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Tällainen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei pysty täysin jäljittelemään *in vivo* olosuhteita nisäkkäissä. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat positiiviset tulokset eivät heijasta aineen luontaista mutageenisuutta ja saattavat johtua pH:n muutoksista, osmolaliteetista tai voimakkaasta sytotoksisuudesta (4)(5).

Tätä testiä käytetään nisäkkäiden mahdollisten mutageenien ja karsinogeenien seulontaan. Monet yhdisteet, joilla saadaan positiivinen tulos tässä testissä, ovat nisäkkäiden karsinogeneeneja. Tämän testin ja karsinogeenisuuden välillä ei ole kuitenkaan täydellistä korrelaatiota. Korrelaatio riippuu kemiallisista ominaisuuksista, ja yhä useammat tutkimustulokset viittaavat siihen, että on olemassa karsinogeneeneja, joita ei voida havaita tällä testillä, koska ne näyttävät vaikuttavan muiden mekanismien kuin suoran DNA-vaurion välityksellä.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleen yhtymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleen yhtymisenä samassa kohdassa.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitooseen vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, . . . kromatidia.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidin (kromatidien) siirtymä.

Mitoosi-indeksi: suhdeluku, joka saadaan jakamalla metafasisissa olevien solujen määrä solupopulaatiossa todettujen solujen kokonaismäärällä; ilmoittaa solujen proliferaatioasteen kyseisessä solupopulaatiossa.

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (n) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä ($3n$, $4n$ jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafasisvaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijänvaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Soluviljelmät altistetaan tutkittavalle aineelle sekä ilman metabolista aktivaatiota että metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa. Kun soluviljelmät on altistettu tutkittavalle aineelle, ne käsitellään etukäteen määrätyn välein metafasisin pysäyttävällä aineella (esim. Colcemid® tai kolkisiini), solut kerätään ja värjätään, ja metafasisissa olevat solut analysoidaan mikroskooppisesti kromosomipoikkeavuuksien havaitsemiseksi.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 Testin valmistelu

1.4.1.1 *Solut*

Testissä voidaan käyttää eri solulinjoja, solukantoja tai primaarisia soluviljelmiä, myös ihmisen soluja (esim. kiinanhamsterin fibroblasteja, ihmisen tai muun nisäkkään perifeerisen veren lymfosyyttejä).

1.4.1.2 *Kasvatusväliainet ja viljelyolosuhteet*

Soluviljelmien ylläpidossa on käytettävä soveltuvia kasvatusalustoja ja inkubaatio-olosuhteita (kasvatusastiat, CO₂-pitoisuus, lämpötila ja kosteus). Pysyvistä solulinjoista ja kannoista on tarkistettava ajoittain modaalisen kromosomimäärän pysyvyys ja mahdollinen mykoplasmakontaminaatio. Kontaminoituneita viljelmiä ei pidä käyttää. Solujen normaali solusyklin kesto ja käytetyt viljelyolosuhteet on tunnettava.

1.4.1.3 *Soluviljelmien valmistelu*

Pysyvät solulinjat ja solukannat: solut kasvatetaan kantaviljelmistä, kylvetään kasvatusväliaineeseen sellaiseen tiheyteen, että soluviljelmät eivät saavuta konfluenttisuutta ennen solujen keräämisajankohtaa, ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

Lymfosyytit: antikoagulanteilla (esim. hepariinilla) käsiteltyä kokoverta tai terveiltä luovuttajilta saatuja erotettuja lymfosyyttejä lisätään mitogeneita (esim. fytohemagglutiniinia) sisältävään kasvatusväliaineeseen ja inkuboidaan 37 °C:ssa.

1.4.1.4 *Metabolinen aktivaatio*

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolinen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (6)(7)(8)(9) tai fenobarbitonin ja β-naftoflavonin (10)(11)(12) yhdistelmällä käsiteltyjen jyrksijöiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria.

Postmitokondriaalisen jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa testiväliaineessa 1-10% v/v. Metabolinen aktivaatiojärjestelmä voi vaihdella sen mukaan, mihin kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta.

Monilla kehitetyillä menetelmillä, kuten yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetuilla solulinjoilla, joissa ilmenee spesifisiä aktivaatioentsyymejä, saattaa olla endogeenista aktivaatiovaikutusta. Käytettyjen solulinjojen valinnan on oltava tieteellisesti perusteltua (esim. sytokromi P450 -isoentsyymien merkitys tutkittavan aineen metaboliolle).

1.4.1.5 *Tutkittava aine/Valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Tutkittava aine on valmistettava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikuttaa solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä. Vesi voidaan poistaa lisäämällä molekyyliisiviilä.

1.4.2.2 *Altistuspitoisuudet*

Huomioonotettavia kriteerejä suurinta pitoisuutta määritettäessä ovat sytotoksisuus, liukoisuus testijärjestelmään ja pH:n tai osmolaliteetin muutokset.

Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solujen eheyden ja solukasvun indikaattoreita, kuten konfluenttisuuden astetta, elinkykyisten solujen määrää tai mitoosi-indeksiä. Sytotoksisuus ja liukoisuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavassa kokeessa.

Vähintään kolmea analysoitavissa olevaa pitoisuutta on käytettävä. Mikäli sytotoksisuutta esiintyy, näiden pitoisuuksien on katettava alue, jossa suurimmalla pitoisuudella on maksimaalinen myrkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkyvaikutusta, mikä tarkoittaa yleensä sitä, että pitoisuudet voivat poiketa toisistaan enintään kertoimella $2\sqrt{10}$. Solujen keräämisajankohtana suurimpaan pitoisuuteen tulisi liittyä merkittävä konfluenttisuuden asteen, solumäärän tai mitoosi-indeksin pieneneminen (kaikkien osalta yli 50 %). Mitoosi-indeksi on vain epäsuora sytotoksisten/sytostaattisten vaikutusten mitta, ja se riippuu altistuksesta kuluneesta ajasta. Mitoosi-indeksi hyväksytään kuitenkin suspensioviljelmissä, joissa muiden myrkyvaikutusta mittaavien menetelmien käyttö saattaa olla hankalaa ja epäkäytännöllistä. Tietoja solusyklin kinetiikasta, kuten keskimääräistä generaatioaikaa (average generation time, AGT), voidaan käyttää täydentävinä tietoina. AGT on kuitenkin yleinen keskiarvo, joka ei aina paljasta hidastuneiden alapopulaatioiden olemassaoloa, ja vähäisenkin keskimääräisen generaatioajan piteneminen voi siirtää poikkeavuuksien optimaalista toteamisaikaa hyvinkin paljon myöhemmäksi.

Soluille suhteellisen myrkyttömiä aineita tutkittaessa suurimman testattavan pitoisuuden on oltava 5 µl/ml, 5 mg/ml tai 0.01 M, sen mukaan, mikä näistä pitoisuuksista on pienin.

Testattaessa huonosti veteen liukenevia aineita, jotka ovat myrkyttömiä liukenemattoman pitoisuuden alittavina pitoisuuksina, suurimman käytetyn annoksen aikaansaaman pitoisuuden on ylitettävä liukoisuusraja lopullisessa kasvatusväliainessa altistusjakson lopussa. Joissakin tapauksissa (esim. kun myrkyvaikutus todetaan ainoastaan pienimmän liukenemattoman pitoisuuden ylittävillä pitoisuuksilla) on suositeltavaa testata useampia kuin yksi pitoisuus, jossa havaitaan näkyvää saostumista. Liukoisuus kannattaa arvioida sekä käsittelyn alussa että lopussa, sillä se voi muuttua koejärjestelmässä altistuksen aikana esimerkiksi solujen, S9:n, seerumin ym. vaikutuksesta. Liukenemattomuus voidaan havaita paljaalla silmällä. Sakan ei pitäisi vaikuttaa laskentaan.

1.4.2.3 *Negatiiviset ja positiiviset kontrollit*

Jokaisessa kokeessa on käytettävä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontroleja, sekä metabolisen aktivaation läsnäollessa että ilman sitä. Metabolista aktivaatiota käytettäessä positiivisena kontrollina on käytettävä sellaista kemiallista ainetta, joka vaatii aktivaatiota mutageenisen vasteen aikaansaamiseksi.

Positiivisina kontrolliaineina on käytettävä tunnettua klastogeenia altistustasoina, joiden voidaan odottaa aiheuttavan toistettavissa ja havaittavissa olevan lisääntymisen taustaan verrattuna, mikä osoittaa koejärjestelmän herkkyyden.

Positiivisen kontrolliaineen pitoisuudet on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasiens identiteettiä. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Metabolinen aktivaatio	Aine	CAS No.	EINECS No.
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3	200-625-0
	Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
	Etyylinitrosoorea	759-73-9	212-072-2
	Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrokinoliini-N-oksidi	56-57-5	200-281-1
Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	Bentso[<i>a</i>]pyreeni	50-32-8	200-028-5
	Syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
	Syklofosfamidimonohydraatti	6055-19-2	

Muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvan positiivisen kemiallisen kontrolliaineen käyttöä on harkittava, mikäli tällainen aine on käytettävissä.

Jokaisena solujen keräämisajankohtana on otettava näytteet myös negatiivisista kontrolleista, jotka koostuvat tutkittava ainetta sisältävässä kasvatusväliaineessa olevasta liuottimesta tai pelkästä kantaja-aineesta ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja viljelmiä. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat tiedot kontrollista osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.4.3 Testin suorittaminen

1.4.3.1 Altistaminen tutkittavalle aineelle

Lisääntyvät solut altistetaan tutkittavalle aineelle metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa ja ilman sitä. Lymfosyyttien altistus on aloitettava noin 48 tunnin kuluttua mitogeenisestä stimulaatiosta.

1.4.3.2 Normaalista pitoisuudesta tulisi tehdä kaksi rinnakkaista viljelmää, ja niiden käyttöä suositellaan erityisesti negatiivisissa/liuotinkontrolliviljelmissä. Mikäli aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että rinnakkaisviljelmien välillä on vain hyvin vähäisiä eroja (13)(14), yhden viljelyn käyttö kustakin pitoisuudesta saattaa olla hyväksyttävää.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita on testattava asianmukaisilla menetelmillä, kuten suljetuissa kasvatusastioissa (15)(16).

1.4.3.3 *Näytteiden keräämisajankohdat*

Ensimmäisessä kokeessa soluja on altistettava tutkittavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä 3-6 tunnin ajan, ja näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalin solusyklin kuluttua altistuksesta (12). Jos tässä menettelyssä saadaan negatiiviset tulokset sekä metabolisen aktivaation läsnäollessa että ilman sitä, on tehtävä uusi testi ilman aktivaatiota, ja altistusta on jatkettava yhtäjaksoisesti siihen asti, kun näytteet kerätään suunnilleen 1,5 normaalia solusykliä vastaavan ajan kuluttua. Tietyt kemialliset aineet saatetaan havaita helpommin, kun altistus/näytteenottoaika on pitempi kuin 1,5 solusykliä. Metabolisen aktivaation läsnäollessa saadut negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista pidetä tarpeellisena, perustelut on esitettävä.

1.4.3.4 *Kromosomipreparaatti*

Soluviljelmää käsitellään Colcemid®-illa tai kolkisiinilla yleensä 1-3 tunnin ajan ennen näytteiden keräämistä. Jokaisen viljelmän näytteet kerätään ja käsitellään erikseen kromosomipreparaattien valmistusta varten. Kromosomipreparaattien valmistukseen kuuluu solujen hypotoninen käsittely, fiksointi ja värjäys.

1.4.3.5 *Analyysi*

Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska fiksaatio johtaa usein joidenkin metafasisissa olevien solujen rikkoutumiseen ja kromosomien menettämiseen, lasketuissa soluissa tulisi olla sentromeerejä modaalista lukumäärää vastaava määrä ± 2 kaikissa solutyypeissä. Kustakin pitoisuudesta ja kontrollista olisi laskettava vähintään 200 hyvin levinnyttä metafasia, jotka jakautuvat tasaisesti rinnakkaisviljelmien kesken, mikäli niitä käytetään. Lukumäärää voidaan pienentää, mikäli aberratioita todetaan runsaasti.

Vaikka testillä pyritään ensisijaisesti toteamaan rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet, on tärkeää rekisteröidä myös polyploidia ja endoreduplikaatio, mikäli näitä esiintyy.

2. **TULOKSET**

2.1 **TULOSTEN KÄSITTELY**

Kokeellinen yksikkö on solu, joten on arvioitava niiden solujen prosentuaalinen määrä, joissa on rakenteellinen kromosomipoikkeavuus (poikkeavuuksia). Eri tyyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava ja niiden lukumäärät ja esiintymistäajuudet altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä on mainittava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan poikkeavuuksien kokonaistaajuuteen.

Lisäksi on rekisteröitävä kaikissa testiviljelmissä ja negatiivisissa kontrolliviljelmissä tehdyt samanaikaiset sytotoksisuusmittaukset pääasiallisissa kromosomipoikkeavuustesteissä

Tulokset on ilmoitettava kutakin viljelmää kohti. Lisäksi on esitettävä yhteenveto kaikista tiedoista taulukkomuodossa.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa. Negatiivisten tulosten vahvistamisen tarvetta on käsitelty kohdassa 1.4.3.3. Jatkokokeissa on harkittava tutkimusparametrien modifiointia arvioitavien olosuhteiden laajentamiseksi. Mahdollisia modifioitavia tutkimusparametrejä ovat pitoisuusvälit ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisten tulosten määrittämiseen on useita kriteerejä, kuten kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän lisääntyminen, joka on riippuvainen tutkittavan aineen pitoisuudesta tai on toistettavissa. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (3)(13). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Polyplloidisten solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine pystyy estämään mitoottisia prosesseja ja aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia. Endoreduplikoituneitaromosomeja sisältävien solujen määrän suureneminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine kykenee pysäyttämään solusyklin etenemisen (17)(18).

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä koejärjestelmässä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

In vitro kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia viljelyssä nisäkkäiden somaattisissa soluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia viljelyssä nisäkkäiden somaattisissa soluissa.

3. RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine

— kantaja-aineen valintaperusteet;

— tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuotimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa;

Solut:

- solutyypin ja solujen lähde;
- karyotyypin ominaisuudet ja käytetyn solutyypin soveltuvuus;
- mykoplasman puuttuminen, tarvittaessa;
- tiedot solusyklin pituudesta;
- verenluovuttajien sukupuoli, kokoveri vai eristetyt lymfosyytit, käytetty mitogeeni;
- siirtojen lukumäärä, tarvittaessa;
- soluviljelmän ylläpitomenetelmät, tarvittaessa;
- kromosomien modaalinen lukumäärä.

Koeolosuhteet:

- metafasiin estämiseen käytetty aine, sen pitoisuus ja solujen altistuksen kesto;
- pitoisuuksien ja soluviljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset, mikäli tiedot ovat käytettävissä;
- kasvatusväliaineen koostumus, CO₂-pitoisuus, tarvittaessa;
- tutkittavan aineen pitoisuus;
- lisätyn kantaja-aineen ja tutkittavan aineen määrä;
- inkubaatiolämpötila;
- inkubaatioaika;
- altistuksen kesto;
- solutiheys kylvämisen aikana, tarvittaessa;
- metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös sen hyväksyttävyysskriteerit;
- positiiviset ja negatiiviset kontrollit;
- objektilasien valmistelumenetelmät;
- kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit;
- analysoitujen metafasiin lukumäärä;
- myrkyvaikutuksen mittausten menetelmät;
- positiivisten, negatiivisten tai epäselvien tulosten kriteerit.

Tulokset:

- myrkkyyvaikutuksen merkit, esim. konfluenttisuuden aste, solusykliä koskevat tiedot, solumäärät, mitoosi-indeksi;
- saostumisen merkit;
- tiedot tutkittavaa ainetta sisältävän kasvatusväliaineen pH:sta ja osmolaliteetista, jos määritetty;
- kromosomipoikkeavuuksien, myös aukkojen, määrittely (gaps);
- kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ilmoitetaan kunkin altistetun viljelmän ja kontrolliviljelmän osalta erikseen;
- ploidian muutokset, jos niitä esiintyy;
- annos-vastesuhde, mikäli mahdollista;
- mahdolliset tilastolliset analyysit;
- rinnakkaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollien tulokset;
- aikaisemmat tutkimustulokset negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat..

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

1. Evans, H.J. (1976). Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens. In: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1-29.
2. Ishidate, M.Jr. and Sofuni, T. (1985). The *in Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture. In: Progress in Mutation Research, Vol. 5, Ashby, J. et al., (Eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York-Oxford, 427-432.
3. Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G.H., Resnick, 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., Bates, 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, pp. 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, pp. 141-154.
14. Soper, K.A. and Galloway, S.M. (1994). replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells. *Mutation Res.*, 312, 139-149.
15. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
16. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 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.11 MUTAGEENISUUS – KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI NISÄKKÄIDEN

LUUYTIMESSÄ *IN VIVO*

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäillä *in vivo* tehtävää kromosomipoikkeavuustestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien rakenteellisten kromosomipoikkeavuuksien osoittamiseen nisäkkäiden, yleensä jyrsijöiden, luuydinsoluissa (1)(2)(3)(4). Rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että kemiallinen aine voi aiheuttaa numeerisia poikkeavuuksia. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityypisiä, mutta myös kromosomityypisiä mutaatioita esiintyy. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat, jotka aiheuttavat muutoksia somaattisten solujen onkogeneisissä ja kasvunrajoitegeneisissä, ovat osallisina syövän synnyssä ihmisillä ja kokeellisissa järjestelmissä.

Tässä testissä käytetään rutiinimaisesti jyrsijöitä. Luuydin on tämän testin kohdekudos, sillä sen verisuonitus on hyvin runsasta ja se sisältää solupopulaation, jonka solusykli on nopea ja joka on helppo eristää ja prosessoida. Tätä menetelmää ei käytetä muilla lajeilla eikä muissa kohdekudoksissa.

Tämä kromosomipoikkeavuustesti soveltuu erityisesti mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin, joskin näissä saattaa esiintyä eroja lajien ja kudosten välillä. *In vivo* testiä voidaan käyttää myös *in vitro* testissä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkok tutkimuksena.

Jos on saatu viitteitä siitä, ettei tutkittava aine tai sen reaktiivinen metaboliitti pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenytymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenytymisenä samassa kohdassa.

Endoreduplikaatio: tapahtumasarja, jossa DNA:n kahdentumisen S-vaiheen jälkeen tuma ei etene mitooseen vaan aloittaa uuden S-vaiheen. Tämän seurauksena syntyy kromosomeja, joissa on 4, 8, 16, . . . kromatidia.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidin (kromatidien) siirtymä

Numeerinen poikkeavuus: käytetyille soluille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (n) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä ($3n$, $4n$ jne.).

Rakenteellinen poikkeavuus: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina ja fragmentteina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijävaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiinia tai Colcemidia[®]). Tämän jälkeen luuydinsoluista tehdään kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevien solujen kromosomipoikkeavuudet analysoidaan.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 Testin valmistelu

1.4.1.1 Eläinlajien valinta

Yleisesti käytettyjä eläinlajeja ovat rotta, hiiri ja kiinanhamsteri, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratorioskantaa olevia nuoria terveitä aikuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään $\pm 20\%$ kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 Asuinolot ja ruokinta

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa, mutta kosteustavoitteen on oltava 50-60 %.

1.4.1.3 Eläinten valmistelu

Terveet nuoret aikuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmistettava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koelosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan kumpaakin sukupuolta olevat rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa rakenteellisia poikkeavuuksia *in vivo* altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan poikkeavuuksien havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Positiivisten kontrollien annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolli voidaan antaa eri reittiä kuin tutkittava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolleista:

Aine	CAS No.	EINECS No.
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
Etyylnitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
Syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
Syklofosamidimonohydraatti	6055-19-2	
Trietyleenimelamiini	51-18-3	200-083-5

Pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta saaneista negatiivisista kontrolleista, joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenotokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistäajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Jos negatiivisista kontrolleista otetaan vain yksi näyte, se tulisi ottaa ensimmäisellä näytteenotokerralla. Lisäksi on käytettävä myös käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleilla aikaisemmin tehdyt tutkimukset tai julkaistut tulokset osoittavat, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa eläintä kumpaakin sukupuolta. Vain toista sukupuolta voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla samaa altistusreittiä käyttäen tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavat aineet tulisi antaa mieluiten kerta-annoksena. Ne voidaan kuitenkin antaa myös jaettuina annoksina, eli kahtena altistuksena saman päivän aikana vain muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Muut annosteluohjelmat on perusteltava tieteellisesti.

Näytteet on otettava kahtena ajankohtana saman päivän aikana altistuksen jälkeen. Jyrsijöillä ensimmäisen näytteenottovälin pituus on 1,5 normaalia solusykliä (solusyklin pituus on normaalisti 12-18 tuntia) altistuksen jälkeen. Koska tutkittavan aineen soluunottoon ja metaboloitumiseen kuluva aika ja sen vaikutus solusyklin kineetiikkaan voi muuttaa kromosomipoikkeavuuksien optimaalista havaitsemisajankohtaa, myöhempi näyte tulisi kerätä 24 tunnin kuluttua ensimmäisestä näytteestä. Jos tutkittavaa ainetta annetaan pitempään kuin yhden päivän ajan, yksi näyte on otettava 1,5 normaalin solusyklin kuluttua viimeisestä altistusajankohdasta.

Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. Colcemid[®]ia tai kolkisiinia). Eläimistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä tämä väli on noin 3-5 tuntia; kiinanhamstereilla se on noin 4-5 tuntia. Solut kerätään luuytimestä ja analysoidaan kromosomipoikkeavuuksien toteamiseksi.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (5). Mikäli myrkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaa annosteluohjelmaa käytettäessä suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit) saattavat edellyttää toisenlaisia annoksenmäärityskriteerejä, ja niitä pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määrittellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia luuytimessä (esim. mitoosi-indeksi pienenee yli 50 %).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivänä aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Pitempään kestävässä tutkimuksessa raja-annos on 2000 mg painokiloa kohti vuorokaudessa, jos altistusta jatketaan enintään 14 vuorokautta, ja 1000 mg/kg/vrk, jos altistus kestää yli 14 vuorokautta. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Kromosomipreparaatin valmistus**

Luuydintä kerätään heti eläinten lopettamisen jälkeen, käsitellään hypotonisella liuoksella ja fiksoidaan. Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään.

1.5.7 Analyysi

Mitoosi-indeksi on määritettävä sytotoksisuuden mittana vähintään 1000 solusta eläintä kohti kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä (myös positiivisista kontrolleista) ja altistamattomista negatiivisista kontrollieläimistä.

Jokaisesta eläimestä on analysoitava vähintään 100 solua. Määrä voi olla pienempi, mikäli havaitaan runsaasti poikkeavuuksia. Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska objektilasien valmistelu johtaa usein joidenkin metafaasissa olevien solujen rikkoutumiseen ja kromosomien menettämiseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa soluissa on vastattava lukua $2n \pm 2$.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Yksittäisten eläinten tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Jokaisesta eläimestä on arvioitava laskettujen solujen lukumäärä, poikkeavuuksien lukumäärä solua kohti ja niiden solujen prosentuaalinen osuus, joissa on yksi tai useampia rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia. Eri tyyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueltava ja niiden lukumäärä ja esiintymistäajuus on ilmoitettava koe- ja kontrolliryhmien osalta. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vasteroista ole havaittavissa, molempien sukupuolten tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen suhteellisen lukumäärän annoksesta riippuva suureneminen tai kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisessä annosryhmässä yhdellä näytteenotokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (6). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Polyploidian lisääntyminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine pystyy aiheuttamaan numeerisia kromosomipoikkeavuuksia. Endoreduplikaation lisääntyminen saattaa osoittaa, että tutkittava aine kykenee pysäyttämään solusyklin etenemisen (7)(8).

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi tehtyjen kokeiden lukumäärästä riippumatta.

In vivo kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin luuytimessä.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen (esim. systeeminen toksisuus) on pohdittava.

RAPORTOINTI**TUTKIMUSSELOSTUS**

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liutin/kantaja-aine

- kantaja-aineen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuotimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa;

Koe-eläimet:

- käytetty eläinlaji/kanta;
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli;
- hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.;
- eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä;

Koelosuhteet:

- positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit;
- mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset;
- annostasojen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat;
- tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat;
- antotavan valintaperusteet;
- menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen, tarvittaessa;
- ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa;
- yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta;
- yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenkeräysohjelmasta;
- myrkyvaikutuksen mittausmenetelmät;
- metafaasin pysäyttämiseksi käytetty aine, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto;
- objektilasien valmistusmenetelmät;
- kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit;
- analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti;
- kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

- myrkyvaikutuksen merkit;
- mitoosi-indeksi;
- kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen;
- kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat;
- kromosomipoikkeavuuksia sisältäneiden solujen lukumäärä ryhmää kohti sekä keskiarvot ja keskihajonnat;
- ploidian muutokset, jos niitä esiintyy;
- annos-vastesuhde, mikäli mahdollista;
- mahdolliset tilastolliset analyysit;
- rinnakkaisen negatiivisen kontrollin tulokset;
- aikaisemmat negatiivisesta kontrollista saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat;
- rinnakkaisen positiivisen kontrollin tulokset.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4.

KIRJALLISUUTTA

1. Adler, I.D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. S. Venitt and J.M. Parry (Eds). IRL Press, Oxford, Washington D.C., pp. 275-306.
2. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F. and Shelby, M. (1987). Mammalian *In Vivo* Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells. *Mutation Res.*, 189, 157-165.
3. Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D.G., Bootman, J. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
4. Tice, R.R., Hayashi, M., MacGregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Holden, H.E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F.B., Pacchierotti, F., Preston, R.J., Romagna, F., Shimada, H., Sutou, S. and Vannier, B. (1994). Report from the Working Group on the *in Vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test. *Mutation Res.*, 312, 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.
6. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report Part III. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. D.J. Kirkland, (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge. pp. 184-232.
7. Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest. *Mutation Res.* 119, 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. 12 MUTAGEENISUUS – MIKROTUMATESTI NISÄKKÄÄN PUNASOLUISSA *IN VIVO*

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäiden *in vivo* mikrotumatestiä käytetään tutkittavan aineen aiheuttamien kromosomivaurioiden tai mitosilaitteen vaurioiden toteamiseen erythroblasteissa analysoimalla eläinten, yleensä jyrsijöiden, luuytimeä kerättyjä punasoluja ja/tai perifeerisiä verisoluja.

Mikrotumatestin tarkoituksena on tunnistaa sellaisia sytogeneettisiä vaurioita aiheuttavat aineet, jotka johtavat hitaasti liikkuvia (lagging) kromosomifragmentteja tai kokonaisia kromosomeja sisältävien mikrotumien muodostumiseen.

Kun luuytimen erythroblasti kehittyy polykromaattiseksi punasoluksi, päätuma irtoaa solusta, ja mahdollinen muodostunut mikrotuma saattaa jäädä muutoin tumattomaan solulimaan. Päätuman puuttuminen helpottaa mikrotumien havaitsemista näissä soluissa. Mikrotumaisten polykromaattisten punasolujen suurentunut esiintymistäajuus altistetuilla eläimillä on osoitus tutkittavan aineen aiheuttamasta kromosomivauriosta.

Tässä testissä käytetään rutiinimaisesti jyrsijöiden luuydintä, sillä polykromaattiset punasolut muodostuvat luuytimessä. Mikrotumaiset epäkypsät (polykromaattiset) punasolut voidaan mitata yhtä hyvin perifeerisestä verestä miltä tahansa eläinlajilta, jonka perna ei kykene poistamaan mikrotumaisia punasoluja tai jonka on todettu olevan riittävän herkkä rakenteellisia tai numeerisia kromosomipoikkeavuuksia aiheuttavien aineiden osoittamiseen. Mikrotumien erottamisessa voidaan käyttää useita kriteerejä. Näitä ovat kinetokorin tai sentromeerisen DNA:n osoittaminen mikrotumissa tai puuttuminen niistä. Mikrotumaisten epäkypsien (polykromaattisten) punasolujen esiintymistäajuus on pääasiallinen tulos. Perifeerisen veren kypsien (normokromaattisten) punasolujen lukumäärää, jossa esiintyy mikrotumia tietyssä määrässä kypsiä punasoluja, voidaan myös käyttää analyysin tuloksena, kun eläimet saavat tutkittavaa ainetta jatkuvasti vähintään 4 viikon ajan.

Tämä nisäkkäiden *in vivo* mikrotumatesti soveltuu erityisesti mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* -metaboliaan, farmakokinetiikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin, joskin näissä saattaa esiintyä eroja eri lajeilla, eri kudoksissa ja geneettisissä tuloksissa. *In vivo* analyysi on hyödyllinen myös *in vitro* koejärjestelmässä havaitun mutageenisen vaikutuksen jatkotutkimuksena.

Jos on saatu viitteitä siitä, että testattava aine, tai sen reaktiivinen metaboliitti, ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Sentromeeri (Kinetokori): Kromosomin alue (alueita), joihin sukkularihmat ovat kiinnittyneet solunjakautumisen aikana. Tähän perustuu tytärokromosomien järjestäytyneen siirtyminen tytärsolujen napoihin.

Mikrotumat: Pieniä solun päätumasta erillisiä ja niiden rinnalla esiintyviä tumia, jotka muodostuvat mitosisin (meiosisin) telofaasin aikana hitaasti liikkuvista (lagging) kromosomikappaleista tai kokonaisista kromosomeista.

Normokromaattinen punasolu: Kypsä punasolu, josta puuttuvat ribosomit ja joka voidaan erottaa polykromaattisista punasolujen esiasteista ribosomiselektiivisillä väriaineilla.

Polykromaattinen punasolu: Punasolun esiaste, kehityksen välivaiheessa oleva (epäkypsä) punasolu, jossa on edelleen ribosomeja ja joka voidaan tämän perusteella erottaa kypsistä, normokromaattisista punasoluista ribosomiselektiivisillä väriaineilla.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle sopivaa antotapaa käyttäen. Jos käytetään luuydintä, eläimet lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta, luuydin poistetaan ja preparaattit valmistetaan ja värjätään (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7). Käytettäessä perifeeristä verta verinäytteet otetaan sopivina ajankohtina altistuksen jälkeen, tehdään sivelyvalmisteet ja värjätään (4)(8)(9)(10). Perifeeristä verta käyttävissä tutkimuksissa viimeisen altistuksen ja solujen keräämisen välisen ajan tulisi olla mahdollisimman lyhyt. Preparaatit analysoidaan mikrotumien toteamiseksi.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 Testin valmistelu

1.4.1.1 *Elämlajin valinta*

Luuydintä käytettäessä hiiret tai rotat ovat suositeltavia koe-eläimiä, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Perifeerisestä verestä tehtävissä tutkimuksissa koe-eläimiksi suositellaan hiiriä. Koe-eläimenä voidaan kuitenkin käyttää mitä tahansa sopivaa nisäkäslajia, jonka perna ei poista mikrotumaisia punasoluja tai jonka on osoitettu olevan riittävän herkkä rakenteellisia tai numeerisia poikkeavuuksia aiheuttavien aineiden toteamiseen. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä eläimiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään $\pm 20\%$ kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa, mutta kosteustavoitteen on oltava 50-60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret aikuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan kumpaakin sukupuolta olevat rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa mikrotumia *in vivo* altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolliaine voidaan antaa eri reittiä pitkin kuin tutkittava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Aine	CAS No.	EINECS No.
Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
N-etyyli-N-nitrosourea	759-73-9	212-072-2
Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
Syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
Syklofosamidimonohydraatti	6055-19-2	
Trietyyleenimelamiini	51-18-3	200-083-5

Negatiivisista kontrolleista, jotka ovat saaneet pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta ja joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenotokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut mikrotumia sisältävien solujen esiintymistäajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Jos negatiivisista kontrolleista otetaan vain yksi näyte, se tulisi ottaa ensimmäisellä näytteenotokerralla. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat kontrolleista tehdyt tutkimukset tai julkaistut tulokset osoittavat, ettei valittu liuotin/kantaja-aine aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

Jos käytetään perifeeristä verta, rinnakkaiseksi negatiiviseksi kontrolliksi voidaan hyväksyä myös ennen altistusta otettu näyte, mutta vain lyhytaikaisissa perifeerisestä verestä tehtävissä testeissä (esim. 1-3 altistusta), mikäli saadut tulokset ovat aikaisempiin kontrollista saatuihin tutkimustuloksiin perustuvalla odotetulla alueella.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa eläintä kumpaakin sukupuolta (11). Vain toista sukupuolta voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla ja samaa antoreittiä käyttämällä tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkkyyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Mitään standardia altistusohjelmaa (kuten 1, 2 tai useampia altistuksia 24 tunnin välein) ei voida suositella. Pitempien altistusohjelmien aikana kerätyt näytteet ovat hyväksyttäviä, mikäli positiivinen vaikutus on osoitettu tässä tutkimuksessa tai negatiivisessa tutkimuksessa on osoitettu myrkkyyvaikutusta tai raja-annosta on käytetty ja annostelua on jatkettu näytteenoton ajankohtaan asti. Tutkittavat aineet voidaan antaa myös jaettuina annoksina, eli kaksi altistuskertaa samana päivänä muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista.

Testi voidaan tehdä kahdella tavalla:

- (a) Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle yhden kerran. Luuydinnäytteitä otetaan vähintään kaksi kertaa siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 24 tunnin kuluttua altistuksesta ja viimeinen viimeistään 48 tunnin kuluttua altistuksesta ja näytteenotokertojen välillä on sopiva väli. Mikäli näytteitä otetaan aikaisemmin kuin 24 tunnin kuluttua, perustelut on esitettävä. Perifeerisestä verestä otetaan näytteitä vähintään kaksi kertaa siten, että ensimmäinen näyte otetaan aikaisintaan 36 tunnin kuluttua altistuksesta ja seuraavat sopivan ajan kuluttua siitä, kuitenkin viimeistään 72 tunnin kuluttua altistuksesta. Mikäli positiivinen vaste havaitaan yhden näytteenotokerran jälkeen, lisänäytteitä ei tarvita.
- (b) Jos päivittäisiä altistuskertoja on 2 tai enemmän (esim. kaksi tai useampia altistuksia 24 tunnin välein), näytteet on kerättävä luuytimistä kerran 18-24 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta ja perifeerisestä verestä kerran 36-48 tunnin kuluttua viimeisestä altistuksesta (12).

Tarvittaessa voidaan näytteitä ottaa muinakin ajankohtina.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (13). Mikäli myrkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostasoa. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaa annosteluohjelmaa käytettäessä suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit) saattavat edellyttää toisenlaisia annoksenmäärityskriteerejä, ja niitä pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määrittellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia luuytimessä (esim. punasolujen esiasteiden osuuden pieneneminen punasolujen kokonaismäärästä luuytimessä tai perifeerisessä veressä).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivänä aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Pitempään kestävässä tutkimuksessa raja-annos on 2000 mg painokiloa kohti vuorokaudessa, jos altistusta jatketaan enintään 14 vuorokautta, ja 1000 mg/kg/vrk, jos altistus kestää yli 14 vuorokautta. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostalojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostaloilla.

1.5.6 **Luuydin-/veripreparaatit**

Luuydinsolut kerätään yleensä reisiluista tai sääriluista heti koe-eläinten lopettamisen jälkeen. Solut otetaan reisi- tai sääriluista, niistä tehdään preparaatit ja ne värjätään vakiintuneilla värjäysmenetelmillä. Perifeerinen veri kerätään häntälaskimosta tai muusta sopivasta verisuonesta. Verisolut värjätään heti supravitaaliväreillä (8)(9)(10) tai niistä tehdään ensin sivelyvalmisteet ja värjätään sen jälkeen. DNA-spesifisten väriaineiden käyttö [esim. akridiinioranssi (14) tai Hoechst 33258 plus pyroniini-Y (15)] voi eliminoida joitakin ei-DNA-spesifisen väriaineen käyttöön liittyviä artefakteja. Tämä etu ei sulje pois tavanomaisten väriaineiden (esim. Giemsa) käyttöä. Myös muita järjestelmiä [esim. selluloosapylväitä tumallisten solujen poistamiseksi (16)] voidaan käyttää, mikäli nämä menetelmät on laboratoriossa osoitettu riittävän toimiviksi mikrotumapreparaattien valmistamisessa.

1.5.7 Analyysi

Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä (esiasteet + kypsät punasolut) määritetään jokaisen eläimen osalta erikseen laskemalla yhteensä vähintään 200 punasolua luuytimeistä ja 1000 punasolua perifeerisestä verestä (17). Kaikki objektilasit, myös ne, joilla on positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Vähintään 2000 punasolun esiastetta lasketaan eläintä kohti mikrotumaisten punasolujen esiasteiden esiintymistiheyden määrittämistä varten. Lisätietoja voidaan saada laskemalla mikrotumat kypsistä punasoluista. Objektilaseja analysoidessa punasolujen esiasteiden osuuden punasolujen kokonaismäärästä tulisi olla vähintään 20 % kontrolliarvosta. Kun koe-eläimille annetaan tutkittavaa ainetta jatkuvasti 4 viikon ajan tai pitempään, voidaan laskea myös vähintään 2000 kypsää punasolua eläintä kohti mikrotumien esiintymistiheyden toteamiseksi. Automaattiset analyysijärjestelmät (kuva-analyysi ja solususpensioiden virtausytometria) ovat hyväksyttäviä vaihtoehtoja manuaaliselle arvioinnille, mikäli ne perustellaan ja validoidaan asianmukaisesti.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Yksittäisten eläinten tulokset on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Punasolujen esiasteiden laskettu määrä, mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä ja punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä on lueltava kunkin analysoidun eläimen osalta erikseen. Mikäli eläimille annetaan tutkittavaa ainetta jatkuvasti 4 viikon ajan tai pitempään, myös kypsien punasolujen tiedot on ilmoitettava, mikäli niitä on kerätty. Punasolujen esiasteiden osuus koko punasolumäärästä ja, jos katsotaan aiheelliseksi, mikrotumaisten punasolujen prosentuaalinen määrä ilmoitetaan jokaisen eläimen osalta. Ellei viitteitä sukupuolten välisistä vaste-eroista ole havaittavissa, molempien sukupuolten tiedot voidaan yhdistää tilastollista analyysiä tehtäessä.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten mikrotumaisten solujen lukumäärän annoksesta riippuva suureneminen tai mikrotumaisten solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisessä annosryhmässä yhdellä näytteenotokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (18)(19). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määrävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella, mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Testattava aine, jolla saadut tulokset eivät täydy edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Mikrotumatestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa mikrotumia, jotka ovat seurausta kromosomivauriosta tai mitosilaitteen vauriosta testatun lajin punasoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa mikrotumia testattujen lajien punasolujen esiasteissa.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen (esim. systeeminen toksisuus) on pohdittava.

RAPORTOINTI**TUTKIMUSSELOSTUS**

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine

- kantaja-aineen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuotimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa;

Koe-eläimet:

- käytetty eläinlaji/kanta;
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli;
- hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.;
- eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä;

Koelosuhteet:

- positiivisia ja negatiivisia (kantaja-aine/liuotin) kontroleja koskevat tiedot;
- raja-annostutkimuksen tulokset, jos tehty;
- annostasojen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen valmistelujen yksityiskohdat;
- tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat;
- antotavan valintaperusteet;
- menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen, tarvittaessa;
- ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa;
- yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta;
- yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteenotto-ohjelmasta;
- objektilasien valmistusmenetelmät;
- myrkyvaikutuksen mittausmenetelmät;
- mikrotumaisten punasolujen esiasteiden laskentakriteerit;
- analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti;
- kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

- myrkyvaikutuksen merkit;
- punasolujen esiasteiden osuus punasolujen kokonaismäärästä;
- mikrotumaisten punasolujen esiasteiden lukumäärä, ilmoitetaan erikseen jokaisesta eläimestä;
- mikrotumaisten punasolujen esiasteiden keskiarvo \pm keskihajonta ryhmää kohti;
- annos-vastesuhde, mikäli mahdollista;
- käytetyt tilastolliset analyysit ja menetelmät;
- samanaikaiset ja aikaisemmat negatiivisilla kontroleilla saadut tulokset;
- rinnakkaisen positiivisen kontrollin tiedot.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

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.
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.
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, pp. 115-141.
19. Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays. In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

B. 13/14 MUTAGEENISUUS : TAKAISINMUTAATIOTESTI BAKTEEREILLA

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 471 Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* -bakteereiden aminohappoja vaativia kantoja sellaisten pistemutaatioiden havaitsemiseksi, joihin liittyy DNA:n yhden tai useamman emäsparin korvautuminen, ylimäärä tai deleetio (1)(2)(3). Tämän bakteereilla tehtävän takaisinmutaatiotestin periaate on, että se paljastaa mutaatiot, jotka korjaavat testikannassa olevat mutaatiot ja palauttavat bakteerien toiminnallisen kyvyn syntetisoida essentiaalista aminohappoa. Revertantit bakteerit tunnistetaan siitä, että ne pystyvät kasvamaan, vaikka testibakteerikannan ennen takaisinmutaatiota tarvitsema aminohappo puuttuu.

Pistemutaatiot aiheuttavat monia ihmisen geneettisiä sairauksia, ja on saatu vakuuttavia todisteita siitä, että somaattisten solujen onkogeeneissä ja kasvunrajoitegeeneissä olevat pistemutaatiot ovat osallisina ihmisten ja koe-eläinten kasvainten muodostumisessa. Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti on nopea, edullinen ja suhteellisen helposti toteutettava testi. Monilla testikannoilla on useita ominaisuuksia, joiden ansiosta ne osoittavat herkästi mutaatiot. Näistä ovat esimerkiksi herkästi reagoivat DNA-jaksot takaisinmutaatiokohdissa, solujen lisääntynyt läpäisevyys suurille molekyyleille ja DNA:n korjausjärjestelmien eliminoituminen tai virheille alttiiden DNA:n korjausprosessien lisääntyminen. Testikantojen spesifisyys voi tuottaa hyödyllistä tietoa genotoksisten aineiden aiheuttamien mutaatioiden tyypistä. Käytettävissä on hyvin laaja tietokanta bakteerien takaisinmutaatiotestien tuloksista erittäin monissa rakenteissa, ja vakiintuneita menetelmiä on kehitetty fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan erilaisten kemiallisten aineiden, myös haihtuvien yhdisteiden, testaamista varten.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Takaisinmutaatiotesti joko *Salmonella typhimurium* tai *Escherichia coli* -bakteereilla osoittaa aminohappoa vaativassa kannassa (edellisessä histidiini ja jälkimmäisessä tryptofaani) mutaation, jonka seurauksena syntyy ulkopuolisesta aminohapon saannista riippumaton kanta.

Emäsparin korvautumista aiheuttavat mutageenit ovat aineita, jotka aiheuttavat emäksen vaihtumisen DNA:ssa. Takaisinmutaatiotestissä tämä vaihtuminen saattaa tapahtua alkuperäisen mutaation kohdassa tai jossakin muussa bakteerigenomin kohdassa.

Lukukehyksensiirtomutagenit ovat aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA:ssa, mikä muuttaa lukukehystä (reading frame) RNA:ssa.

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä käytetään prokaryoottisoluja, jotka poikkeavat nisäkässoluista soluunoton, metabolian, kromosomirakenteen ja DNA:n korjautumisprosessien suhteen. *In vitro* testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää. *In vitro* metaboliset aktivaatiojärjestelmät eivät pysty täysin jäljittelemään nisäkässolujen *in vivo* olosuhteita. Testistä ei sen vuoksi voida suoraan päätellä aineen mutageenisuutta ja karsinogeenisuutta nisäkkäillä.

Bakteereilla tehtävää takaisinmutaatiotestiä käytetään yleisesti genotoksisuuden, ja varsinkin pistemutaatioita aiheuttavan vaikutuksen, alustavana seulontamenetelmänä. Laaja tietokanta on osoittanut, että monilla kemiallisilla aineilla, joilla saadaan positiivinen tulos tässä tutkimuksessa, todetaan mutageenista vaikutusta myös muissa tutkimuksissa. On myös esimerkkejä mutageenisista aineista, joita ei voida todeta tällä testillä. Nämä epäonnistumiset voivat johtua todetun tulostapahtuman spesifisestä luonteesta, metabolisen aktivaation eroista tai aineen erilaisesta biologisesta hyödynnettävyydestä. Toisaalta takaisinmutaatiotestin herkkyyttä lisäävät tekijät voivat johtaa mutageenisen aktiivisuuden liialliseen stimulaatioon.

Bakteereilla tehtävä takaisinmutaatiotesti ei välttämättä sovellu tiettyjen kemiallisten aineryhmien testaamiseen. Tällaisia ovat esimerkiksi voimakkaasti bakterisidiset yhdisteet (esim. tietyt antibiootit) ja aineet, joiden arvellaan (tai tiedetään) vaikuttavan erityisesti nisäkässolun kahdentumisjärjestelmään (esim. jotkut topoisomeraasin estäjät ja jotkut nukleosidianalogit). Nisäkkäillä tehtävät mutaatiotestit saattavat soveltua paremmin näihin tapauksiin.

Vaikka monet tässä testissä positiivisen tuloksen antavat kemialliset aineet ovat karsinogeenisia nisäkkäillä, korrelaatio ei ole ehdoton. Se riippuu aineryhmän kemiallisista ominaisuuksista, eikä kaikkia karsinogeenia voida todeta tällä testillä, koska ne vaikuttavat muiden, ei-genotoksisten mekanismien tai bakteerisoluista puuttuvien mekanismien välityksellä.

Bakteerisolususpensiot altistetaan tutkittavalle aineelle eksogeenisen metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa tai ilman sitä. Maljainkorporoitumismenetyksessä nämä suspensiot sekoitetaan "overlay"-agariin ja levitetään heti minimaalisen kasvualustan pinnalle. Preinkubaatiomenetyksessä tutkittavaa ainetta sisältävää seosta inkuboidaan, minkä jälkeen se sekoitetaan "overlay"-agariin ennen kuin se levitetään minimaalisen kasvualustan pinnalle. Molemmissa menetelmissä revertantit pesäkkeet lasketaan 2-3 päivän inkubaatioajan jälkeen, ja niiden määrää verrataan spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrään pelkkää liuotinta sisältävissä kontrollimaljoissa.

Takaisinmutaatiotesti bakteereilla voidaan tehdä useilla eri menetelmillä. Yleisesti käytettyjä ovat maljainkorporoitumismenetyksessä (1)(2)(3)(4), preinkubaatiomenetyksessä (2)(3)(5)(6)(7)(8), fluktuatiomenetyksessä (9)(10) ja suspensioimenetyksessä (11). Kaasujen ja höyryjen testaamiseen käytettäviä muunnelmia on myös kuvattu (12).

Tässä menetelmässä kuvataan pääasiassa maljainkorporoitumis- ja preinkubaatiomenetelmiä. Niillä molemmilla voidaan tehdä kokeita sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Jotkut aineet voidaan havaita tehokkaammin preinkubaatiomenetelmällä. Nämä kuuluvat sellaisiin kemiallisten aineiden ryhmiin, joihin kuuluu lyhytketjuisia alifaattisia nitrosoamiineja, kaksiarvoisia metalleja, aldehydejä, atsovärejä ja diatsoyhdisteitä, pyrollitsidiinialkaloideja, allyyliyhdisteitä ja nitroyhdisteitä (3). On todettu myös, että tiettyjä mutageeniryhmiä ei pystytä aina toteamaan standardeilla menetelmillä, kuten maljainkorporoitumistai preinkubaatiomenetelmällä. Näitä on pidettävä erikoistapauksina, ja niiden toteamiseen tulisi ehdottomasti käyttää vaihtoehtoisia menetelmiä. Seuraavat erikoistapaukset on voitu tunnistaa (sekä esimerkkejä toimenpiteistä, joita voidaan käyttää niiden toteamisessa): atsovärit ja diatsoyhdisteet (3)(5)(6)(13), kaasut ja haihtuvat kemialliset aineet (12)(14)(15)(16) ja glykosidit (17)(18). Poikkeaminen standardista menetelmästä on perusteltava tieteellisesti.

1.5 TESTIN KUVAUS

1.5.1 Testin valmistelu

1.5.1.1 Bakteerit

Tuoreita bakteeriviljelmiä on kasvatettava myöhäiseen eksponentiaaliseen tai varhaiseen stationääriseen kasvuvaiheeseen (noin 10^9 solua/ml). Myöhäisessä stationääri vaiheessa olevia viljelmiä ei pidä käyttää. Oleellista on, että kokeessa käytettävät viljelmät sisältävät elinkykyisiä soluja suurina tittereinä. Titteri voidaan osoittaa joko aikaisemmissa kontrollitutkimuksissa saatujen kasvukäyrien perusteella tai määrittämällä jokaisessa analyysissä elinkykyisten solujen lukumäärät maljakokeella.

Suosittelun inkubaatiolämpötila on 37° C.

On käytettävä vähintään viittä bakteerikantaa. Näihin tulee sisältyä neljä *S. typhimurium* -kantaa (TA 1535; TA 1537 tai TA97a tai TA97; TA98; ja TA100), joiden on osoitettu olevan luotettavia ja joilla on saatu toistettavissa oleva vaste eri laboratorioissa. Näissä neljässä *S. typhimurium* -kannassa on GC-emäsparit primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa, ja tiedetään, että ne eivät ehkä paljasta tiettyjä hapettavia mutageeneja, ristisidoksia muodostavia aineita eivätkä hydratsiineja. Tällaiset aineet voidaan todeta *E. coli* WP2 -kannoilla tai *S. typhimurium* TA102 -kannalla (19), joissa on AT-emäspari primaarisessa takaisinmutaatiokohdassa. Suositeltava kantojen yhdistelmä on tämän vuoksi:

- *S. typhimurium* TA1535, ja
- *S. typhimurium* TA1537 tai TA97or TA97a, ja
- *S. typhimurium* TA98, ja
- *S. typhimurium* TA100, ja
- *E. coli* WP2 uvrA tai *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) tai *S. typhimurium* TA102.

Ristisidoksia muodostavien mutageenien toteamiseksi mukaan tulisi ehkä käyttää TA102-kantaa tai käyttää lisäksi DNA:n korjautumiseen kykenevää *E. coli* -kantaa [esim. *E. coli* WP2 tai *E. coli* WP2 (pKM101)].

Varastoviljelmien valmistuksessa, markkerien vahvistamisessa ja säilytyksessä on käytettävä vakiintuneita menetelmiä. Kasvuun vaadittavien aminohappojen tarve on osoitettava kunkin jäädytetyn varastoviljelmäpreparaatin osalta erikseen (*S. typhimurium* -kannoilla histidiini ja *E. coli* -kannoilla tryptofaani). Muut fenotyypiset ominaisuudet on tarkistettava vastaavasti. Niitä ovat: R-tekijäplasmidien esiintyminen tai puuttuminen, mikäli sillä on merkitystä [ampisilliiniresistenssi kannoissa TA98, TA100 ja TA97a tai TA97, WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) ja ampisilliini- ja tetrasykliiniresistenssi kannassa TA102]; tyypillisten mutaatioiden esiintyminen (kristalliviolettiherkkyuden aiheuttama rfa-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa ja ultravioletivaloherkkyuden aiheuttama uvrA-mutaatio *E. coli* -bakteerissa tai uvrB-mutaatio *S. typhimurium* -bakteerissa) (2)(3). Kantojen tuottamien spontaanien revertanttien pesäkkeiden määrään tulisi myös olla laboratoriokohtaisten vertailuarvojen esiintymistiheysalueella ja mieluiten kirjallisuudessa raportoidulla alueella.

1.5.1.2 Kasvatusväliaine

Käytetään sopivaa minimaalista agaria (sisältää esim. Vogel-Bonner minimal medium E:tä ja glukoosia) ja "overlay"-agaria, joka sisältää histidiiniä ja biotiinia tai tryptofaania, jotta muutama solunjakautuminen voi tapahtua (1)(2)(9).

1.5.1.3 Metabolinen aktivaatio

Bakteerit on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (1)(2) tai fenobarbitonin ja β -naftoflavonin (18)(20)(21) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyräjoiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria. Käytetty postmitokondriaalisen jakeen pitoisuus S9-seoksessa on yleensä 5-30 % v/v. Metabolisen aktivaatiojärjestelmän valinta tai sen pois jättäminen saattaa riippua siitä, millaiseen kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampia kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta. Pelkistävä metabolinen aktivaatiojärjestelmä saattaa soveltua paremmin atsovärien ja diatsoyhdisteiden tutkimiseen (6)(13).

1.5.1.4 Tutkittava aine/Valmistelu

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen bakteerien altistamista. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmään ja/tai laimentaa ennen käsittelyä. Tutkittava aine on valmistettava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiiliteettitutkimuksilla.

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa, eikä se saa vaikuttaa solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen (22). Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden yhteensopivuuden osoittavat tutkimustulokset on esitettävä. Vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä tulisi harkita ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä.

1.5.2 Koelosuhteet

1.5.2.1 Testikannat (ks. 1.5.1.1)

1.5.2.2 Altistuspitoisuus

Tutkittavan aineen suurinta testattavaa pitoisuutta määritettäessä on otettava huomioon aineen sytotoksisuus ja liukoisuus altistuksessa käytettävään lopulliseen seokseen.

Myrkyvaikutus ja liukenemattomuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavalla kokeella. Sytotoksisuus voidaan havaita revertanttien pesäkkeiden lukumäärän pienenemisestä, taustakasvuston kirkastumisesta tai vähenemisestä tai solujen eloonjäämisasteesta käsitellyissä viljelmissä. Aineen sytotoksisuus saattaa muuttua metabolisten aktivaatiojärjestelmien läsnäollessa. Liukenemattomuus on arvioitava lopullisen seoksen paljaalla silmällä havaittavan sakkautumisen perusteella todellisissa koeolosuhteissa.

Liukoisten, ei-sytotoksisten aineiden suositeltu testattava maksimipitoisuus on 5 mg/malja tai 5 µl/malja. Testattaessa ei-sytotoksisia aineita, jotka eivät ole liukoisia pitoisuuksissa 5 mg/malja tai 5 µl/malja, yhden tai useamman testattavan pitoisuuden on oltava liukenemattomia lopullisessa altistusseoksessa. Jos tutkittava aine on sytotoksinen jo pienempinä pitoisuuksina kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja, se olisi testattava sytotoksiseen pitoisuuteen asti. Sakka ei saisi vaikuttaa laskentaan.

Alustavassa kokeessa on käytettävä ainakin viittä erisuuruista tutkittavan aineen analysoitavissa olevaa pitoisuutta siten, että testauspisteiden välillä on noin puolen $\log:n$ ($\sqrt{10}$) väli. Pitoisuus-vastesuhdetta tutkittaessa voi olla syytä käyttää pienempiä välejä. Arvioitaessa aineita, jotka sisältävät huomattavia määriä mahdollisia mutageenisia epäpuhtauksia, voidaan harkita testaamista myös suuremmilla pitoisuuksilla kuin 5 mg/malja tai 5 µl/malja.

1.5.2.3 Negatiiviset ja positiiviset kontrollit

Jokaisessa testissä on käytettävä myös kannan suhteen spesifisiä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontrolleja sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Positiivisen kontrolliaineen pitoisuudet on valittava siten, että ne tuovat esiin kunkin testin tehokkuuden.

Testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiojärjestelmää, positiiviset kontrolliaine(et) on valittava käytettävien bakteerikantojen tyyppin perusteella.

Seuraavassa on esimerkkejä sopivista positiivisista kontrolliaineista testeissä, joissa käytetään metabolista aktivaatiota:

CA-numerot	EINECS-numerot	Nimet
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetyyliantraseeni
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetyylibents[a]antraseeni
50-32-8	200-028-5	bentso[a]pyreeni
613-13-8	210-330-9	2-aminoantraseeni
50-18-0	200-015-4	syklofosfamidi
6055-19-2		syklofosfamidimonohydraatti

Seuraava aine sopii positiiviseksi kontrolliaineeksi pelkistävää metabolista aktivaatiota käytettäessä:

573-58-0	209-358-4	Congo Red
----------	-----------	-----------

2-Aminoantraseenia ei pidä käyttää ainoana S9-seoksen tehon indikaattorina. Jos 2-aminoantraseenia käytetään, jokainen S9-erä on karakterisoitava myös mutageenilla, joka vaatii mikrosomaalisiin entsyymeihin perustuvaa metabolista aktivaatiota, esim. bentso[a]pyreenilla, dimetyylibensantraseenilla.

Seuraavat aineet ovat esimerkkejä kannan suhteen spesifisistä positiivisista kontroleista, joita voidaan käyttää ilman eksogeenista metabolista aktivaatiojärjestelmää tehtävissä testeissä:

CAS-numerot	EINECS-numerot	Nimi	Kanta
26628-22-8	247-852-1	natriumatsidi	TA 1535 ja TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluoreeni	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridiini	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumeenihydroperoksidi	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomysiini C	WP2 uvrA ja TA102
70-25-7	200-730-1	N-etyyli-N-nitro-N-nitrosoguanidiini	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrokinoliini-1-oksidi	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furyylifuramidi (AF2)	plasmidin sisältävät kannat

Myös muita soveltuvia positiivisia kontroleja voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvien positiivisten kontrollien käyttöä on harkittava, mikäli niitä on käytettävissä.

Lisäksi on käytettävä pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta negatiivisina kontroleina, jotka eivät sisällä tutkittavaa ainetta mutta joita muutoin käsitellään samalla tavoin. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontroleja, paitsi jos kontroleista saadut aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, ettei valittu liuotin aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.5.3 **Testin suorittaminen**

Maljainkorporoitumismenetelmässä (1)(2)(3)(4), jossa ei käytetä metabolista aktivaatiota, 0,05 ml tai 0,1 ml tutkittavia liuoksia, 0,1 ml tuoretta bakteeriviljelmää (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja 0,5 ml steriiliä puskuria sekoitetaan 2 ml:aan "overlay"-agaria. Metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä 0,5 ml metabolista aktivaatioseosta, jossa on riittävä määrä postmitokondriaalista jaetta (pitoisuus 5-30 % v/v metabolisessa aktivaatioseoksessa), sekoitetaan "overlay"-agariin (2,0 ml) yhdessä bakteerien ja tutkittavan aineen/tutkittavan liuoksen kanssa. Jokaisen koeputken sisältö sekoitetaan ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. "Overlay"-agarin annetaan jähmettyä ennen inkubaatiota.

Preinkubaatiomenetelmässä (2)(3)(5)(6) tutkittavaa ainetta/tutkittavaa liuosta esi-inkuboidaan testikannan (noin 10^8 elinkykyistä solua) ja steriilin puskurin tai metabolisen aktivaatiojärjestelmän (0,5 ml) kanssa yleensä vähintään 20 min $30-37^{\circ}\text{C}$:ssa, ennen kuin se sekoitetaan "overlay"-agariin ja kaadetaan minimaalisen agarmaljan pinnalle. Yleensä 0,05 tai 0,1 ml tutkittavaa ainetta/tutkittavaa liuosta, 0,1 ml bakteereja ja 0,5 ml S9-seosta tai steriiliä puskuria sekoitetaan 2,0 ml:aan "overlay"-agaria. Koeputket tulisi ilmata preinkubaation aikana sekoittajaa käyttäen.

Riittävän arvion tekemiseksi hajonnasta on käytettävä kolmea rinnakkaista maljaa kullakin annostasolla. Kaksoismaljauksen käyttö on mahdollista, mikäli se voidaan perustella tieteellisesti. Satunnainen maljan menetys ei välttämättä mitätöi analyysiä.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita tulisi testata asianmukaisin menetelmin, esimerkiksi suljetuissa astioissa (12)(14)(15)(16).

1.5.4 **Inkubaatio**

Kaikkia tiettyyn testiin kuuluvia maljoja on inkuboitava 37°C :ssa 48-72 tunnin ajan. Inkubaatioajan jälkeen lasketaan revertanttien pesäkkeiden lukumäärä maljaa kohti.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tulokset on ilmoitettava revertanttien pesäkkeiden lukumääränä maljaa kohti. Revertanttien pesäkkeiden määrä sekä negatiivisissa (liuotinainekontrolli ja käsittelemätön kontrolli, jos käytetty) että positiivisissa kontrollimaljoissa on myös ilmoitettava. Maljakohtaiset lukumäärät, revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisten määrien keskiarvo ja keskihajonta on ilmoitettava tutkittavan aineen ja positiivisten ja negatiivisten (käsittelemättömät ja/tai liuotinaine) kontrollien osalta.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnelluissa koeolosuhteissa. Negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista jossakin tapauksessa pidetä tarpeellisena, tämä päätös on perusteltava. Tutkimusparametrien muuttamista koeolosuhteiden monipuolistamiseksi on harkittava seuranta tutkimuksia tehtäessä. Mahdollisia muutettavia tutkimusparametrejä ovat pitoisuusvälit, altistusmenetelmä (maljainkorporoitumiskoe tai nesteen preinkubointi) ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten pitoisuudesta riippuva revertanttien pesäkkeiden maljakohtaisen lukumäärän suureneminen koko testatulla annosalueella ja/tai toistettavissa oleva lisääntyminen yhdellä tai useammalla pitoisuustasolla vähintään yhdessä kannassa joko metabolista aktivaatiojärjestelmää käytettäessä tai ilman sitä (23). Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (24). Tilastollinen merkittävyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määrävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Bakteereilla tehtävässä takaisinmutaatiotestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa pistemutaatioita emäsubstituutioiden tai lukukehyksensiirtojen kautta joko *Salmonella typhimurium* ja/tai *Escherichia coli* -bakteerien genomissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei testattava aine ole koeolosuhteissa mutageeninen testatulla lajilla.

3.

RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine

- kantaja-aineen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuotimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa;

Kannat :

- käytetyt kannat;
- solujen määrä viljelmää kohti;
- kannan ominaisuudet.

Koeolosuhteet :

- tutkittavan aineen määrä maljaa kohti (mg/malja tai µl/malja) sekä annoksen valinnan ja kutakin pitoisuutta kohti valittujen maljojen lukumäärän perustelut;
- käytetty kasvatusväliaine;
- metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus sekä hyväksymiskriteerit;
- altistusmenettely.

Tulokset :

- myrkyvaikutuksen merkit;
- sakkautumisen merkit;
- maljakohtaiset määrät;
- revertanttien pesäkkeiden määrä maljaa kohti ja keskihajonta;
- annos-vastesuhde, mikäli mahdollista;
- mahdolliset tilastolliset analyysit;
- rinnakkaisista negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat;
- aikaisemmat negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tutkimustulokset, myös vaihteluväli, keskiarvot ja keskihajonnat.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

KIRJALLISUUTTA

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. Norpoh K.H. and Garner, R.C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York. pp. 273-285.
7. Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. and Foster, R. (1980). Bacterial Mutation Assays. In: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised*. Ed. D.J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.
8. Aeschacher, H.U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987). Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods. *J. Food Safety*, 8, 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, pp. 141-161.
11. Thompson, E.D. and Melampy, P.J. (1981). An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of Salmonella typhimurium. *Environmental Mutagenesis*, 3, 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, pp. 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, pp. 85-88.
21. Elliot, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 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.
24. Mahon, G.A.T., Green, M.H.L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W.D. and Tweats, D.J. (1989). Analysis of Data from Microbial Colony Assays. In: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. Ed. Kirkland, D.J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

B. 17 MUTAGEENISUUS – GEENIMUTAATIOTESTI NISÄKÄSSOLUILLA *IN VITRO*

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkässoluviiljelmissä tehtävää *in vitro* geenimutaatiotestiä voidaan käyttää kemiallisten aineiden aiheuttamien geenimutaatioiden toteamiseen. Sopivia solulinjoja ovat hiiren lymfoomasolulinja L5178Y, kiinanhamsterin solulinjat CHO, CHO-AS52 ja V79 ja ihmisen lymfoblastoidisolulinja TK6 (1). Näissä solulinjoissa yleisimmin käytetyt geneettiset tulostapahtumat mittaavat tymidiinikinaasi- (TK) ja hypoksantiini-guaaniinifosforibosyyli transferaasilokusten (HPRT) mutaatioita ja ksantiiniguaniinifosforibosyyli transferaasin (XPRT) transgeeniä. TK-, HPRT- and XPRT-mutaatiotesteillä voidaan havaita erilaisia geneettisiä tapahtumia. Koska TK ja XPRT sijaitsevat autosomissa, niiden avulla voidaan ehkä havaita sellaisia geneettisiä tapahtumia (esim. suuria deleetioita), joita ei voida havaita X-kromosomien HPRT-lokuksessa (2)(3)(4)(5)(6).

Nisäkässoluilla tehtävissä *in vitro* geenimutaatiotesteissä voidaan käyttää pysyvien solulinjojen tai solukantojen viljelmiä. Solujen valintakriteereinä käytetään niiden kykyä kasvaa viljelmässä ja niiden spontaanimutaatiotaajuuden stabiliteettia.

In vitro tehtävät testit vaativat yleensä eksogeenista metabolista aktivaatiota. Tällainen metabolinen aktivaatiojärjestelmä ei pysty täysin jäljittelemään *in vivo* olosuhteita nisäkkäissä. On pyrittävä välttämään erityisesti sellaisia olosuhteita, joissa saatavat positiiviset tulokset eivät heijasta aineen luontaista mutageenisuutta ja saattavat johtua pH:n muutoksista, osmolaliteetista tai voimakkaasta sytotoksisuudesta (7).

Tätä testiä käytetään nisäkkäiden mahdollisten mutageenien ja karsinogeenien seulontaan. Monet yhdisteet, joilla saadaan positiivinen tulos tässä testissä, ovat nisäkkäiden karsinogeenia. Tämän testin ja karsinogeenisuuden välillä ei kuitenkaan ole täydellistä korrelaatiota. Korrelaatio riippuu aineryhmän kemiallisista ominaisuuksista, ja yhä useammat tutkimustulokset viittaavat siihen, että on olemassa karsinogeenia, joita ei voida havaita tällä testillä, koska ne näyttävät vaikuttavan muiden, ei-geenotoksisten mekanismien tai bakteerisoluista puuttuvien mekanismien välityksellä (6).

Ks. myös Yleinen johdanto Osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Forward-mutaatio: geenin mutaatio parentaalisesta tyyppistä mutanttimuotoon, minkä seurauksena geenin koodittama valkuaisaine menettää entsyymaattisen aktiivisuutensa tai sen entsyymiaktiivisuus muuttuu.

Emäsparien korvautumista aiheuttavat mutageenit: aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin substituution DNA:ssa.

Lukukehyksensiirtomutageenit: aineita, jotka aiheuttavat yhden tai useamman emäsparin ylimäärän tai vajauksen DNA-molekyylissä.

Fenotyyppin ilmentymisaika: ajanjakso, jonka aikana muuttumattomat geenituotteet poistuvat hiljattain mutatoituneista soluista.

Mutaatiotaajuus: todettu mutanttien solujen lukumäärä jaettuna elinkykyisten solujen määrällä.

Suhteellinen kokonaiskasvu: solumäärän suureneminen tietyssä ajassa verrattuna kontrollina käytettävään solupopulaatioon; lasketaan tulona, joka saadaan kertomalla keskenään suspensiokasvu suhteessa negatiiviseen kontrolliin ja kloonaustehokkuus suhteessa negatiiviseen kontrolliin.

Suhteellinen suspensiokasvu: solujen lukumäärän suureneminen ilmentymisajan kuluessa verrattuna negatiiviseen kontrolliin.

Elinkykyisyys: tutkittavalle aineelle altistettujen solujen kloonaustehokkuus maljausajankohtana selektiivisissä olosuhteissa ilmentymisajan jälkeen.

Eloonjääneisyys: tutkittavalle aineelle altistettujen solujen kloonaustehokkuus maljattaessa altistusjakson lopussa; eloonjääneisyys ilmoitetaan yleensä suhteessa kontrollina käytetyn solupopulaation eloonjääneisyyteen.

1.3

TESTIN PERIAATE

Solut, joista TK^{+/+} -> TK^{-/-} -mutaation seurauksena puuttuu tymidiinikinaasi (TK), ovat resistenttejä pyrimidiinanalogi trifluorotymidiiniin (TFT) sytotoksisille vaikutuksille. Tymidiinikinaasin läsnäollessa solut ovat herkkiä TFT:lle, joka estää solun aineenvaihduntaa ja pysäyttää solunjakautumisen. Mutantit solut kykenevät siis lisääntymään TFT:n läsnäollessa, kun taas normaalit, tymidiinikinaasia sisältävät, solut eivät kykene. Vastaavasti solut, joista puuttuu HPRT- tai XPRT-entsyymi, ovat resistenttejä 6-tioguaaniinille (TG) tai 8-atsaguaaniinille (AG). Tutkittavan aineen ominaisuuksiin on kiinnitettävä erityistä huomiota, jos selektiivisen aineen emäsanalogia tai sille kemiallisesti sukua olevaa ainetta testataan millä tahansa nisäkässoluissa tehtävällä geenimutaatiotestillä. Esimerkiksi tutkittavan aineen mahdollinen epäilty selektiivinen myrkyvaikutus mutantteihin ja ei-mutantteihin soluihin on selvitettävä. Selektiivisen järjestelmän/aineen toimintakyky on sen vuoksi vahvistettava testattaessa kemiallisia aineita, jotka ovat rakenteeltaan selektiivisen aineen kaltaisia (8).

Suspensiossa tai yksikerrosviljelmässä olevat solut altistetaan sopivaksi ajaksi testattavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä ja jatkoviljellään sytotoksisuuden toteamiseksi ja fenotyyppin ilmentymisen aikaansaamiseksi ennen mutanttien selektiota (9)(10)(11)(12)(13). Sytotoksisuus määritetään yleensä mittaamalla viljelmien suhteellinen kloonaustehokkuus (eloonjääneisyys) tai suhteellinen kokonaiskasvu altistusjakson jälkeen. Altistettuja viljelmiä pidetään kasvatusväliaineessa riittävän pitkä aika, joka on jokaiselle valitulle lokukselle ja solutyypille ominainen, jotta aikaansaatujen mutanttien fenotyyppin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista. Mutaatiotaajuus lasketaan siten, että tunnettu lukumäärä soluja kylvetään toisaalta mutanttien toteamiseksi selektiivistä ainetta sisältävälle alustalle toisaalta kloonaustehokkuuden (elinkykyisyyden) määrittämiseksi alustalle, joka ei sisällä selektiivistä ainetta. Sopivan inkubaatioajan kuluttua lasketaan pesäkkeet. Mutaatiotaajuus lasketaan selektiivisellä alustalla todettujen mutanttipesäkkeiden lukumäärän ja ei-selektiivisellä alustalla todettujen pesäkkeiden lukumäärän perusteella.

1.4 MENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 Testin valmistelu

1.4.1.1 *Solut*

Tässä testissä voidaan käyttää useita eri solutyyppejä, kuten L5178Y-, CHO-, CHO-AS52-, V79- tai TK6 -solulinjojen subklooneja. Tässä testissä on käytettävä solutyyppejä, joiden on osoitettu olevan herkkiä kemiallisille mutageeneille ja joilla on hyvä kloonauستهokkuus ja stabiili spontaanimutaatiotaajuus. Solujen mahdollinen mykoplasma-kontaminaatio on tutkittava. Kontaminoituneita soluja ei saa käyttää.

Testi on suunniteltava siten, että sillä on tietty herkkyys ja teho. Solujen lukumäärän, viljelmien ja käytettyjen tutkittavan aineen pitoisuuksien tulee olla näiden määriteltyjen parametrien mukaisia (14). Altistuksen jälkeen elossa olevien ja kussakin testivaiheessa käytettävien elinkykyisten solujen vähimmäismäärän tulee perustua spontaanimutaatiotaajuuteen. Yleisohje on, että solujen lukumäärän on oltava vähintään kymmenen kertaa spontaanimutaatiotaajuuden käänteisluvun suuruinen, vähimmäismääräksi suositellaan kuitenkin 10^6 solua. Käytetystä solujärjestelmästä on oltava riittävästi aikaisempaa tutkimustietoa, joka osoittaa, että testillä saadaan pysyvästi päteviä tuloksia.

1.4.1.2 *Kasvatusväliaineet ja viljelyolosuhteet*

Testissä on käytettävä soveltuvia kasvatusväliaineita ja inkubaatio-olosuhteita (kasvatusastiat, lämpötila, CO₂-pitoisuus ja kosteus). Kasvatusväliaineet on valittava käytettävän selektiojärjestelmän ja solutyypin mukaan. On erityisen tärkeää valita viljelyolosuhteet, jotka takaavat optimaalisen solukasvun ilmentymisaikana ja sekä mutanttien että ei-mutanttien solujen optimaalisen pesäkkeenmuodostuskyvyn.

1.4.1.3 *Viljelmien valmistelu*

Solut kasvatetaan varastoviljelmistä, kylvetään kasvatusväliaineeseen ja inkuboidaan 37° C:ssa. Viljelmät on ehkä puhdistettava aikaisemmista mutanteista soluista, ennen kuin niitä käytetään tässä testissä.

1.4.1.4 *Metabolinen aktivaatio*

Solut on altistettava tutkittavalle aineelle sekä sopivan metabolinen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Yleisimmin käytetty aktivaatiojärjestelmä on entsyymejä indusoivilla aineilla, kuten Aroclor 1254:llä (15)(16)(17)(18) tai fenobarbitonin ja β-naftoflavonin (19)(20) yhdistelmällä, käsiteltyjen jyräjoiden maksasta eristetty postmitokondriaalinen jae (S9), johon on lisätty kofaktoria.

Postmitokondriaalisen jakeen yleisesti käytetty pitoisuusalue lopullisessa kasvatusväliaineessa on 1-10 % v/v. Metabolinen aktivaatiojärjestelmän valinta tai sen pois jättäminen saattaa riippua siitä, mihin kemiallisten aineiden ryhmään tutkittava aine kuuluu. Joissakin tapauksissa saattaa olla perusteltua käyttää useampaa kuin yhtä postmitokondriaalisen jakeen pitoisuutta.

Monilla uusilla menetelmillä, kuten yhdistelmä-DNA-tekniikalla tuotetuilla solulinjoilla, jotka ilmentävät spesifisiä aktivaatioentsyymejä, saattaa olla endogeenista aktivaatiovaikutusta. Käytettyjen solulinjojen valinnan on oltava tieteellisesti perusteltua (esim. sytokromi P450 -isoentsyymien merkitys tutkittavan aineen metaboliolle).

1.4.1.5 *Tutkittava aine /valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen solujen käsittelyä. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan lisätä suoraan koejärjestelmiin ja/tai laimentaa ennen solujen käsittelyä. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen altistusta, paitsi jos säilyvyys on osoitettu stabiliteettitutkimuksilla.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuotin/kantaja-aine ei saa olla sellainen, että sen voidaan epäillä reagoivan kemiallisesti tutkittavan aineen kanssa eikä se saa vaikuttaa solujen elinkykyyn eikä S9-aktiivisuuteen. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Vesipitoisen liuotimen/kantaja-aineen käyttöä on harkittava ensisijaisesti aina, kun se on mahdollista. Testattaessa aineita, jotka ovat epästabiileja vedessä, orgaanisten liuottimien tulisi olla vedettömiä. Vesi voidaan poistaa lisäämällä molekyyliäsiivilä.

1.4.2.2 *Altistuspitoisuudet*

Huomioonotettavia kriteerejä suurinta pitoisuutta määritettäessä ovat sytotoksisuus, liukoisuus testijärjestelmään ja pH:n tai osmolaliteetin muutokset.

Sytotoksisuus on määritettävä pääasiallisessa kokeessa sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä käyttäen asianmukaisia solujen eheyden ja solukasvun indikaattoreita, kuten suhteellista kloonauستهokkuutta (eloonjääneisyttä) tai suhteellista kokonaiskasvua. Sytotoksisuus ja liukoisuus saattaa olla hyödyllistä määrittää alustavassa kokeessa.

Vähintään neljää analysoitavissa olevaa pitoisuutta on käytettävä. Mikäli sytotoksisuutta esiintyy, näiden pitoisuuksien on katettava alue, jossa suurimmalla pitoisuudella on maksimaalinen myrkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkyvaikutusta, mikä tarkoittaa yleensä sitä, että pitoisuudet voivat poiketa toisistaan enintään kertoimella $2\sqrt{10}$. Mikäli suurin pitoisuus perustuu sytotoksisuuteen, siihen liittyvän suhteellisen eloonjääneisyyden (suhteellisen kloonauستهokkuuden) tai suhteellisen kokonaiskasvun tulisi olla noin 10-20 % (mutta ei alle 10 %). Suhteellisen ei-sytotoksisia aineita testattaessa suurimman testattavan pitoisuuden tulisi olla 5 mg/ml, 5 µl/ml tai 0,01 M, riippuen siitä, mikä näistä on pienin.

Huonosti liukenevia aineita on testattava viljelyolosuhteissa liukoisuusrajaan asti tai sen yli. Liukenemattomuuteen viittaavat muutokset on määritettävä lopullisessa kasvatusväliaineessa, jolle solut altistetaan. Liukoisuus kannattaa arvioida sekä käsittelyn alussa että lopussa, sillä se voi muuttua koejärjestelmässä altistuksen aikana esimerkiksi solujen, S9:n, seerumin ym. vaikutuksesta. Liukenemattomuus voidaan havaita paljaalla silmällä. Sakan ei pitäisi vaikuttaa laskentaan.

1.4.2.3 *Kontrollit*

Jokaisessa kokeessa on käytettävä rinnakkaisia positiivisia ja negatiivisia (liuotin tai kantaja-aine) kontroleja, sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Metabolista aktivaatiota käytettäessä positiivisena kontrollina on käytettävä sellaista kemiallista ainetta, joka vaatii aktivaatiota mutageenisen vasteen aikaansaamiseksi.

Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Metabolinen aktivaatio	Lokus	Aine	CAS No.	EINECS No.
Ei eksogeenista metabolista aktivaatiota	HPRT	Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0	200-536-7
		Etyylnitrosoorea	759-73-9	212-072-2
	TK (pienet ja suuret pesäkkeet)	Metyylimetaanisulfonaatti	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Etyylimetaanisulfonaatti	62-50-0
			Etyylnitrosoorea	759-73-9
	Eksogeeninen metabolinen aktivaatio	HPRT	3-Metyylikolantreeni	56-49-5
N-nitrosodimetyyliamiini			62-75-9	200-549-8
7,12-Dimetyylibentsantraseeni			57-97-6	200-359-5
TK (pienet ja suuret pesäkkeet)		Syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
		Syklofosamidimonohydraatti	6055-19-2	
		Bentso[<i>a</i>]pyreeni	50-32-8	200-028-5
		3-metyylikolantreeni	56-49-5	200-276-5
XPRT		N-nitrosodimetyyliamiini (suurilla S-9-pitoisuuksilla)	62-75-9	200-549-8
		Bentso[<i>a</i>]pyreeni	50-32-8	200-028-5

Muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää, esim. jos käytettävissä on laboratoriokohtainen tietokanta 5-bromo-2'-deoksiuridiinista [CAS n. 59-14-3, EINECS n. 200-415-9], myös tätä vertailuainetta voidaan käyttää. Samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvien positiivisten kontrolliaineiden käyttöä tulisi harkita, mikäli niitä on käytettävissä.

Mukana on oltava myös negatiivisia kontrolleja, jotka koostuvat liuottimesta tai pelkästä kantaja-aineesta kasvatusväliaineessa ja joita on käsitelty samalla tavoin kuin altistettuja ryhmiä. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos aikaisemmat tiedot kontrollista osoittavat, ettei valitulla liuottimella ole haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.4.3 **Testin suorittaminen**

1.4.3.1 *Altistaminen tutkittavalle aineelle*

Lisääntyvät solut on altistettava testattavalle aineelle sekä metabolisen aktivaatiojärjestelmän läsnäollessa että ilman sitä. Altistusajan on oltava sopiva (tehokas aika on yleensä 3-6 tuntia). Altistusta voidaan jatkaa yhden tai useamman solusyklin ajan.

Kullekin testattavalle pitoisuudelle voidaan altistaa kaksi rinnakkaista viljelmää tai vain yksi viljelämä. Yksittäisiä viljelmiä käytettäessä pitoisuuksien määrää on suurennettava, jotta saadaan riittävä määrä viljelmiä analyysiä varten (esim. vähintään 8 analysoitavissa olevaa pitoisuutta). Rinnakkaisia negatiivisia (liuotin) kontrolliviljelmiä on käytettävä.

Kaasumaisia tai haihtuvia aineita on testattava asianmukaisin menetelmin, esimerkiksi suljetuissa kasvatusastioissa (21)(22).

1.4.3.2 *Eloonjääneisyyden, elinkykyisyyden ja mutaatiotaajuuden mittaaminen*

Altistusajan päätyttyä solut pestään ja viljellään eloonjääneisyyden määrittämiseksi ja mutanttifenotyypin ilmentymisen aikaansaamiseksi. Sytotoksisuuden mittausta aloitetaan yleensä altistusajan jälkeen määrittämällä viljelmien suhteellinen kloonaustehokkuus (eloonjääneisyys) tai suhteellinen kokonaiskasvu.

Jokainen lokus vaatii määrätyn minimiajan, jotta hiljattain aiheutettujen mutanttien fenotyypin ilmentyminen olisi lähellä optimaalista (HPRT ja XPRT vaativat vähintään 6-8 vuorokautta ja TK vähintään 2 vuorokautta). Soluja kasvatetaan selektiivistä ainetta (aineita) sisältävillä alustoilla mutanttien lukumäärän määrittämiseksi, ja ilman selektiivisiä aineita kloonaustehokkuuden määrittämiseksi. Elinkykyisyyden mittaaminen (käytetään mutaatiotaajuuden laskemiseen) aloitetaan altistusajan päätyttyä maljaamalla soluja ei-selektiivisessä kasvatusväliaineessa.

Jos tutkittavalla aineella saadaan positiivinen tulos L5178Y TK^{+/-} -testissä, pesäkkeiden koko on määritettävä ainakin yhdessä koeviljelmässä (suurin positiivinen pitoisuus) ja negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Jos tutkittavalla aineella saadaan negatiivinen tulos L5178Y TK^{+/-} -testissä, pesäkkeiden koko on määritettävä negatiivisissa ja positiivisissa kontrolleissa. Pesäkkeiden koon määrittäminen voidaan tehdä myös tutkimuksissa, joissa käytetään TK6TK^{+/-} -testiä.

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tulosten tulee sisältää tiedot sytotoksisuuden ja elinkykyisyyden määrittämisestä, pesäkkeiden lukumäärästä ja mutaatiotaajuudesta altistetuissa viljelmissä ja kontrolliviljelmissä. Mikäli vaste on positiivinen L5178Y TK^{+/}-testissä, pesäkkeet lasketaan pienten ja suurten pesäkkeiden kriteeriä käyttäen vähintään yhdestä testattavan aineen pitoisuudesta (suurin positiivinen pitoisuus) ja negatiivisista ja positiivisista kontrolleista. Sekä suurten että pienten mutaatiopesäkkeiden molekulaarinen ja sytogeneettinen luonne on selvitetty yksityiskohtaisesti (23)(24). TK^{+/}-testissä pesäkkeet lasketaan käyttäen kriteereinä normaalin kasvun (suuri) ja hitaan kasvun (pieni) pesäkkeitä (25). Mutanteilla soluilla, joissa geneettinen vaurio on kaikkein suurin, on pitkittynyt kahdentumisaika, joten ne muodostavat pieniä pesäkkeitä. Tällaiset vauriot ulottuvat tyypillisesti kokonaisen geenin puuttumisesta karyotyypissä näkyviin kromosomipoikkeavuuksiin. Pienten mutaatiopesäkkeiden muodostuminen on yhdistetty suuria kromosomipoikkeavuuksia aiheuttaviin kemiallisiin aineisiin (26). Lievemmin vaurioituneet mutantit solut kasvavat yhtä nopeasti kuin parentaalisetkin solut ja muodostavat suuria pesäkkeitä.

Eloönjääneisyys (suhteelliset kloonaustehokkuudet) tai suhteellinen kokonaiskasvu on ilmoitettava. Mutaatiotaajuus on ilmoitettava mutanttien solujen lukumäärän suhteena eloonjääneiden solujen lukumäärään.

Viljelmäkohtaiset tulokset on ilmoitettava. Lisäksi yhteenveto kaikista tiedoista on ilmoitettava taulukkomuodossa.

Selvää positiivista vastetta ei tarvitse vahvistaa. Epäselvät tulokset on selvitettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa. Negatiiviset tulokset on vahvistettava tapauskohtaisesti. Ellei negatiivisten tulosten vahvistamista jossakin tapauksessa pidetä tarpeellisenä, tämä päätös on perusteltava. Tutkimusparametrien muuttamista on harkittava epäselvien tai negatiivisten tulosten seuranta-kohteissa arvioitavien koeolosuhteiden monipuolistamiseksi. Mahdollisia muutettavia tutkimusparametrejä ovat pitoisuusvälit ja metaboliset aktivaatiojärjestelmät.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten pitoisuuteen liittyvä tai toistettavissa oleva mutaatiotaajuuden suureneminen. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa. Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä koejärjestelmässä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Nisäkässoluilla tehtävässä *in vitro* geenimutaatiotestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa geenimutaatioita käytetyissä viljelyissä nisäkässoluissa. Toistettavissa oleva positiivinen pitoisuus-vastesuhde on kaikkein merkityksellisin. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa geenimutaatioita testatuissa viljelyissä nisäkässoluissa.

3.

RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine

- kantaja-aineen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuotimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa;

Solut:

- tyyppi ja solujen lähde;
- soluviljelmien lukumäärä;
- siirrostusten lukumäärä, tarvittaessa;
- soluviljelmien ylläpitomenetelmät, tarvittaessa;
- mykoplasman puuttuminen.

Koeolosuhteet:

- pitoisuuksien ja viljelmien lukumäärän valintaperusteet, joihin sisältyvät esim. sytotoksisuustiedot ja liukoisuusrajoitukset, mikäli tiedot ovat käytettävissä;
- kasvatusväliaineen koostumus, CO₂-pitoisuus;
- tutkittavan aineen pitoisuus;
- lisätyn kantaja-aineen ja tutkittavan aineen määrä;
- inkubaatiolämpötila;
- inkubaatioaika;
- altistuksen kesto;
- solutiheys altistuksen aikana;
- metabolisen aktivaatiojärjestelmän tyyppi ja koostumus, myös hyväksymiskriteerit;
- positiiviset ja negatiiviset kontrollit;
- ilmentymisajan pituus (myös kylvettyjen solujen lukumäärä ja jatkoviljelmät ja kasvatusväliaineen vaihtoajat, tarvittaessa);
- selektiiviset aineet;
- kriteerit, joiden perusteella testit määritellään positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi;
- elinkykyisten ja mutanttien solujen laskentamenetelmät;
- pesäkkeiden määritelmät, kun pesäkkeen koko ja tyyppi on otettu huomioon (myös ”pienen” ja ”suurten” pesäkkeiden kriteerit, tarvittaessa).

Tulokset:

- myrkyvaikutuksen merkit;
- sakkautumisen merkit;
- tutkittavalle aineelle altistetun viljelmän pH ja osmolaliteetti, jos määritetty;
- pesäkkeen koko, jos määritetty, ainakin negatiivisista ja positiivisista kontrolleista;
- laboratorion valmiudet todeta pienet mutanttipesäkkeet L5178Y TK+/- -järjestelmässä, mikäli merkitystä;
- annos-vastesuhde, mikäli mahdollista;
- mahdolliset tilastolliset analyysit;
- rinnakkaisista negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tulokset;
- aikaisemmat negatiivisista (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisista kontrolleista saadut tutkimustulokset, myös vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat.
- mutaatiofrekvenssi.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

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.
5. Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121-128.
6. Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G., Glatt, H.R., Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312, 235-239.
7. Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.
8. Clive, D., McCuen, R., Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 115, 225-251.
9. Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, R.H. and Wasson, 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, pp. 239-268.
14. Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66-101.
15. Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G., Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

16. Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 31, 347-364.
17. Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK[±] Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. *Mutat. Res.*, 59, 61-108.
18. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
19. Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in In Vitro Genotoxicity Assays. *Mutagenesis*, 7, 175-177.
20. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, R.M. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.
21. Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). *Genotoxic Effects of Airborne Agents*. New York, Plenum, pp. 91-103.
22. Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. *Environmental Mutagenesis*, 5, 795-801.
23. Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 51-55.
24. Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK[±] Mouse Lymphoma Cells. *Mutation Res.*, 151, 161-174.
25. Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. *Mutation Res.*, 229, 89-102.
26. Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small-Colony TK-Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK[±] -3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutagenesis*, 5, 609-614.

B.23 NISÄKKÄIDEN SPERMATOGONIOIDEN KROMOSOMIPOIKKEAVUUSTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1 JOHDANTO

Tämän nisäkkäiden spermatogonioilla tehtävän *in vivo* kromosomipoikkeavuustestin tarkoituksena on tunnistaa aineet, jotka aiheuttavat rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia nisäkkäiden spermatogonioissa (1)(2)(3)(4)(5). Rakenteelliset poikkeavuudet jakautuvat kahteen tyyppiin, kromosomi- ja kromatidipoikkeavuuksiin. Kemiallisten mutageenien aiheuttamat poikkeavuudet ovat useimmiten kromatidityypisiä, mutta myös kromosomityypisiä poikkeavuuksia esiintyy. Tätä menetelmää ei ole suunniteltu numeeristen poikkeavuuksien mittaamiseen, eikä sitä käytetä rutiinimaisesti tähän tarkoitukseen. Kromosomimutaatiot ja niihin liittyvät tapahtumat ovat syynä moniin ihmisen geneettisiin sairauksiin.

Tämä testi mittaa kromosomipoikkeavuuksia spermatogoniaalisissa itusoluissa, joten sen odotetaan voivan ennustaa itusolujen periytyviä mutaatioita.

Testissä käytetään yleensä jrsijöitä. Tämä *in vivo* sytogeneettinen testi paljastaa kromosomipoikkeavuudet spermatogonioiden mitooseissa. Tällä menetelmällä ei tutkita muita kohdesoluja.

Spermatogonioiden kromatidityyppisten poikkeavuuksien havaitsemiseksi on tutkittava ensimmäistä mitoottista solunjakautumista altistuksen jälkeen, ennen kuin nämä leesiot häviävät myöhemmissä solunjakautumisissa. Altistetuista spermatogoniaalisista kantasoluista voidaan saada lisätietoja tekemällä meioottisia kromosomianalyyskejä kromosomityyppisten poikkeavuuksien toteamiseksi diakinesissä-metafaasi I:ssä altistettujen solujen muuttuessa spermatosyyteiksi.

Tällä *in vivo* testillä pyritään selvittämään, vaikuttavatko somaattisten solujen mutageenit myös itusoluihin. Spermatogonioilla tehtävä testi soveltuu myös mutageenisuuden vaaran arvioimiseen, sillä siinä voidaan ottaa huomioon tekijöitä, jotka liittyvät *in vivo* metaboliaan, farmakokinetikkaan ja DNA:n korjautumisprosesseihin.

Kiveksissä on yhtäaikaan monia spermatogonioiden sukupolvina, joiden herkkyys kemiallisten aineiden vaikutuksille vaihtelee. Havaitut poikkeavuudet edustavat siten käsiteltyjen spermatogoniopopulaatioiden kokonaisvastetta, jossa hallitsevassa asemassa ovat muita suurempina määrinä esiintyvät erilaistuneet spermatogoniot. Eri sukupolviin kuuluvien spermatogonioiden yhteys yleiseen verenkiertoon riippuu niiden sijainnista kiveksissä. Kaikki spermatogoniot eivät ole yhteydessä verenkiertoon Sertolin solujen muodostaman fyysikaalisen ja fysiologisen esteen ja veri-kivesesteen vuoksi.

Jos on saatu viitteitä siitä, että tutkittava aine, tai sen reaktiivinen metaboliitti, ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kromatidipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee yksittäisten kromatidien katkeamisena tai kromatidien katkeamisena ja uudelleenytymisenä.

Kromosomipoikkeavuus: rakenteellinen kromosomivaurio, joka ilmenee molempien kromatidien katkeamisena tai katkeamisena ja uudelleenytymisenä samassa kohdassa.

Aukko: gap, akromaattinen leesio, joka on pienempi kuin yhden kromatidin leveys, ja johon liittyy minimaalinen kromatidien siirtymä.

Numeerinen poikkeavuus: testissä käytetyille eläimille tyypillisestä normaalista kromosomimäärästä poikkeava kromosomien lukumäärä.

Polyploidia: haploidisen kromosomimäärän (n) esiintyminen moninkertaisena, muu kuin diploidinen kromosomimäärä ($3n, 4n$ jne.).

Rakenteellinen poikkeama: kromosomirakenteen muutos, joka voidaan havaita solunjakautumisen metafaasivaiheen mikroskooppitutkimuksella ja joka ilmenee deleetioina, kromosomien sisäisinä tai kromosomien välisinä tekijävaihdoksina.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eläimet altistetaan tutkittavalle aineelle soveltuvaa altistusreittiä käyttäen ja lopetetaan sopivan ajan kuluttua altistuksesta. Ennen lopettamista eläimille annetaan ainetta, joka pysäyttää solunjakautumisen metafaasiin (esim. kolkisiini tai Colcemid[®]). Tämän jälkeen itusoluista valmistetaan kromosomipreparaatit ja ne värjätään, ja metafaasissa olevista soluista analysoidaan kromosomipoikkeavuudet.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 Testin valmistelu

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Yleisesti käytettyjä eläinlajeja ovat kiinanhamsteri- ja hiiriurokset. Myös muiden soveltuvien nisäkäslajien uroksia voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratoriokantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään $\pm 20\%$ keskipainosta

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa, mutta kosteustavoitteen on oltava 50-60%.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret täysikasvuiset urokset jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti. Eläimiä sopeutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen aloittamista.

1.4.1.4 *Annosten valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin niitä annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmisteltava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koeolosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkkyyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen testiin on otettava mukaan rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrollien tulisi aiheuttaa spermatogonioissa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia *in vivo* altistustasoilla, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna.

Positiivisten kontrolliaineiden annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät paljasta heti lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Positiivinen kontrolliaine voidaan antaa eri reittiä pitkin kuin testattava aine ja näytteet voidaan ottaa vain kerran. Lisäksi positiivisina kontrolleina tulisi käyttää samaan kemiallisten aineiden ryhmään kuuluvia aineita, mikäli mahdollista. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Aine	CAS No.	EINECS No.
Syklofosfamidi	50-18-0	200-015-4
Syklofosfamidimonohydraatti	6055-19-2	
Sykloheksyyliamiini	108-91-8	203-629-0
Mitomysiini C	50-07-7	200-008-6
Monomeerinen akryyliamidi	79-06-1	201-173-7
Trietyleenimelamiini	51-18-3	200-083-5

Pelkkää liuotinta tai kantaja-ainetta saaneista negatiivisista kontrolleista, joita muuten on käsitelty samalla tavoin kuin koeryhmiä, on otettava näytteet jokaisella näytteenottokerralla, paitsi jos aikaisemmat tutkimustulokset osoittavat, että eläinten väliset erot ja vaihtelut kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen esiintymistäajuudessa ovat hyväksyttävällä tasolla. Lisäksi on käytettävä käsittelemättömiä kontrolleja, paitsi jos kontrolleilla aikaisemmin tehdyt tutkimukset tai julkaistut tulokset osoittavat, että valittu liuotin/kantaja-aine ei aiheuta haitallisia eikä mutageenisia vaikutuksia.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä**

Jokaisessa koe- ja kontrolliryhmässä on oltava vähintään 5 analysoitavissa olevaa urosta.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavia aineita tulisi antaa mieluiten kerran tai kaksi kertaa (kerta-annoksena tai kahtena altistuksena). Ne voidaan antaa myös jaettuina annoksina, eli kahtena altistuksena saman päivän aikana vain muutaman tunnin välein, mikä helpottaa suurten ainemäärien antamista. Muunlaiset annosteluohjelmat on perusteltava tieteellisesti.

Suurinta annosta saavassa ryhmässä käytetään kahta näytteenotokertaa altistuksen jälkeen. Koska tutkittava aine voi vaikuttaa solusyklin kinetiikkaan, näytteet kerätään yhtenä aikaisempaan ja yhtenä myöhempanä ajankohtana noin 24-48 tunnin kuluttua altistuksesta. Muissa kuin suurimmassa annosryhmässä näytteet kerätään kerran 24 tunnin tai 1,5 solusyklin kuluttua altistuksesta, paitsi jos jonkin muun näytteenottoajankohdan tiedetään soveltuvan paremmin vaikutusten toteamiseen (6).

Näytteitä voidaan ottaa lisäksi myös muina ajankohtina. Varhaisemmat näytteenottoajat saattavat olla perusteltuja esimerkiksi testattaessa kemiallisia aineita, jotka voivat aiheuttaa kromosomien hidastumista (lagging) tai joilla saattaa olla S-vaiheesta riippumattomia vaikutuksia (1).

Toistuvien altistusten soveltuvuus on osoitettava tapauskohtaisesti. Toistuvan altistuksen jälkeen eläimet on lopetettava 24 tunnin (1,5 solusyklin) kuluttua viimeisestä altistuksesta. Tarvittaessa voidaan käyttää ylimääräisiä näytteenotokertoja.

Ennen lopettamista eläimille annetaan injektiona vatsaonteloon sopiva annos ainetta, joka pysäyttää solut metafaasivaiheeseen (esim. Colcemid[®]ia tai kolkisiinia). Elämistä otetaan näytteet sopivan ajan kuluttua tämän jälkeen. Hiirillä tämä väli on noin 3-5 tuntia; kiinanhamstereilla se on noin 4-5 tuntia.

1.5.3 **Annostasot**

Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa ja samaa altistusohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää (7). Mikäli myrkyvaikutuksia esiintyy, ensimmäiseen näytteenottoajankohtaan asti käytetään kolmea annostaso. Näistä suurimmalla annoksella on oltava maksimaalinen myrkyvaikutus ja pienimmällä vähäinen tai ei lainkaan myrkyvaikutusta. Myöhemmän näytteenottoajankohdan edellä voidaan käyttää vain suurinta annosta. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisyysoireita, että samaan annosteluohjelmaan perustuvien suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan.

Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeenit), saattavat edellyttää muita annoksenmäärityskriteerejä, ja ne pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Suurin annos voidaan määrittellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyvaikutukseen viittaavia muutoksia spermatogonioissa (esim. spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on pienentynyt; tämä pieneneminen ei saa olla yli 50 %).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2000 mg eläimen painokiloa kohti vuorokaudessa (mg/kg/vrk) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivänä aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä tai injektiona vatsaonteloon. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Kromosomipreparaattien valmistus**

Heti eläinten lopettamisen jälkeen toisesta tai molemmista kiveksistä otetaan solususpensioita, jotka pannaan hypotoniseen liuokseen ja fiksoidaan. Tämän jälkeen solut levitetään objektilaseille ja värjätään.

1.5.7 **Analyysi**

Jokaista eläintä kohti tulisi analysoida vähintään 100 hyvin levinnyttä metafasia (vähintään 500 metafasia/ryhmä). Tätä määrää voidaan pienentää, jos havaitaan runsaasti poikkeavuuksia. Kaikki objektilasit, myös positiiviset ja negatiiviset kontrollit, on koodattava toisistaan riippumattomasti ennen mikroskooppitutkimusta. Koska fiksaatioimenpiteet johtavat usein joidenkin metafasioiden rikkoutumiseen ja kromosomien menetykseen, sentromeerien lukumäärän lasketuissa oluissa on vastattava lukua $2n \pm 2$.

2. **TULOKSET**

2.1 **TULOSTEN KÄSITTELY**

Eläinkohtaiset tiedot on esitettävä taulukkomuodossa. Kokeellinen yksikkö on eläin. Jokaisesta yksittäisestä eläimestä on arvioitava rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ja kromosomipoikkeavuuksien lukumäärä solua kohti. Eri tyyppiset rakenteelliset kromosomipoikkeavuudet on lueteltava, ja niiden lukumäärä ja esiintymistaajuus koe- ja kontrolliryhmien osalta on ilmoitettava. Aukot (gaps) rekisteröidään erikseen ja raportoidaan, mutta niitä ei yleensä lasketa mukaan kromosomipoikkeavuuksien kokonaistaajuuteen.

Jos havaitaan sekä mitosia että meioosia, spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäiseen ja toiseen meioottiseen metafaasiin on määritettävä sytotoksisuuden mittana kaikista tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä ja negatiivisista kontroleista yhteensä 100 jakautuvan solun näytteestä eläintä kohti mahdollisen sytotoksisen vaikutuksen osoittamiseksi. Jos tarkastellaan ainoastaan mitosia, mitoosi-indeksi on määritettävä vähintään 1000 solusta jokaista eläintä kohti.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Positiivisille tuloksille on useita kriteerejä, kuten annoksesta riippuva kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen suhteellisen lukumäärän suureneminen tai kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärän selvä suureneminen yksittäisen annoksen osalta yhdellä näytteenottokerralla. Tulosten biologinen merkitys on otettava ensisijaisesti huomioon. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa (8). Tilastollinen merkitsevyys ei saa olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa. Epäselviä tuloksia on selkeytettävä jatkotestauksella mieluiten muunnetuissa koeolosuhteissa.

Tutkittava aine, jolla saadut tulokset eivät täytä edellä kuvattuja kriteerejä, katsotaan ei-mutageeniseksi tässä testissä.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tietojen pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä testattavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Spermatogonioiden *in vivo* kromosomipoikkeavuustestissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa rakenteellisia kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin itusoluissa. Negatiiviset tulokset osoittavat, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa kromosomipoikkeavuuksia testatun lajin itusoluissa.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä kohdekudokseen on pohdittava.

3. RAPORTOINTI

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine

- kantaja-aineen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuotimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa;

Koe-eläimet:

- käytetty eläinlaji/kanta;
- eläinten lukumäärä ja ikä;
- hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.;
- eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä;

Koeolosuhteet:

- mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset;
- annostasojen valintaperusteet;
- antotavan valintaperusteet;
- tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat;
- tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat;
- eläinten lopettamisajankohtien perustelut;
- ravintoon/juomaveteen sekoitetun tutkittavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa;
- yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta;
- yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenkeräysohjelmasta;
- myrkyvaikutuksen mittausten menetelmät;
- metafaasin pysäyttämisessä käytetty aine, sen pitoisuus ja käsittelyn kesto;
- objektilasien valmistusmenetelmät;
- kromosomipoikkeavuuksien laskentakriteerit;
- analysoitujen solujen lukumäärä eläintä kohti;
- kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

- myrkyvaikutuksen merkit;
- mitoosi-indeksi;
- spermatogonioiden mitoosien suhde ensimmäisiin ja toisiin meiotettiin metafaaseihin;
- kromosomipoikkeavuuksien tyyppi ja lukumäärä, ilmoitettava jokaisen eläimen osalta erikseen;
- kromosomipoikkeavuuksien kokonaismäärä ryhmää kohti;
- kromosomipoikkeavuuksia sisältävien solujen lukumäärä ryhmää kohti;
- annos-vastesuhde, mikäli mahdollista;
- mahdolliset tilastolliset analyysit;
- rinnakkaisten negatiivisten kontrollien tulokset;
- aikaisemmat negatiivisesta kontrollista saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat;
- rinnakkaisten positiivisten kontrollien tulokset.
- ploidian muutokset, jos niitä esiintyy.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

KIRJALLISUUTTA

1. Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C., Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.
2. Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.
3. Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.
4. Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). In Vivo Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.
5. Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.
6. Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.
7. Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R., Botham, P.A., Doe, 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, pp. 184-232.

B.26 SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI

TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS JYRSIJÖILLÄ

1. MENETELMÄ

Tämä subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 408 (1998).

1.1 JOHDANTO

Määritettäessä ja arvioitaessa kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia voidaan subkrooninen toistetuilla annoksilla aiheutettu suun kautta vaikuttava myrkyllisyys määrittää sen jälkeen, kun alustavia myrkyllisyyttä koskevia tietoja on saatu välittömän myrkyllisyyden testistä tai toistetuilla annoksilla suoritetusta 28 vuorokauden myrkyllisyystestistä. 90 vuorokauden tutkimuksesta saadaan tietoja terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta pitkähkön ajanjakson aikana, myös vieroittamisen jälkeen eläimen kehittyessä ja kasvaessa täysikasvuiseksi. Tutkimuksessa saadaan tietoa tärkeimmistä myrkyllisyysvaikutuksista, siinä käyvät ilmi kohde-elimet ja aineen mahdollinen kertyminen ja siinä voidaan saada arvio haitattomista altistustasoista (NOAEL), joita voidaan käyttää valittaessa annoksia pitkäaikaisten vaikutusten tutkimiseen sekä turvallisuuskriteerien asettamiseen ihmisten altistukselle.

Menetelmässä korostetaan neurologisia loppupisteitä, ja siinä saadaan tietoa immunologisista ja lisääntymisfysiologisista vaikutuksista. Menetelmässä korostetaan myös sitä, että eläimistä on tehtävä huolellisesti kliinisiä havaintoja, jotta saadaan mahdollisimman paljon tietoa. Tämän tutkimuksen avulla pitäisi olla mahdollista tunnistaa kemikaaleja, joilla voi olla perusteellisempia tutkimuksia vaativia myrkyllisiä vaikutuksia hermostoon, immuunijärjestelmään ja lisääntymiselimiin.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Annos: annetun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläimen painoyksikköä kohti (esim. mg/kg) tai vakioina pidettävänä ruokavalion pitoisuuksina (ppm).

Annostelu: yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutajuuden ja annostelun keston.

NOAEL: lyhennys määritelmälle "no-observed-adverse-effect level" eli korkein annostaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan suun kautta päivittäin asteittain suurenevina annoksina useille koe-eläinryhmille niin, että yhtä annostasoa annetaan ryhmää kohti 90 vuorokauden ajan. Tänä aikana eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyvaikutusten havaitsemiseksi. Testin kuluessa koolleille tai tapetuille eläimille tehdään ruumiinavaus, ja testin päättyessä myös vielä elossa olevat eläimet tapetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 **Eläinten valmistelu**

Testissä olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden vuorokauden ajan ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläimet jaetaan satunnaistetusti kontrolli- ja käsittelyryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnustenumero.

1.4.2 **Annosten valmistelu**

Testiainetta annetaan letkuruokinnalla tai ravinnon tai juomaveden mukana. Menetelmä riippuu tutkimuksen tarkoituksesta ja testiaineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esim. maissiöljyyn) tehtävää liuosta tai emulsiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos liuotin on muu kuin vesi, sen myrkyominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilisuus annosteluolosuhteissa olisi määritettävä.

1.4.3 **Testiolosuhteet**

1.4.3.1 *Koe-eläimet*

Rotta on suositeltava koe-eläin, vaikka muita jyrksijöitä kuten hiirtä voidaan myös käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratorioskantaa ja nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Naaraat eivät saa olla synnyttäneitä eivätkä tiineinä. Annostelu on aloitettava mahdollisimman pian vieroitamisen jälkeen ja joka tapauksessa ennen kuin eläimet ovat yhdeksän viikon ikäisiä. Tutkimuksen alkaessa eläinten painot saavat erota toisistaan mahdollisimman vähän, enintään ± 20 % kummankin sukupuolen keskipainosta. Jos tutkimuksen on tarkoitus olla alustava tutkimus pitkäaikaiselle myrkyllisyystutkimukselle, molemmissa tutkimuksissa olisi käytettävä samaa kantaa ja samalta toimittajalta hankittuja eläimiä.

1.4.3.2 *Määrä ja sukupuoli*

Kullakin annostasolla olisi käytettävä vähintään 20 eläintä (10 naarasta ja 10 koirasta). Jos eläimiä tapetaan kokeen aikana, määrän on oltava saman verran suurempi kuin ennen tutkimuksen päättymistä tapettavien eläinten määrä. Kemikaalista tai sitä läheisesti muistuttavasta aineesta saatavilla olevien aiempien tietojen perusteella olisi harkittava kymmenen eläimen (viisi kumpaakin sukupuolta) lisäryhmän sisällyttämistä kontrolliryhmään ja suurimman annoksen ryhmään sitä varten, että niitä havainnoitaisiin käsittelyjakson jälkeen mahdollisten myrkyvaikutusten palautumisen tai jatkumisen havaitsemiseksi. Tämä käsittelyn jälkeinen aika olisi asetettava havaittujen vaikutusten mukaan.

1.4.3.3 *Annostasot*

Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa ja testin kanssa samaan aikaan on tehtävä kontrolli paitsi jos tehdään raja-arvotesti (ks. 1.4.3.4). Annostasot voidaan asettaa toistetuilla annoksilla tehdyn testin tai raja-arvotestin tulosten perusteella, ja kaikki mahdolliset testiaineesta tai samanlaisista aineista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso olisi valittava siten, että se on myrkyllinen, mutta ei johda kuolemaan eikä aiheuta suurta kärsimystä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksinkertaiset – nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin n. 6–10-kertaisia).

Kontrolliryhmän on oltava käsittelemätön ryhmä tai kantaja-ainetta saava ryhmä, jos testiaineen antamiseen käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta testiainetta. Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmälle on annettava testiainetta suurimmassa käytetyssä kantaja-aineen tilavuudessa. Jos testiaine annetaan ravinnon mukana ja siitä aiheutuu ravinnonoton vähenemistä, voi normaaliravintoa saava kontrolliryhmä olla hyödyllinen, jotta erotettaisiin määrittävyydestä aiheutunut ravinnonoton väheneminen sellaisesta, joka aiheutuu testimallin toksikologisista muutoksista.

Seuraavat mahdollisen kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, aineenvaihduntaan tai testiaineen pidättymiseen (retentioon) elimistössä; sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyominaisuuksia; vaikutukset ravinnon tai veden nauttimiseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen.

1.4.3.4 *Raja-annostesti*

Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) / vrk ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Antotapa**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 90 vuorokauden ajan. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä, esim. testiainetta annetaan viitenä päivänä viikossa, se on perusteltava. Jos testiaine annetaan letkuruokinnalla, se on annettava yhtenä annoksena mahaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus riippuu koe-eläimen koosta. Tilavuus ei saisi olla suurempi kuin 1 ml/100 g painoa. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

Kun aine annetaan ravinnon tai juomaveden kanssa, on tärkeää varmistaa, ettei testiainemäärä häiritse normaalia ravitsemusta tai vesitasetta. Kun testiaine annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakioipitoisuutta (ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa. Valittu vaihtoehto on mainittava. Kun aine annetaan letkulla, annos olisi annettava joka päivä suunnilleen samaan aikaan, ja sitä olisi säädettävä tarvittaessa, jotta annostaso voitaisiin pitää vakiona suhteutettuna eläimen painoon. Kun 90 vuorokauden testin on tarkoitus olla alustava testi ennen pitkäaikaisen myrkyllisyydestin suorittamista, olisi molemmissa testeissä käytettävä samanlaista ruokavaliota.

1.5.2 **Havainnot**

Havainnointiajan olisi oltava vähintään 90 vuorokautta. Pitkäaikaiseen havainnointiin tarkoitetun ryhmän eläimiä olisi pidettävä sopiva aika ilman käsittelyä, jotta voitaisiin osoittaa myrkkyyvaikutusten pysyvyys tai eläinten toipuminen niistä.

Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan kellonaikaan (samoihin kellonaikoihin). Tässä olisi otettava huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliininen tila on kirjattava. Kaikki eläimet tarkastetaan sairastavuuden ja kuolleisuuden havaitsemiseksi vähintään kahdesti päivässä, tavallisesti aamulla ja illalla.

Kaikista eläimistä olisi tehtävä yksityiskohtaiset kliiniset havainnot vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata alkutilaan) ja kerran viikossa sen jälkeen. Havainnointi olisi tehtävä niin, että eläin on häkin ulkopuolella, mieluiten vakioalueella ja suunnilleen samaan vuorokaudenaikaan. Havainnot olisi kirjattava huolellisesti, ja mieluiten olisi käytettävä testilaboratorion nimenomaisesti määrittelemää pisteytysmenetelmää. Olisi pyrittävä siihen, että havainnointiolosuhteissa olisi mahdollisimman vähän vaihtelua. Kirjattavia havaintoja olisivat mm. muutokset nahassa, turkissa, silmissä ja limakalvoissa, eritykset ja eritteet, autonominen aktiiviteetti (esim. kyynelät, karvojen jäykistyminen, silmäterän koko, epätavallinen hengitys). Muutokset käynnissä, asennossa ja reagoimisessa käsittelyyn sekä kouristusliikkeet ja jäykkyys, kaavamaiset liikkeet (esim. liioiteltu siistiminen, toistuva ympyrää kulkeminen) tai omituinen käyttäytyminen (esim. itseään vahingoittaminen, takaperin kävely) olisi myös kirjattava (1).

Silmät olisi tutkittava oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testiaineen antamista ja testin lopussa mieluiten kaikilta koe-eläimiltä ja ainakin suuren annoksen ryhmään ja kontrolliryhmään kuuluvilta. Jos silmissä havaitaan muutoksia, olisi tutkittava kaikki eläimet.

Altistusajanjakson loppua kohti, mutta ei aikaisemmin kuin viikolla 11 olisi tutkittava aistien reagointi erilaisiin ärsykkeisiin (1) (esim. kuulo-, näkö- ja proprioseptiiviset ärsykkeet) (2), (3), (4), tarttumisotteen voimakkuus (5) ja motorinen aktiivisuus (6). Lisätietoja käytettävistä menetelmistä annetaan vastaavissa viitteissä. Myös muita menetelmiä saa käyttää.

Tutkimuksen loppupuolella tehtäviä toiminnallisia havaintoja ei tarvitse suorittaa, jos muista tutkimuksista on saatavilla toiminnallisia havaintoja koskevia tietoja ja päivittäisissä kliinisissä havainnoissa ei ole tullut ilmi toiminnallisia vajavuuksia.

Poikkeuksellisesti toiminnallisia havaintoja ei tarvitse myöskään tehdä ryhmille, joissa havaitaan muita myrkkyyvaikutuksia siinä määrin, että ne haittaisivat merkittävästi toiminnallista testiä.

1.5.2.1 *Eläimen paino ja ravinnon ja/tai veden nauttiminen*

Kaikki eläimet olisi punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnonotto olisi mitattava vähintään viikoittain. Jos testiaine annetaan juomaveden mukana, veden nauttiminen olisi myös mitattava vähintään viikoittain. Veden nauttimisen mittaamista voidaan harkita myös sellaisissa ruoka- tai letkuruokintatutkimuksissa, joiden aikana juomisessa voi esiintyä muutoksia.

1.5.2.2 Hematologia ja kliininen biokemia

Verinäytteet olisi otettava nimetystä paikasta ja säilytettävä tarvittaessa asianmukaisissa olosuhteissa. Testiajanjakson lopussa näytteet otetaan juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä.

Verestä olisi tehtävä testiajanjakson lopussa ja aina, kun on otettu verinäytteitä, seuraavat määrykset: hematokriitti, hemoglobiinikonsentraatio, punasolujen määrä, valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymisaika tai hyytymiskyky.

Kliinisen biokemian määrykset, joilla tutkitaan tärkeimpiä myrkyvaikutuksia kudoksissa ja erityisesti munuaisissa ja maksassa, olisi tehtävä verinäytteistä, jotka on otettu kustakin eläimestä juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja). Samoin kuin hematologisia tutkimuksia varten myös kliinisen biokemian testejä varten voidaan näytteitä ottaa kokeen kestäessäkin. Suositellaan, että eläimet paastoaisivat yli yön ennen verinäytteiden ottoa⁽¹⁾. Plasmasta tai seerumista olisi määritettävä natrium, kalium, glukoosi, kokonaiskolesteroli, urea, veren ureatyyppi, kreatiniini, kokonaisvalkuainen ja albumiini sekä enemmän kuin kaksi entsyymiä, jotka osoittavat maksoluvaikutuksia (kuten alaniiniaminotransferaasi, asparagiinihappoaminotransferaasi, alkalinen fosfataasi, gamma-glutaminihappotranspeptidaasi ja sorbitolidehydrogenaasi). Muitakin (maksan tai muiden elimien) entsyymejä ja sappihapot, jotka voivat antaa hyödyllistä tietoa tietyissä olosuhteissa, voidaan määrittää.

Seuraavat virtsamäärykset voidaan tehdä valinnaisesti tutkimuksen viimeisen viikon aikana (tällöin on mitattava virtsan keruu-aika): ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/tai verisolut.

Lisäksi olisi harkittava yleistä kudosaauriota osoittavien seerumissa esiintyvien merkkiaineiden määrytystä. Muita määryksiä, jotka olisi tehtävä, jos testiaineen tunnetut ominaisuudet saattavat vaikuttaa tai niiden epäillään vaikuttavan kyseisiin määryksiin liittyvään aineenvaihduntaan, ovat kalsium, fosfori, paastotriglyseridit, tietyt hormonit, methemoglobiini ja koliinisteraasi. Tarvittavat määrykset olisi yksilöitävä tiettyihin luokkiin kuuluville kemikaaleille tai tapauskohtaisesti.

Kaiken kaikkiaan lähestymistavan on oltava joustava. Se riippuu eläinlajista ja aineen havaituista ja/tai odotetuista vaikutuksista.

Jos aiemmat tiedot ovat puutteelliset, olisi harkittava, täytyykö hematologisia ja kliinisen biokemian määryksiä tehdä ennen annosten antamisen aloittamista. Yleensä ei suositella, että tällaisia tietoja tuotettaisiin ennen käsittelyä (7).

(1) Monia seerumista ja plasmasta tehtäviä määryksiä, esimerkiksi glukoosia, varten olisi paasto yön yli suositeltava. Tärkeimmät syyt tähän ovat se, että ilman paastoa näytteissä olisi luonnollisesti paljon enemmän vaihtelua, mikä saattaisi peittää vähäisempiä vaikutuksia ja vaikeuttaa tulkintaa. Toisaalta paastoaminen yli yön saattaa häiritä eläinten yleistä aineenvaihduntaa ja myös päivittäistä altistamista testiaineelle erityisesti ruokintatutkimuksissa. Jos eläimet paastoavat yli yön, kliinisen biokemian määrykset olisi tehtävä sen jälkeen, kun on tehty toiminnalliset havainnot.

1.5.2.3 *Ruumiinavaustutkimukset*

Kaikille tutkimukseen sisältyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja) maksa, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, kohtu, munasarjat, kateenkorva, perna, aivot ja sydän olisi puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne olisi punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi.

Seuraavat kudokset olisi säilöittävä sellaiseen kiinnitysväliaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyyppille ja aiottuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki suuret leesiot, aivot (edustavat alueet, mukaan luettuina isoivot, pikkuaivot ja ydin/aivosilta), selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka), aivolisäke, kilpirauhanen, lisäkilpirauhanen, kateenkorva, ruokatorvi, sylkirauhaset, maha, ohut- ja paksusuoli (mukaan lukien Peyerin imukerässikermit), maksa, haima, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, rintakehä ja keuhkot (säilötään puhaltamalla täyteen kiinnitysainetta ja upottamalla sitten siihen), aortta, sukurauhaset, kohtu, lisäsuokupuolirauhaset, naaraan rintarauhanen, eturauhanen, virtsarakko, sappirakko (hiiri), imusolmukkeet (mieluiten yksi imusolmuke, joka kattaa antotien ja toinen, joka on kaukana antotiestä ja kattaa systeemiset vaikutukset), ääreisherma (lonkkahermo tai säärihermo), mieluiten lähellä kyseessä olevaa lihasta, näyte luuytimestä (ja/tai tuore luuydinnestenäyte), nahkaa, silmät (jos oftalmologisessa tutkimuksessa havaittiin muutoksia). Kliiniset ja muut löydökset voivat antaa aihetta muiden kudosten tutkimiseen. Myös muut elimet, joihin testiaineen oletetaan vaikuttavan ennestään tunnettujen ominaisuuksien perusteella, olisi säilöittävä.

1.5.2.4 *Histopatologia*

Täydellinen histopatologinen tutkimus olisi tehtävä kontrolliryhmän ja suuren annoksen ryhmän kaikkien eläinten säilytyistä elimistä ja kudoksista. Nämä tutkimukset on tehtävä myös muiden annosryhmien eläimille, jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia.

Kaikki suuret leesiot olisi tutkittava.

Jos tutkimuksessa on mukana testiryhmä, jolle testiä on jatkettu pitempään sen jälkeen, kun testiaineen antaminen lopetettiin, histopatologiset tutkimukset on tehtävä niille kudoksille ja elimille, joissa on näkynyt muutoksia käsitellyissä ryhmissä.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 **MÄÄRITYSTULOKSET**

Tutkimuksessa on ilmoitettava yksilökohtaiset tulokset. Tulokset on lisäksi esitettävä taulukoituina, ja niistä on käytävä ilmi seuraavat tiedot: kuhunkin ryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa; testin aikana kuolleena löydettyjen tai inhimillisistä syistä tapettujen eläinten lukumäärä ja kuoleman tai tappamisen ajankohta; niiden eläinten lukumäärä, joissa näkyy myrkyvaikutuksia; havaittujen myrkyvaikutusten kuvaus, mukaan luettuina myrkytysoireiden alku, kesto ja vakavuus; niiden eläinten lukumäärä, joissa havaitaan leesioita; leesioiden tyyppi ja kunkin tyypin leesioista kärsivien eläinten prosenttiosuus.

Kun on numeerisia tuloksia, ne on arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Tilastomenetelmät ja analysoitavat määritystulokset on valittava tutkimusta suunniteltaessa.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.2.1 Testiaine:

- fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikokemialliset ominaisuudet
- tunnistetiedot
- kantaja-aine (tarvittaessa): jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

2.2.2 Koe-eläinlajit:

- käytetty eläinlaji ja kanta
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli
- toimittaja, häkit, ravinto jne
- ikunkin eläimen paino testin alkaessa.

2.2.3 Koelosuhteet:

- annostasojen valintaperusteet
- yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteessa
- yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta
- todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa
- yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

2.2.4 Tulokset:

- eläimen paino ja painon muutokset
- ravinnon nauttiminen ja veden nauttiminen tarvittaessa
- myrkyllisyysvaste sukupuolittain ja annostasoittain, mukaan lukien myrkyllisyysvaikutuksen merkit
- kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (sekä palautuvat vaikutukset että muut)
- silmätutkimuksen tulokset
- aistitoiminta, tarttumisvoimakkuus ja motorisen aktiivisuuden arviointi (jos saatavilla)
- hematologiset testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot
- kliinisen biokemian testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot
- eläimen paino testin lopussa, elinten painot sekä elinten ja eläinten painosuhteet
- ruumiinavauslöydökset
- yksityiskohtainen kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä
- imeytymistiedot, jos saatavilla
- tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

3. **LÄHDELUETTELO**

- (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 Assesment 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.27 SUBKROONINEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTESTI

TOISTETUILLA ANNOKSILLA TEHTÄVÄ 90 VUOROKAUDEN ORAALINEN MYRKYLLISYYSTUTKIMUS MUILLA KUIN JYRSIJÖILLÄ

1. MENETELMÄ

Tämä subkrooninen oraalinen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta N:o 409 (1998).

1.1 JOHDANTO

Määritettäessä ja arvioitaessa kemikaalin myrkyllisyysominaisuuksia voidaan subkrooninen toistetuilla annoksilla aiheutettu suun kautta vaikuttava myrkyllisyys määrittää sen jälkeen, kun alustavia myrkyllisyyttä koskevia tietoja on saatu välittömän myrkyllisyyden testistä tai toistetuilla annoksilla suoritetusta 28 vuorokauden myrkyllisyystestistä. 90 vuorokauden tutkimuksesta saadaan tietoja mahdollisista terveyshaitoista, joita todennäköisesti seuraa toistuvasta altistuksesta aikana, jolloin eläin kasvaa nopeasti nuoreksi aikuiseksi. Tutkimuksessa saadaan tietoa tärkeimmistä myrkyllisyysvaikutuksista, siinä käyvät ilmi kohde-elimet ja aineen mahdollinen kertyminen ja siinä voidaan saada arvio haitattomista altistustasoista (NOAEL), joita voidaan käyttää valittaessa annoksia pitkäaikaisten vaikutusten tutkimiseen sekä turvallisuuskriteerien asettamiseen ihmisten altistukselle.

Tällä testimenetelmällä voidaan tunnistaa kemikaalialtistuksen haittavaikutukset muissa kuin jyrsijöissä, ja sitä olisi käytettävä ainoastaan silloin, kun

- muissa tutkimuksissa havaitut vaikutukset edellyttävät selvennystä tai tarkempaa ominaisuuksien määrittämistä jossain muussa lajissa, joka ei ole jyrsijä,
- oksikokineettisten tutkimusten perusteella muu kuin jyrsijä on paras koe-eläinlaji tai
- muun kuin jyrsijän käyttö on perusteltua muista erityisistä syistä.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Annos: Annetun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan painoyksikköinä (g, mg) tai testiaineen painona koe-eläimen painoysikköä kohti (esim. mg/kg) tai vakioipitoisuuksina ravinnossa (ppm).

Annostelu: Yleinen termi, joka kattaa annoksen, annostelutaajuuden ja annostelun keston.

NOAEL: Lyhennys määritelmälle "no-observed-adverse-effect level" eli korkein annostaso, jolla ei havaita mitään haitallisia käsittelyyn liittyviä vaikutuksia.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testiainetta annetaan suun kautta päivittäin asteittain vaihtelevina annoksina useille koe-eläinryhmille niin, että yhtä annostasoa annetaan ryhmää kohti 90 vuorokauden ajan. Tänä aikana eläimiä havainnoidaan tarkasti myrkyllisyysvaikutusten havaitsemiseksi. Testin kuluessa kuolleille tai tapetuille eläimille tehdään ruumiinavaus, ja testin päättyessä myös vielä elossa olevat eläimet tapetaan ja niille tehdään ruumiinavaus.

1.4 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.4.1 **Eläinlajin valinta**

Jos käytetään muuta eläinlajia kuin jyrtsijää, yleisesti käytetty koe-eläinlaji on koira. Koirarodun pitäisi olla tarkasti määritelty; usein käytetään beaglea. Muitakin lajeja, esim. sikaa tai minisikaa, voi käyttää. Kädellisiä ei suositella, ja niiden käytön olisi oltava perusteltua. Eläinten olisi oltava nuoria ja terveitä. Jos on kyseessä koira, annostelu olisi aloitettava mieluiten 4–6 kuukauden iässä ja viimeistään 9 kuukauden iässä. Jos tutkimuksen on tarkoitus olla alustava tutkimus pitkäaikaiselle myrkyllisyystutkimukselle, molemmissa tutkimuksissa olisi käytettävä samaa lajia/rotua.

1.4.2 **Eläinten valmistelu**

Testissä olisi käytettävä terveitä eläimiä, jotka on totutettu laboratorio-olosuhteisiin ja joita ei ole käytetty kokeisiin aiemmin. Totuttamisajan pituus riippuu valitusta koe-eläinlajista ja sen alkuperästä. Suositellaan vähintään viittä päivää koirille tai kyseistä tarkoitusta varten omassa siittolassa kasvatetuille sioille ja vähintään kahta viikkoa, jos eläimet ovat peräisin ulkopuoliselta toimittajalta. Koe-eläinten laji, kanta, alkuperä, sukupuoli, paino ja/tai ikä on tunnettava. Eläimet jaetaan satunnaistetusti kontrolli- ja käsittelyryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Kullekin eläimelle annetaan oma tunnistenumero.

1.4.3 **Annosten valmistelu**

Testiaine voidaan antaa ruokavaliassa tai juomavedessä, letkuruokinnalla tai kapseleina. Menetelmä riippuu tutkimuksen tarkoituksesta ja testiaineen fysikaalisista ja kemiallisista ominaisuuksista.

Tarvittaessa testiaine liuotetaan tai suspendoidaan sopivaan kantaja-aineeseen. On suositeltavaa, että ensin harkitaan vesiliuosta tai suspensiota aina, kun se on mahdollista, ja sen jälkeen öljyyn (esim. maissiöljyyn) tehtävää liuosta tai emulsiota ja sitten mahdollisesti muita liuottimia. Jos liuotin on muu kuin vesi, sen myrkyllisyysominaisuudet on tunnettava. Testiaineen stabiilisuus annosteluolosuhteissa olisi määritettävä.

1.5 TESTIN SUORITUS

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Kullakin annostasolla olisi käytettävä vähintään 8 eläintä (4 naarasta ja 4 koirasta). Jos eläimiä tapetaan kokeen aikana, testiin on otettava alussa sen verran enemmän eläimiä kuin niitä tapetaan ennen tutkimuksen päättymistä. Eläinten lukumäärän testin päättyessä on oltava riittävä myrkyllisyysvaikutusten järkevään arviointiin. Kemikaalista tai sitä läheisesti muistuttavasta aineesta saatavilla olevien aiempien tietojen perusteella olisi harkittava kahdeksan eläimen (neljä kumpaakin sukupuolta) lisäryhmän sisällyttämistä kontrolliryhmään ja suurimman annoksen ryhmään sitä varten, että niitä havainnoitaisiin käsittelyjakson jälkeen mahdollisten myrkyllisyysvaikutusten palautumisen tai jatkumisen havaitsemiseksi. Tämä käsittelyn jälkeinen aika olisi asetettava havaittujen vaikutusten mukaan.

1.5.2 **Annokset**

Tutkimuksessa on käytettävä vähintään kolmea annostasoa, ja testin kanssa samaan aikaan on tehtävä kontrolli, paitsi jos tehdään raja-arvotesti (ks. 1.5.3). Annostasot voidaan asettaa toistetuilla annoksilla tehdyn testin tai raja-arvotestin tulosten perusteella, ja kaikki mahdolliset testiaineesta tai samanlaisista aineista saatavilla olevat toksikologiset ja toksikokineettiset tiedot on otettava huomioon. Mikäli testiaineen fysikokemialliset ominaisuudet tai biologiset vaikutukset eivät rajoita korkeimman annostason valintaa, annostaso olisi valittava siten, että se on myrkyllinen, mutta ei johda kuolemaan eikä aiheuta suurta kärsimystä. Annostasojen on oltava laskevia, jotta voitaisiin osoittaa kaikki annokseen liittyvät vasteet ja haitaton taso alhaisimmalla annostasolla. Kaksin–nelinkertaiset erot annostasojen välillä ovat usein parhaimmat alenevassa annossarjassa, ja usein on hyödyllisempää lisätä neljäs testiryhmä kuin käyttää hyvin suuria annosvälejä (ts. suurempia kuin n. 6–10-kertaisia).

Kontrolliryhmän on oltava käsittelemätön ryhmä tai kantaja-ainetta saava ryhmä, jos testiaineen antamiseen käytetään kantaja-ainetta. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin testiryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta testiainetta. Jos käytetään kantaja-ainetta, kontrolliryhmän on saatava kantaja-aine suurimmassa käytetyssä tilavuudessa. Jos testiaine annetaan ravinnon mukana ja siitä aiheutuu ravinnonoton vähenemistä, voi normaaliravintoa saava kontrolliryhmä olla hyödyllinen, jotta erotettaisiin maittavuudesta aiheutunut ravinnonoton väheneminen sellaisesta, joka aiheutuu testimallin toksikologisista muutoksista.

Seuraavat mahdollisen kantaja-aineen ja muiden lisäaineiden ominaisuudet on otettava huomioon: vaikutukset imeytymiseen, elimistöön jakautumiseen, aineenvaihduntaan tai testiaineen retentioon elimistössä; sellaiset vaikutukset testiaineen kemiallisiin ominaisuuksiin, jotka voivat muuttaa sen myrkyllisyysominaisuuksia; sekä vaikutukset ravinnon tai veden nauttimiseen tai eläinten ravitsemustilanteeseen.

1.5.3 **Raja-annostesti**

Ellei yhdellä annostasolla, joka on vähintään 1000 mg/kg (eläimen painokiloa kohti) / vrk ja joka annetaan tälle tutkimukselle annettujen ohjeiden mukaan, havaita haittavaikutuksia ja jos myrkyllisyyttä ei ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus kolmella eri annostasolla ei ehkä ole välttämätön. Rajatestisääntöä sovelletaan, paitsi jos ihmisten altistumisesta voidaan päätellä, että on käytettävä korkeampaa annostasoa.

1.5.4 **Antotapa**

Eläimille annetaan testiainetta päivittäin seitsemänä päivänä viikossa 90 vuorokauden ajan. Jos käytetään muunlaista koejärjestelyä, esim. testiainetta annetaan viitenä päivänä viikossa, se on perusteltava. Jos testiaine annetaan letkuruokinnalla, se on annettava yhtenä annoksena mahaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Suurin yhdellä kerralla annettava nestetilavuus riippuu koe-eläimen koosta. Tilavuuden pitäisi yleensä olla mahdollisimman pieni. Testitulavuuksien tilavuuden vaihtelun pitäisi olla mahdollisimman pientä (testiannosten pitoisuutta olisi säädeltävä niin, että tilavuus olisi sama kaikilla annostasoilla), paitsi jos käytetään ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutus suuremmissa pitoisuuksissa on yleensä voimakkaampi.

Kun testiaine annetaan ravinnon tai juomaveden kanssa, on tärkeää varmistaa, ettei testiainemäärä häiritse normaalia ravitsemusta tai vesitasetta. Kun testiaine annetaan ravinnon kanssa, voidaan käyttää joko vakiopitoisuutta (ppm) ravinnossa tai eläimen painoon suhteutettua annoksen vakiotasoa. Mahdolliset muut antotavat on mainittava. Kun aine annetaan letkulla tai kapselina, annos olisi annettava joka päivä suunnilleen samaan aikaan, ja sitä olisi mukautettava tarvittaessa, jotta annostaso voitaisiin pitää vakiona suhteutettuna eläimen painoon. Kun 90 vuorokauden testin on tarkoitus olla alustava testi ennen pitkäaikaisen myrkyllisyydestin suorittamista, olisi molemmissa testeissä käytettävä samanlaista ruokavaliota.

1.5.5 **Havainnot**

Havainnointiajan olisi oltava vähintään 90 vuorokautta. Pitkäaikaiseen havainnointiin tarkoitetun ryhmän eläimiä olisi pidettävä sopiva aika ilman käsittelyä, jotta voitaisiin osoittaa myrkyllisyysvaikutusten pysyvyys tai eläinten toipuminen niistä.

Yleiset kliiniset havainnot olisi tehtävä vähintään kerran päivässä, mieluiten samaan kellonaikaan (samoihin kellonaikoihin). Tässä olisi otettava huomioon se, milloin annoksen antamisen jälkeen odotetut vaikutukset ovat suurimmillaan. Eläinten kliininen tila on kirjattava. Kaikki eläimet tarkastetaan sairastavuuden ja kuolleisuuden havaitsemiseksi vähintään kahdesti päivässä, tavallisesti aamulla ja illalla.

Kaikista eläimistä olisi tehtävä yksityiskohtaiset kliiniset havainnot vähintään kerran ennen ensimmäistä altistusta (jotta eläimessä havaittavia muutoksia voidaan verrata lähtötilaan) ja kerran viikossa sen jälkeen. Havainnointi olisi tehtävä niin, että eläin on häkin ulkopuolella, mieluiten vakioalueella ja suunnilleen samaan vuorokaudenaikaan. Olisi pyrittävä siihen, että havainnointiolosuhteissa olisi mahdollisimman vähän vaihtelua. Myrkyllisyyden merkit olisi kirjattava huolellisesti, mukaan luettuna niiden alkamisajankohta, aste ja kesto. Kirjattavia havaintoja olisivat mm. muutokset nahassa, turkissa, silmissä ja limakalvoissa, eritykset ja eritteet, autonominen aktiiviteetti (esim. kyynelät, karvojen jäykistyminen, silmäterän koko, epätavallinen hengitys). Muutokset käynnissä, asennossa ja reagoimisessa käsittelyyn sekä kouristusliikkeet ja jäykkyys, kaavamaiset liikkeet (esim. liioiteltu siistiminen, toistuva ympyrää kulkeminen) tai omituinen käyttäytyminen olisi myös kirjattava (1).

Silmät olisi tutkittava oftalmoskoopilla tai muulla sopivalla laitteella ennen testiaineen antamista ja testin lopussa mieluiten kaikilta koe-eläimiltä ja ainakin suuren annoksen ryhmään ja kontrolliryhmään kuuluvilta. Jos silmissä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia, olisi tutkittava kaikki eläimet.

1.5.5.1 *Eläimen paino ja ravinnon ja/tai veden nauttiminen*

Kaikki eläimet olisi punnittava vähintään kerran viikossa. Ravinnonotto olisi mitattava vähintään viikoittain. Jos testiaine annetaan juomaveden mukana, veden nauttiminen olisi myös mitattava vähintään viikoittain. Veden nauttimisen mittaamista voidaan harkita myös sellaisissa ruoka- tai letkuruokintatutkimuksissa, joiden aikana juomisessa voi esiintyä muutoksia.

1.5.5.2 *Hematologia ja kliininen biokemia*

Verinäytteet olisi otettava nimetystä paikasta ja säilytettävä tarvittaessa asianmukaisissa olosuhteissa. Testiajanjakson lopussa näytteet otetaan juuri ennen tappamista tai sen yhteydessä.

Verestä olisi tehtävä tutkimuksen alussa ja sitten joko kuukauden välein tai testiajanjakson puolivälissä ja lopuksi testiajanjakson päättyessä seuraavat määrytykset: hematokriitti, hemoglobiinikonsentraatio, punasolujen määrä, valkosolujen kokonaismäärä ja niiden erittelylaskenta, verihiutaleiden määrä ja veren hyytymiskykyä kuvaavia määrytyksiä kuten hyytymisaika, protrombiiniaika tai tromboplastiiniaika.

Kliinisen biokemian määritykset, joilla tutkitaan tärkeimpiä myrkyllisyysvaikutuksia kudoksissa ja erityisesti munuaisissa ja maksassa, olisi tehtävä verinäytteistä, jotka on otettu kaikista eläimistä tutkimuksen alussa ja sitten joko kuukauden välein tai testiajanjakson puolivälissä ja lopuksi testiajanjakson päättyessä. Testattavaksi harkittavia kohteita ovat elektrolyyttitasapaino, hiilihydraattiaineenvaihdunta sekä maksan ja munuaisten toiminta. Erityistestien valinta riippuu testiaineen vaikutustavasta tehdyistä havainnoista. Eläimiä olisi pidettävä paastossa sopiva aika ennen verinäytteiden ottamista. Suositeltavia määrityksiä ovat mm. kalsium, fosfori, kloridi, natrium, kalium, paastoglukoosi, alaniiniaminotransferaasi, asparagiinihappoaminotransferaasi, ornitiinidekarboksylaasi, gamma-glutamiinihappotranspeptidaasi, ureatyppi, albumiini, veren kreatiniini, kokonaisbilirubiini ja seerumin kokonaisproteiinipitoisuus.

Virtsamäärityksiä olisi tehtävä ainakin tutkimuksen alussa, sitten tutkimuksen puolivälissä ja lopuksi sen päättyessä (virtsan keruu-aika on mitattava). Virtsasta on määritettävä ulkonäkö, tilavuus, osmolaalisuus tai ominaistiheys, pH, valkuainen, glukoosi ja veri ja/tai verisolut. Muita muuttujia voidaan mitata tarvittaessa.

Lisäksi olisi harkittava yleistä kudosaauriota osoittavien merkkiaineiden määrittystä. Muita myrkyllisyyden arviointiin mahdollisesti tarvittavia määrityksiä ovat esim. lipidi-, hormoni-, happo/emäs-, methemoglobiini- ja koliiniesteraasi-inhibiittorimääritykset. Muita kliinisen biokemian määrityksiä voidaan tehdä tarvittaessa havaittujen vaikutusten tutkimisen laajentamiseksi. Tarvittavat määritykset olisi yksilöitävä tiettyihin luokkiin kuuluville kemikaaleille tai tapauskohtaisesti.

Kaiken kaikkiaan lähestymistavan on oltava joustava. Se riippuu eläinlajista ja aineen havaitusta ja/tai odotetusta vaikutuksesta.

1.5.5.3 *Ruumiinavaustutkimukset*

Kaikille tutkimukseen sisällyville eläimille on tehtävä täydellinen ja yksityiskohtainen ruumiinavaus, jossa tutkitaan huolellisesti eläimen ruumis päältä päin, kaikki ruumiin aukot sekä kallo-, rinta- ja vatsaontelot ja niiden sisältö. Kaikkien eläinten (lukuun ottamatta kuolleina löydettyjä ja/tai kesken koetta tapettuja) maksa ja sappirakko, munuaiset, lisämunuaiset, kivekset, lisäkivekset, munasarjat, kohtu, kilpirauhanen (ja lisäkilpirauhaset), kateenkorva, perna, aivot ja sydän olisi puhdistettava muusta kudoksesta tapauksen mukaan, ja ne olisi punnittava mahdollisimman nopeasti avauksen jälkeen kuivumisen estämiseksi.

Seuraavat kudokset olisi säilöittävä sellaiseen kiinnitysväliaineeseen, joka sopii parhaiten kyseiselle kudostyyppille ja aiottuun histopatologiseen tutkimukseen: kaikki suuret leesiot, aivot (edustavat alueet, mukaan luettuina isoavot, pikkuaivot ja ydin/aivosilta), selkäydin (kolmesta kohdasta: kaularanka, rintarangan keskiosa ja lanneranka), aivolisäke, kilpirauhanen, lisäkilpirauhanen, kateenkorva, ruokatorvi, sylkirauhaset, maha, ohut- ja paksusuoli (mukaan luettuna Peyerin imukerässikermät), maksa, sappirakko, haima, munuaiset, lisämunuaiset, perna, sydän, rintakehä ja keuhkot, aortta, sukurauhaset, kohtu, lisäsukupuolirauhaset, naaraan rintarauhanen, eturauhanen, virtsarakko, imusolmukkeet (mieluiten yksi imusolmuke, joka kattaa antotien ja toinen, joka on kaukana antotiestä ja kattaa systeemiset vaikutukset), ääreisherma (lonkkahermo tai säärihermo), mieluiten lähellä kyseessä olevaa lihasta, näyte luuytimeä (ja/tai tuore luuydinnestänäyte) ja nahkaa. Kliiniset ja muut löydökset voivat antaa aihetta muiden kudosten tutkimiseen. Myös muut elimet, joihin testiaineen oletetaan vaikuttavan ennestään tunnettujen ominaisuuksien perusteella, olisi säilöittävä.

1.5.5.4 *Histopatologia*

Täydellinen histopatologinen tutkimus olisi tehtävä kontrolliryhmän ja suuren annoksen ryhmän kaikkien eläinten säilötyistä elimistä ja kudoksista. Nämä tutkimukset on tehtävä myös muiden annosryhmien eläimille, jos suuren annoksen ryhmässä havaitaan käsittelyyn liittyviä muutoksia.

Kaikki suuret leesiot olisi tutkittava.

Jos tutkimuksessa on mukana testiryhmä, jolle testiä on jatkettu pitempään sen jälkeen, kun testiaineen antaminen lopetettiin, histopatologiset tutkimukset on tehtävä niille kudoksille ja elimille, joissa on näkynyt muutoksia käsitellyissä ryhmissä.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Tutkimuksessa on ilmoitettava yksilökohtaiset tulokset. Tulokset on lisäksi esitettävä taulukoituina, ja niistä on käytävä ilmi seuraavat tiedot: kuhunkin ryhmään kuuluvien eläinten lukumäärä testin alussa; testin aikana kuolleena löydettyjen tai inhimillisistä syistä tapettujen eläinten lukumäärä ja kuoleman tai tappamisen ajankohta; niiden eläinten lukumäärä, joissa näkyy myrkyvaikutuksia; havaittujen myrkyvaikutusten kuvaus, mukaan luettuina myrkytysoireiden alku, kesto ja vakavuus; niiden eläinten lukumäärä, joissa havaitaan leesioita; leesioiden tyyppi ja kunkin tyyppin leesioista kärsivien eläinten prosenttiosuus.

Kun on numeerisia tuloksia, ne on arvioitava asianmukaisella ja yleisesti hyväksytyllä tilastomenetelmällä. Tilastomenetelmät ja analysoitavat määritystulokset on valittava tutkimusta suunniteltaessa.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

- fysikaalinen olomuoto, puhtaus ja fysikokemialliset ominaisuudet
- tunnistetiedot
- kantaja-aine (tarvittaessa): jos kantaja-aine on muu kuin vesi, sen valinta on perusteltava.

2.2.2 **Koe-eläinlajit:**

- käytetty eläinlaji ja kanta
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli
- toimittaja, häkit, ravinto jne
- kunkin eläimen paino testin alkaessa.

2.2.3 **Koelosuhteet:**

- annostasojen valintaperusteet
- yksityiskohtaiset tiedot testiainevalmisteesta/ravintovalmisteesta, pitoisuus, stabiilisuus ja tasalaatuisuus valmisteesta
- yksityiskohtaiset tiedot testiaineen antotavasta
- todellinen annos (mg/painokilo/vrk) ja muuntokerroin ravintoon/juomaveteen sekoitetun testiaineen pitoisuudelle (ppm) tarvittaessa
- yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta.

2.2.4

Tulokset:

- eläimen paino ja painon muutokset
- ravinnon nauttiminen ja veden nauttiminen tarvittaessa
- myrkkyyvaste sukupuolittain ja annostasoittain, mukaan luettuina myrkkyyvaikutuksen merkit
- kliinisten havaintojen laatu, vakavuus ja kesto (sekä palautuvat vaikutukset että muut)
- silmätutkimukset
- hematologiset testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot
- kliinisen biokemian testit ja kyseisiä testejä koskevat perustasot
- eläimen paino testin lopussa, elinten painot sekä elinten ja eläinten painosuhteet
- ruumiinavauslöydökset
- yksityiskohtainen kuvaus kaikista histopatologisista löydöksistä
- imeytymistiedot, jos saatavilla
- tulosten tilastollinen käsittely tarvittaessa.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

B.37 ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS AKUUTIN ALTISTUKSEN JÄLKEEN

1. MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Aineiden toksisten vaikutusten arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon mahdollisuus, että tietyt aineluokat voivat aiheuttaa erityistä neurotoksisuutta, jota ei ehkä todeta muissa toksisuuskokeissa. Tiettyjen organofosfaattien on havaittu aiheuttavan viivästynyttä neurotoksisuutta ja niitä tulisi pitää mahdollisina tutkimuskohteina. Viivästynyttä polyneuropatiaa aiheuttavat aineet voidaan tunnistaa in vitro -seulontatesteillä. Negatiiviset tulokset näistä tutkimuksista eivät kuitenkaan todista, ettei testiaine ole neurotoksinen.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 Määritelmät

Organofosfaatteja ovat varauksettomat organofosfaattiesterit, tioesterit tai organofosfori-, organofosfoni- tai organofosforamidihappoanhydridit tai samantyyppisten fosforotioidi-, fosfonotioidi- tai fosforioamidihappoanhydridit tai muut tässä aineluokassa joskus tavattavat aineet, jotka voivat aiheuttaa viivästynyttä neurotoksisuutta.

Viivästynyt neurotoksisuus on oireryhmä, johon liittyy ataksian, selkäytimen ja ääreishermon distaalisten aksonopatioiden pitkittynyt viivästynyt ilmeneminen ja neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto ja vanheneminen hermokudoksessa.

1.3 Vertailuaineet

Vertailuainetta voidaan testata positiivisella verrokkiryhmällä sen osoittamiseksi, ettei testatun lajin vaste muutu laboratoriokoeolosuhteissa merkitsevästi.

Yksi esimerkki laajalti käytetystä neurotoksisesta aineesta on tri-o-tolyylifosfaatti (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS-nimistö: fosforihappo, tris(2-metyylifenyli)esteri), tunnettu myös nimellä tris-o-kresyylifosfaatti.

1.4 Koemenetelmän periaate

Testiaine annostellaan kerta-annoksena suun kautta kanoille, joita on suojeltu akuuteilta kolinergisiltä vaikutuksilta silloin kun se on ollut tarkoituksenmukaista. Eläimiä havainnoidaan 21 päivän ajan käyttäytymispoikkeavuuksien, ataksian ja paralyysin suhteen. Kustakin ryhmästä satunnaisesti valituille kanoille tehdään biokemialliset määrytykset, erityisesti neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto, yleensä 24 ja 48 tunnin kuluttua annostelusta. Kahdenkymmenen päivän kuluttua altistuksesta loput kanat lopetetaan ja valitut hermokudokset tutkitaan histopatologisesti.

1.5 Koemenetelmän kuvaus

1.5.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset kanat, joilla ei ole häiritseviä virussairauksia, lääkitystä eikä käynnin poikkeavuuksia, jaetaan satunnaisotannalla koe- ja verrokkiryhmiin ja niitä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen alkua.

Kokeessa käytettävien testihäkkien on oltava tarpeeksi tilavia, jotta kanat voivat liikkua vapaasti ja käynnin havainnointi käy helposti.

Testiainetta pitäisi yleensä annostella suun kautta mahaletkun avulla, liivatekapseleina tai vastaavalla menetelmällä. Nesteet voidaan antaa laimentamattomina tai liuotettuna sopivaan vehikkeliin, kuten maissiöljyyn. Kiinteät aineet tulee mahdollisuuksien mukaan liuottaa, koska suuret määrät kiinteää ainetta liivatekapseleissa eivät välttämättä imeydy tehokkaasti. Muiden kuin vesipitoisten vehikkeliin toksiset ominaisuudet on oltava tiedossa ja jos ne eivät ole, on ne määritettävä ennen koetta.

1.5.2 Koeolosuhteet

1.5.2.1 Koe-eläimet

Kokeessa suositellaan käytettäväksi nuoria täysikasvuisia kanoja (*Gallus gallus domesticus*), jotka ovat iältään 8-12 kuukautta. Kanojen tulee olla normaalikokoisia, -lajisia ja -kantaisia ja mieluiten kasvatettu oloissa, joissa ne ovat voineet liikkua vapaasti.

1.5.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kokeessa tulee käyttää koeryhmän lisäksi yhtä vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää ja yhtä positiivista verrokkiryhmää. Vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää tulee käsitellä täsmälleen samoin kuin koeryhmää testiaineen annostelua lukuun ottamatta.

Kussakin ryhmässä tulee olla riittävä määrä lintuja, jotta vähintään kuusi lintua voidaan lopettaa biokemiallisia määrytyksiä varten (kolme kanaa kahtena eri ajankohtana) ja kuusi lintua säilyy hengissä 21 päivän havaintojakson ajan patologisia tutkimuksia varten.

Positiivista verrokkiryhmää voidaan tutkia samanaikaisesti tai se voi olla tuore historiallinen verrokkiryhmä. Siinä on oltava vähintään kuusi kanaa, joita on käsitelty tunnetulla viivästynyttä neurotoksisuutta aiheuttavalla aineella. Näistä kuudesta kanasta kolmelle tehdään biokemialliset määrytykset ja kolmelle patologiset tutkimukset. Historiallisten tietojen ajoittaista päivitystä suositellaan. Uusia positiivisia kontrollitietoja pitäisi kehittää, kun kokeen suorittava laboratorio muuttaa joitakin olennaisia seikkoja koekäytännössä (esim. kanta, ravinto, elinolosuhteet).

1.5.2.3 Annostasot

Päätutkimuksessa käytettävä annostasot on määritettävä alustavassa tutkimuksessa, johon sisältyy tarkoituksenmukainen määrä kanoja ja annostasoryhmiä.

Jonkinasteinen letaliteetti alustavassa tutkimuksessa on tyypillisesti välttämätöntä riittävän annoksen määrittämiseksi päätutkimusta varten. Akuuttien kolinergisten vaikutusten aiheuttaman kuoleman estämiseksi voidaan kanoille antaa atropiinia tai muuta suoja-ainetta, joka ei tiettävästi vaikuta viivästyneisiin neurotoksiin vasteisiin. Testiaineiden ei-letaali enimmäisannos voidaan määrittää erilaisilla koemenetelmillä (ks. menetelmä B.1 bis). Kanoja koskevat historialliset tiedot tai muut toksikologiset tiedot voivat helpottaa annosten valintaa.

Päätutkimuksen testiaineen annostason tulee olla mahdollisimman korkea ottaen huomioon alustavan annosvalintatutkimuksen tulokset ja 2 000 mg/kg:n yläraja-annos. Mahdollisesti ilmenevä kuolleisuus ei saisi olla niin laajaa, etteikö riittävä määrä eläimiä säilyisi hengissä 21. päivänä tehtäviä biokemiallisia (kuusi eläintä) ja histologisia (kuusi eläintä) tutkimuksia varten. Atropiinia tai muuta suoja-ainetta, jotka eivät tiettävästi vaikuta viivästyneisiin neurotoksiin vasteisiin, tulisi käyttää akuuteista kolinergisistä vaikutuksista johtuvien kuolemien estämiseksi.

1.5.2.4 Raja-annoskoe

Jos kokeessa ei vähintään 2 000 mg/kg/vrk:n annostasolla tässä tutkimuksessa kuvatuilla toimenpiteillä todeta havaittavia toksisia vaikutuksia ja jos toksisuutta ei ole odotettavissa rakenteellisesti samantyyppisistä aineista olevien tietojen perusteella, tutkimusta suuremmalla annoksella ei pidetä tarpeellisenä. Raja-annoskoe voidaan tehdä paitsi silloin kun odotettavissa oleva altistus ihmisellä viittaa tarpeeseen käyttää korkeampaa annostasoa.

1.5.2.5 Havainnointijakso

Havainnointijakso kestää 21 päivää.

1.5.3 Kokeen suorittaminen

Kun eläimille on annettu suoja-ainetta akuutista kolinergisestä vaikutuksesta johtuvan kuoleman estämiseksi, annostellaan testiaine kerta-annoksena.

1.5.3.1 Yleishavainnot

Havainnoinnin tulee alkaa heti käsittelyn alettua. Kaikkia kanoja tulee havainnoida tarkoin useita kertoja kahden ensimmäisen päivän aikana ja sen jälkeen vähintään kerran päivässä 21 päivän ajan tai siihen asti kunnes eläin aiotaan lopettaa. Kaikki toksisuusoireet tulee kirjata muistiin, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, tyyppi, voimakkuus ja kesto. Ataksia tulee mitata vähintään neliportaisella ordinaaliasteikolla, ja paralyysi tulee kirjata muistiin. Patologisia tutkimuksia varten valitut kanat on päästettävä häkistä vähintään kahdesti viikossa ja pakotettava joksikin aikaa liikkumaan, kuten kiipeämään tikkaita, vähäisten toksisten vaikutusten havainnoinnin helpottamiseksi. Kuolemaisillaan olevat ja voimakasta kärsimystä tai kipua osoittavat eläimet tulee poistaa heti kun niiden tila huomataan ja lopettaa humanilla tavalla ja niille tulee tehdä ruumiinavaus.

1.5.3.2 Ruumiinpaino

Kaikki kanat on punnittava juuri ennen testiaineen annostelua ja vähintään kerran viikossa sen jälkeen.

1.5.3.3 Biokemia

Kuusi satunnaisesti kustakin käsittelyä saavasta koeryhmästä ja vehikkeliä saavasta verrokkiryhmästä valittua kanaa sekä kolme kanaa positiivisesta verrokkiryhmästä (silloin kun tätä ryhmää tutkitaan samanaikaisesti) lopetetaan muutaman päivän kuluttua annostelusta ja niiden aivoista ja lannerangasta tehtyjä preparaatteja arvioidaan neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen osalta. Lisäksi voi olla hyödyllistä tehdä preparaatti lonkkahermokudoksesta neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen arvioimiseksi. Yleensä kolme lintua sekä verrokki-että kustakin koeryhmästä lopetetaan 24 tunnin kuluttua ja toiset kolme 48 tunnin kuluttua annostelusta. Positiivisesta kontrolliryhmästä sen sijaan lopetetaan kolme kanaa 24 tunnin kuluttua annostelusta. Jos havainnot myrkytyksen kliinisistä oireista (tämä voidaan usein arvioida havainnoimalla kolinergisten merkkien alkamisajankohtaa) viittaavat toksisen aineen erittäin hitaaseen eliminaatioon, voi olla suositeltavaa ottaa kudospäyte kolmesta linnusta kahtena eri ajankohtana 24-72 tunnin sisällä annostelusta.

Näille näytteille voidaan tehdä myös asetyylikoliiniesteraasi (AChE)-analyysit, jos se katsotaan tarkoituksenmukaiseksi. AChE voi kuitenkin reaktivoitua spontaanisti in vivo ja johtaa aineen voimakkuuden aliarviointiin AChE:n estäjänä.

1.5.3.4 Silmämääräinen ruumiinavaus

Jokaisen eläimen (sekä lopetettavaksi suunniteltujen ja kuolemaisillaan olevien) silmämääräiseen ruumiinavaukseen tulee sisältyä aivojen ja selkäytimen ulkonäön havainnointi.

1.5.3.5 Histopatologinen tutkimus

Havainnontijaksosta hengissä säilyneiden ja biokemiallisissa tutkimuksissa käyttämättömien eläinten hermokudos tutkitaan mikroskooppisesti. Kudokset on kiinnitettävä perusfuusiotekniikoilla in situ. Sektiot tulee ottaa pikkuaivoista (keskellä kulkeva pitkittäistaso), ydinjatkeesta, selkäytimestä ja ääreishermosta.

Selkäydinsektiot tulee ottaa kaularangan yläosasta, rintarangan keskiosasta ja lannerstirangan alueelta. Säärihermon distaalialueelta ja sen kaksoiskantalihasta (m. gastrocnemicus) huoltavista haaroista ja lonkkahermosta otetaan näyte. Sektiot värjätään sopivalla myeliini- ja aksonispesifisillä aineilla.

2. TULOKSET

Negatiiviset tulokset tässä menetelmässä valituilla kohdevaikutuksilla (biokemia, histopatologia ja käyttäytymisen havainnointi) eivät normaalisti vaadi viivästyneen neurotoksisuuden lisättestausta. Kohdevaikutuksia koskevat epävarmat tai

keskeneräiset tulokset voivat vaatia lisätutkimuksia.

Yksilötiedot on esitettävä. Ne on myös esitettävä yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi eläinten lukumäärä koeryhmittäin testin alussa, leesioita, käyttäytymis- tai biokemiallisia vaikutuksia osoittaneiden eläinten lukumäärä, leesio- tai vaikutustyyppit ja niiden vaikeusaste sekä eläinten prosentuaaliset määrät kutakin erityyppistä ja vaikeusasteeltaan erilaisia leesioita tai vaikutusta kohti.

Tämän tutkimuksen tuloksia tulee arvioida käyttäytymis-, biokemiallisten ja histopatologisten vaikutusten esiintyvyyden, vaikeusasteen ja korrelaation perusteella ja kussakin koe- ja verrokkiryhmässä havaittujen muiden vaikutusten suhteen. Numeerisia tuloksia tulee arvioida tarkoituksenmukaisiin ja yleisesti hyväksytyin tilastollisin menetelmin. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. RAPORTOINTI

Testiraportti

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

- käytetty kanta
- eläinten lukumäärä ja ikä
- lähde, elinolosuhteet, jne. ja
- kunkin eläimen paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

- selostus testiaineen valmistamisesta, säilyvyydestä ja homogeenisuudesta, silloin kun se on tarkoituksenmukaista
- vehikkelin valintaperusteet
- selonteko testiaineen annostelusta
- selonteko ravinnon ja veden laadusta
- annosvalintojen perustelu
- annosteltujen annosten erittely, mukaan lukien selonteko vehikkelistä ja annostellun aineen määrästä ja fyysisestä muodosta ja
- mahdollisen suoja-aineen identifiointi ja selonteko sen annostelusta.

Tulokset:

- ruumiinpaino
- toksinen vaste annostasoin, mukaan lukien kuolleisuus
- kliinisten havaintojen luonne, voimakkuus ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)
- biokemiallisten menetelmien ja löydösten yksityiskohtainen kuvaus
- ruumiinavauslöydökset
- kaikkien histopatologisten löydösten yksityiskohtainen kuvaus ja
- tulosten tilastollinen käsittely silloin kun se on tarkoituksenmukaista.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. LÄHDELUETTELO

Tämä menetelmä on analoginen OECD TG 418:n kanssa.

B.38 ORGANOFOSFAATTIEN AIHEUTTAMA VIIVÄSTYNYT NEUROTOKSISUUS 28 PÄIVÄN TOISTUVAN ANNOSTELUN TUTKIMUKSESSA

1. MENETELMÄ

1.1 Johdanto

Aineiden toksisten vaikutusten arvioinnissa on tärkeää ottaa huomioon mahdollisuus, että tietyt aineluokat voivat aiheuttaa erityistä neurotoksisuutta, jota ei ehkä todeta muissa toksisuuskokeissa. Tiettyjen organofosfaattien on havaittu aiheuttavan viivästynyttä neurotoksisuutta ja niitä tulisi pitää mahdollisina tutkimuskohteina.

Viivästynyttä polyneuropatiaa aiheuttavat aineet voidaan tunnistaa in vitro -seulontatesteillä. Negatiiviset tulokset näistä tutkimuksista eivät kuitenkaan todista, ettei testiaine ole neurotoksinen.

Tästä 28 päivää kestävästä viivästynyttä neurotoksisuutta koskevasta kokeesta saadaan tietoa mahdollisista terveyshaitoista, joita toistuvat altistukset rajoitetun aikajakson sisällä todennäköisesti aiheuttavat. Kokeesta saadaan tietoa annosvasteesta ja sen avulla voidaan arvioida haitatonta vaikutustasoa (NOAEL), mistä voi olla hyötyä altistuksen turvallisuusperusteiden määrittelyssä.

Ks. myös yleisjohdanto, osa B.

1.2 Määritelmät

Organofosfaatteja ovat varauksettomat organofosfaattierit, tioesterit tai organofosfori-, organofosfoni- tai organofosforamidihapponanhydridit tai samantyyppisten fosfortioidi-, fosfonotioidi- tai fosfortioamidihapponanhydridit tai muut tässä aineluokassa joskus tavattavat aineet, jotka voivat aiheuttaa viivästynyttä neurotoksisuutta.

Viivästynyt neurotoksisuus on oireyhtymä, johon liittyy ataksian, selkäytimen ja ääreishermon distaalisten aksonopatioiden pitkittynyt viivästynyt ilmeneminen ja neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto ja vanheneminen hermokudoksessa.

1.3 Koemenetelmän periaate

Testiainetta annostellaan kanoille päivittäin suun kautta 28 päivän ajan. Eläimiä havainnoidaan vähintään kerran päivässä käyttäytymispoikkeavuuksien, ataksian ja paralyysin suhteen 14 päivän ajan viimeisestä annoksesta laskettuna. Kustakin ryhmästä satunnaisesti valituille kanoille tehdään biokemialliset määritykset, erityisesti neuropatian kohde-esteraasin (NTE) esto, yleensä 24 ja 48 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta. Kaksi viikkoa viimeisen annoksen jälkeen loput kanat lopetetaan ja valitut hermokudokset tutkitaan histopatologisesti.

1.4 Koemenetelmän kuvaus

1.4.1 Valmistelut

Terveet nuoret täysikasvuiset kanat, joilla ei ole häiritseviä virussairauksia, lääkitystä eikä käynnin poikkeavuuksia, jaetaan satunnaisotannalla koe- ja verrokkiryhmiin ja niitä totutetaan laboratorio-olosuhteisiin vähintään viiden päivän ajan ennen tutkimuksen alkua.

Kokeessa käytettävien testihäkkien on oltava tarpeeksi tilavia, jotta kanat voivat liikkua vapaasti ja käynnin havainnointi käy helposti.

Testiainetta annostellaan päivittäin seitsemänä päivänä viikossa mieluiten mahaletkun kautta tai liivatekapseleina. Nesteet voidaan antaa laimentamattomina tai liuotettuna sopivaan vehikkeliin, kuten maissiöljyyn. Kiinteät aineet tulee mahdollisuuksien mukaan liuottaa, koska suuret määrät kiinteää ainetta liivatekapseleissa eivät välttämättä imeydy tehokkaasti. Muiden kuin vesipitoisten vehikkeliin toksiset ominaisuudet on oltava tiedossa ja jos ne eivät ole, on ne määritettävä ennen koetta.

1.4.2 Koeolosuhteet

1.4.2.1 Koe-eläimet

Kokeessa suositellaan käytettäväksi nuoria täysikasvuisia kanoja (*Gallus gallus domesticus*), jotka ovat iältään 8-12 kuukautta. Kanojen tulee olla normaalikokoisia, -lajisia ja -kantaisia ja mieluiten kasvatettu oloissa, joissa ne ovat voineet liikkua vapaasti.

1.4.2.2 Lukumäärä ja sukupuoli

Kokeessa tulee yleensä käyttää vähintään kolmea koeryhmää ja yhtä vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää. Vehikkeliä saavaa verrokkiryhmää tulee käsitellä täsmälleen samoin kuin koeryhmää lukuun ottamatta testiaineen annostelua.

Kussakin ryhmässä tulee olla riittävä määrä lintuja, jotta vähintään kuusi lintua voidaan lopettaa biokemiallisia määrittämyksiä varten (kolme kanaa kahtena eri ajankohtana) ja kuusi lintua säilyy hengissä 14 päivän havaintojakson ajan patologiaa varten.

1.4.2.3 Annostasot

Annostasojen valinnassa tulee ottaa huomioon viivästynyttä neurotoksisuutta koskevan akuutin testin tulokset ja kaikki muut testiyhdisteistä saatavilla olevat toksisuus- tai kinetiikkatiedot.

Korkein annostaso tulee valita siten, että se aiheuttaa toksisia vaikutuksia, mieluiten viivästynyttä neurotoksisuutta, mutta ei kuolemaa eikä ilmeistä kärsimystä. Tämän jälkeen annostasot valitaan asteittain alenevasti mahdollisen annosvasteen ja haitattoman vaikutustason (NOAEL) osoittamiseksi alhaisimmalla annostasolla.

1.4.2.4 Raja-annoskoe

Jos kokeessa ei vähintään 1 000 mg/kg/vrk:n annostasolla tässä tutkimuksessa kuvatuilla toimenpiteillä todeta havaittavia toksisia vaikutuksia ja jos toksisuutta ei ole odotettavissa rakenteellisesti samantyyppisistä aineista olevien tietojen perusteella, tutkimusta suuremmalla annoksella ei pidetä tarpeellisena. Raja-annoskoe voidaan tehdä paitsi silloin kun odotettavissa oleva altistus ihmisellä viittaa tarpeeseen käyttää korkeampaa annostaso.

1.4.2.5 Havainnointijakso

Kaikkia eläimiä tulee havainnoida vähintään kerran päivässä altistusaikana ja 14 päivän ajan sen jälkeen, lukuun ottamatta eläimiä, joille aiotaan tehdä ruumiinavaus.

1.4.3 Kokeen suorittaminen

Eläimille annetaan testiainetta seitsemänä päivänä viikossa 28 päivän ajan.

1.4.3.1 Yleishavainnot

Havainnoinnin tulee alkaa heti käsittelyn alettua. Kaikkia kanoja tulee havainnoida tarkoin vähintään kerran päivässä kunakin 28 käsittelypäivänä ja 14 päivän ajan annostelun päätyttyä tai siihen asti kunnes eläin aiotaan lopettaa. Kaikki toksisuusoireet tulee kirjata muistiin, mukaan lukien niiden alkamisajankohta, tyyppi, voimakkuus ja kesto. Havaintoihin tulee sisältyä muun muassa käyttäytymispoikkeavuudet. Ataksia tulee mitata vähintään neliportaisella ordinaaliasteikolla ja paralyysi tulee kirjata muistiin. Kanat on päästettävä häkistä vähintään kahdesti viikossa ja pakotettava joksikin aikaa liikkumaan, kuten kiipeämään tikkaita, vähäisten toksisten vaikutusten havainnoinnin helpottamiseksi. Kuolemaisillaan olevat ja voimakasta kärsimystä tai kipua osoittavat eläimet tulee poistaa heti kun niiden tila huomataan ja lopettaa humanilla tavalla ja niille tulee tehdä ruumiinavaus.

1.4.3.2 Ruumiinpaino

Kaikki kanat on punnittava juuri ennen testiaineen ensimmäistä annostelua ja vähintään kerran viikossa sen jälkeen.

1.4.3.3 Biokemia

Kuusi satunnaisesti kustakin käsittelyä saavasta koeryhmästä ja vehikkeliä saavasta verrokkiryhmästä valittua kanaa lopetetaan muutaman päivän kuluttua viimeisen annoksen antamisesta ja niiden aivoista ja lannerangasta tehtyjä preparaatteja arvioidaan neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen osalta. Lisäksi voi olla hyödyllistä tehdä preparaatti lonkkahermokudoksesta neuropatian kohde-esteraasin (NTE) estovaikutuksen arvioimiseksi. Tavallisesti kolme lintua sekä verrokki- että kustakin koeryhmästä lopetetaan 24 tunnin kuluttua ja toiset kolme 48 tunnin kuluttua viimeisestä annoksesta laskettuna. Jos tiedot akuutista tutkimuksesta tai muista tutkimuksista (esim. toksikokinetiikka) viittaavat siihen, että eläimet tulisi mieluiten lopettaa joinakin muina ajankohtina viimeisen annostelun jälkeen, tulisi näitä aikoja noudattaa ja perustelut dokumentoida.

Näille näytteille voidaan tehdä myös asetyylikoliiniesteraasi (AChE)-analyysit, jos se katsotaan tarkoituksenmukaiseksi. AChE voi kuitenkin reaktivoitua spontaanisti in vivo ja johtaa aineen

voimakkuuden aliarviointiin AChE:n estäjänä.

1.4.3.4 Silmämääräinen ruumiinavaus

Jokaisen eläimen (sekä lopetettavaksi suunniteltujen ja kuolemaisillaan olevien) silmämääräiseen ruumiinavaukseen tulee sisältyä aivojen ja selkäytimen ulkonäön havainnointi.

1.4.3.5 Histopatologinen tutkimus

Havainnointijaksosta hengissä säilyneiden ja biokemiallisissa tutkimuksessa käyttämättömien eläinten hermokudos tutkitaan mikroskooppisesti. Kudokset on kiinnitettävä perfuusiotekniikoilla in situ. Sektiot tulee ottaa pikkuaivoista (keskellä kulkeva pitkittäistaso), ydinjatkeesta, selkäytimestä ja ääreishermoista. Selkäydinsektiot tulee ottaa kaularangan yläosasta, rintarangan keskiosasta ja lanneristirangan alueelta. Säärihermon distaalialueelta ja sen kaksoiskantalihasta (m. gastrocnemicus) huoltavista haaroista ja lonkkahermosta otetaan näyte. Sektiot värjätään sopivilla myeliini- ja aksonispesifisillä aineilla. Ensin tehdään mikroskooppitutkimukset verrokki- ja suuriannoksen ryhmän eläinten säilytetyille kudoksille. Kun vaikutuksista suuriannoksiessa ryhmässä on näyttöä, tehdään mikroskooppitutkimukset myös keskisuurten ja pienen annoksen ryhmissä.

2. TULOKSET

Negatiiviset tulokset tässä menetelmässä valituilla kohdevaikutuksilla (biokemia, histopatologia ja käyttäytymisen havainnointi) eivät normaalisti vaadi viivästyneen neurotoksisuuden lisätestausta. Kohdevaikutuksia koskevat epävarmat tai keskeneräiset tulokset voivat vaatia lisätutkimuksia.

Yksilötiedot on esitettävä. Ne on myös esitettävä yhteenvetona taulukossa, josta käy ilmi eläinten lukumäärä koeryhmittäin testin alussa, leesioita, käyttäytymis- tai biokemiallisia vaikutuksia osoittaneiden eläinten lukumäärä, leesio- tai vaikutustyyppit ja niiden vaikeusaste sekä eläinten prosentuaaliset määrät kutakin erityyppistä ja vaikeusasteeltaan erilaista leesiota tai vaikutusta kohti.

Tämän tutkimuksen tuloksia tulee arvioida käyttäytymis-, biokemiallisten ja histopatologisten vaikutusten esiintyvyyden, vaikeusasteen ja korrelaation perusteella ja kussakin koe- ja verrokkiryhmässä havaittujen muiden vaikutusten suhteen.

Numeerisia tuloksia tulee arvioida tarkoituksenmukaisin ja yleisesti hyväksytyin tilastollisin menetelmin. Tilastolliset menetelmät tulee valita tutkimuksen suunnitteluvaiheessa.

3. RAPORTOINTI

Testiraportti

Testiraportin tulee mahdollisuuksien mukaan sisältää seuraavat tiedot:

Koe-eläimet:

- käytetty kanta
- eläinten lukumäärä ja ikä
- lähde, elinolosuhteet, jne. ja
- kunkin eläimen paino testin alussa.

Koeolosuhteet:

- selostus testiaineen valmistamisesta, säilyvyydestä ja homogeenisuudesta, silloin kuin se on tarkoituksenmukaista
- vehikkelin valintaperusteet
- selonteko testiaineen annostelusta
- selonteko ravinnon ja veden laadusta
- annosvalintojen perustelut
- annosteltujen annosten erittely, mukaan lukien selonteko vehikkelistä ja annostellun aineen määrästä ja fyysisestä muodosta ja
- perustelut biokemiallisten määritysten ajankohtien muuttamisesta muuksi kuin 24 ja 48 tuntia viimeisestä annostelusta.

Tulokset:

- ruumiinpaino

- toksinen vaste annostasoin, mukaan lukien kuolleisuus
- haitaton vaikutustaso (NOAEL)
- kliinisten havaintojen luonne, voimakkuus ja kesto (korjaantuvuudesta riippumatta)
- biokemiallisten menetelmien ja löydösten yksityiskohtainen kuvaus
- ruumiinavauslöydökset
- kaikkien histopatologisten löydösten yksityiskohtainen kuvaus ja
- tulosten tilastollinen käsittely silloin kun se on tarkoituksenmukaista.

Tulosten pohdinta

Johtopäätökset

4. LÄHDELUETTELO

Tämä menetelmä on analoginen OECD RG 419:n kanssa

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on sama kuin OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1 JOHDANTO

Nisäkkäiden maksasoluilla *in vivo* tehtävän UDS-testin (Unscheduled DNA Synthesis (UDS) test) tarkoituksena on tunnistaa tutkittavat aineet, jotka aiheuttavat DNA:n korjautumista altistettujen eläinten maksasoluissa (ks. 1,2,3,4).

Tällä *in vivo* testillä voidaan tutkia kemiallisten aineiden genotoksisia vaikutuksia maksassa. Mitattava tulostapahtuma ilmaisee DNA-vaurion ja sen myöhemmän korjautumisen maksasoluissa. Elimistöön imeytyvät kemialliset aineet metaboloituvat yleensä pääasiassa maksassa. Se soveltuu siten hyvin DNA-vaurioiden mittaamiseen *in vivo*.

Jos on saatu viitteitä siitä, että tutkittava aine ei pääse kohdekudokseen, tätä testiä ei pidä käyttää.

Lopputapahtuma, S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA-synthesis), mitataan määrittämällä radioaktiivisesti merkittyjen nukleosidien inkorporoitumista DNA:han solunjakautumissyklin S-vaiheen ulkopuolella. Yleisimmin käytetty menetelmä on tritiumilla merkityn tymidiinin (³H-TdR) inkorporoitumisen määrittäminen autoradiografisesti. *In vivo* UDS-testeissä käytetään pääasiassa rotan maksaa. Myös muita kudoksia kuin maksaa voidaan käyttää, mutta niitä ei kuvata tämän menetelmän yhteydessä.

UDS-vasteen toteaminen riippuu irtileikkautuneiden ja korvautuneiden DNA-segmenttien lukumäärästä vauriokohdassa. UDS-testi on sen vuoksi erityisen arvokas kemiallisten aineiden aiheuttamien ”pitkien DNA-pätkien korjautumisten” (”longpatch repair”) (20-30 emästä) toteamisessa. Testin herkkyys on sen sijaan huomattavasti heikompi ”lyhyiden pätkien korjautumisen” (”shortpatch repair”) (1-3 emästä) toteamisessa. Mutageenisia muutoksia saattaa lisäksi syntyä DNA-vaurioiden korjautumattomuuden, korjautumisvirheiden tai kahdentumisvirheiden seurauksena. UDS-vasteen laajuus ei anna viitteitä korjausprosessien luotettavuudesta. On myös mahdollista, että mutageeni reagoi DNA:n kanssa mutta DNA-vaurio ei korjaudu leikkautumis-korjautumisprosessin kautta. Koska tämä lopputapahtuma mitataan koko genomista, sen potentiaalinen herkkyys kompensoi sitä, ettei UDS-testi tuota spesifistä tietoa tutkittavan aineen mutageenisesta aktiivisuudesta.

Ks. myös Yleisjohdanto, osa B.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Korjautuvat solut: jyvästen nettomäärä tumissa eli NNG-arvo on suurempi kuin etukäteen asetettu arvo, joka on määriteltävä testin suorittavassa laboratoriossa.

NNG-arvo (net nuclear grains): solujen UDS-aktiivisuuden kvantitatiivinen mitta autoradiografialla tehdyissä UDS-testeissä laskettuna siten, että sytoplasmisten jyvästen keskimääräinen lukumäärä tumaa vastaavilla sytoplasma-alueilla (CG) vähennetään tumissa havaittavien jyvästen (NG) lukumäärästä (NG): $NNG = NG - CG$. NNG-määrät lasketaan yksittäisistä soluista, minkä jälkeen luvut yhdistetään saman viljelmän solujen osalta, rinnakkaisviljelmien solujen osalta jne.

UDS (Unscheduled DNA Synthesis): DNA:n korjautumissynteesi sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista.

1.3 TESTIN PERIAATE

UDS-testi nisäkkään maksasoluilla *in vivo* osoittaa DNA korjautumissynteesin sen jälkeen, kun kemiallisten aineiden tai fysikaalisten tekijöiden aiheuttaman vaurion alueen sisältävä DNA-jakso on leikkautunut irti ja poistunut kromosomista. Testi perustuu yleensä ³H-TdR:n inkorporoitumiseen solujen DNA:han maksassa, jossa on yleensä vain vähän solusyklin S-vaiheessa olevia soluja. ³H-TdR:n inkorporoituminen määritetään yleensä autoradiografisesti, sillä tämä tekniikka ei ole herkkä S-vaiheessa oleville soluille kuten esimerkiksi nestetuikelaskenta.

1.4 TESTIN KUVAUS

1.4.1 Testin valmistelut

1.4.1.1 *Eläinlajin valinta*

Yleisesti käytetty eläinlaji on rotta, mutta myös muita soveltuvia nisäkäslajeja voidaan käyttää. Koe-eläinten on oltava yleisesti käytettyä laboratorioskantaa olevia nuoria terveitä täysikasvuisia eläimiä. Testin alkaessa eläinten painon vaihtelun on oltava minimaalista, enintään $\pm 20\%$ kummankin sukupuolen keskipainosta.

1.4.1.2 *Asuinolot ja ruokinta*

Yleiset olosuhteet ovat samat kuin osan B Yleisjohdannossa, mutta kosteustavoitteen on oltava 50-60 %.

1.4.1.3 *Eläinten valmistelu*

Terveet nuoret täysikasvuiset eläimet jaetaan satunnaistetusti koe- ja kontrolliryhmiin. Häkit on sijoitettava siten, että häkin sijainnista johtuvat vaikutukset ovat mahdollisimman vähäisiä. Eläimet tunnistetaan yksilöllisesti ja pidetään häkeissään vähintään viisi päivää ennen tutkimuksen aloittamista, jotta ne ehtivät sopeutua laboratorio-olosuhteisiin.

1.4.1.4 *Tutkittava aine/valmistelu*

Kiinteät tutkittavat aineet liuotetaan tai sekoitetaan sopiviin liuottimiin tai kantaja-aineisiin ja laimennetaan tarvittaessa ennen kuin ne annetaan koe-eläimille. Nestemäiset tutkittavat aineet voidaan antaa suoraan tai laimentaa ennen antamista. Tutkittava aine on valmistettava juuri ennen annostelua, paitsi jos sen säilyvyys on osoitettu stabiliteettitesteillä.

1.4.2 **Koelosuhteet**

1.4.2.1 *Liuotin/kantaja-aine*

Liuottimella/kantaja-aineella ei saa olla myrkyvaikutuksia käytetyillä annostasoilla, eikä sen käyttöön saa liittyä epäilyjä mahdollisista kemiallisista reaktioista tutkittavan aineen kanssa. Jos käytetään muita kuin hyvin tunnettuja liuottimia/kantaja-aineita, niiden käyttö on perusteltava niiden yhteensopivuuden osoittavilla tutkimustuloksilla. Ensisijaisesti on harkittava vesipitoisen liuottimen/kantaja-aineen käyttöä, mikäli mahdollista.

1.4.2.2 *Kontrollit*

Jokaiseen itsenäisesti suoritettavaan testin osaan on otettava mukaan rinnakkaiset positiiviset ja negatiiviset (liuotin/kantaja-aine) kontrollit. Kontrolliryhmän eläimiä on käsiteltävä samalla tavoin kuin koeryhmän eläimiä, mutta niille ei anneta tutkittavaa ainetta.

Positiivisten kontrolliaineiden on oltava aineita, joiden tiedetään aiheuttavan UDS-reaktion, kun niitä annetaan pitoisuuksina, joiden odotetaan aiheuttavan havaittavaa lisääntymistä taustaan verrattuna. Metabolista aktivaatiota vaativia positiivisia kontrolliaineita on käytettävä annoksina, jotka aiheuttavat kohtalaisen vasteen (4). Annokset on valittava siten, että vaikutukset ovat selvät mutta eivät heti paljasta lukijalle koodattujen objektilasien identiteettiä. Esimerkkejä positiivisista kontrolliaineista:

Näytteidenottoajat	Aine	CAS No.	EINECS No.
Varhaiset näytteidenottoajat (2-4 tuntia)	N-nitrosodimetyyliamiini	62-75-9	200-249-8
Myöhäiset näytteidenottoajat sampling times (12-16 hours)	N-2-fluorenyyliasetamidi (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Myös muita sopivia positiivisia kontrolliaineita voidaan käyttää. Positiiviset kontrolliaineet voidaan antaa myös muuta reittiä pitkin kuin testattava aine.

1.5 TESTIN SUORITTAMINEN

1.5.1 **Eläinten lukumäärä ja sukupuoli**

Koe-eläinten määrän on oltava riittävä testivasteen luonnollinen biologinen vaihtelu huomioon ottaen. Analysoitavissa olevia eläimiä on oltava vähintään 3 ryhmää kohti. Mikäli merkittävä tietokanta on kerätty jo aikaisemmin, rinnakkaisiin negatiivisiin ja positiivisiin kontrolliryhmiin tarvitaan vain 1 tai 2 eläintä.

Vain toista sukupuolta, mieluiten uroksia, voidaan käyttää, mikäli tutkimusajankohtana on käytettävissä samalla eläinlajilla ja samalla altistustavalla tehtyjä tutkimuksia, joiden tulokset osoittavat, ettei myrkyvaikutuksessa ole huomattavia eroja sukupuolten välillä. Jos ihmisen altistuminen tutkittavalle kemialliselle aineelle voi olla sukupuolesta riippuvaa, kuten joidenkin lääkeaineiden kohdalla, testi on tehtävä asianomaista sukupuolta olevilla eläimillä.

1.5.2 **Altistusohjelma**

Tutkittavia aineita annetaan yleensä yhtenä altistuksena.

1.5.3 **Annostasot**

Normaalisti käytetään vähintään kahta annostasoa. Suurin annos määritellään annokseksi, joka aiheuttaa sen kaltaisia myrkyllisysoireita, että samalla annosteluohjelmalla suurempien annosten voitaisiin odottaa johtavan kuolemaan. Pienemmän annoksen pitäisi yleensä olla 50-25 % suuresta annoksesta.

Aineet, joilla on spesifisiä biologisia vaikutuksia pieninä, myrkyttöminä annoksina (kuten hormonit ja mitogeetit), saattavat edellyttää muita annoksenmäärityskriteerejä, ja ne pitäisi arvioida tapauskohtaisesti. Jos tehdään annoksenmääritystutkimus, koska soveltuvia tietoja ei ole käytettävissä, se on tehtävä samassa laboratoriossa käyttäen samaa lajia, samaa kantaa, samaa sukupuolta olevia eläimiä ja samaa annosteluohjelmaa kuin päätutkimuksessa on tarkoitus käyttää.

Suurin annos voidaan määrittellä myös annokseksi, joka aiheuttaa joitakin myrkyllisyyteen viittaavia muutoksia maksassa (esim. pyknoottisia tumia).

1.5.4 **Raja-annostesti**

Ellei havaittavia myrkyvaikutuksia esiinny testattaessa yhtä annostasoa, joka on vähintään 2000 mg/kg (eläimen painokilo kohti) ja joka annetaan kerta-annoksena tai kahtena annoksena saman päivänä aikana, ja ellei genotoksisuutta ole odotettavissa kemialliselta rakenteeltaan samanlaisilla aineilla saatujen tutkimustulosten perusteella, täydellinen tutkimus ei ehkä ole välttämätön. Ihmisten odotettu altistus saattaa edellyttää suurempien annostasojen käyttöä raja-annostestissä.

1.5.5 **Antotapa**

Tutkittava aine annetaan yleensä ruokintaletkulla tai sopivalla intubaatiokanyylillä. Myös muut antotavat ovat mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella. Vatsaontelonsisäistä annostelua ei kuitenkaan suositella, koska maksa saattaisi tällöin altistua tutkittavalle aineelle suoraan eikä verenkierron kautta. Koe-eläimen koosta riippuu, kuinka paljon nestettä voidaan antaa kerralla ruokintaletkun kautta tai injektiona. Määrä ei kuitenkaan saa olla yli 2 ml/100 g eläimen painon mukaan mitattuna. Mikäli käytetään suurempia nestemääriä, ne on perusteltava. Lukuun ottamatta ärsyttäviä tai syövyttäviä aineita, joiden vaikutukset yleensä pahenevat suurempia pitoisuuksia käytettäessä, nestemäärien vaihtelu olisi pidettävä mahdollisimman pienenä säätämällä tutkittavan aineen pitoisuuksia siten, että kokonaisnestemäärä pysyy samana kaikilla annostasoilla.

1.5.6 **Maksasolujen preparointi**

Maksasolut preparoidaan tutkittavalle aineelle altistetuista eläimistä yleensä 12-16 tunnin kuluttua annostelusta. Ylimääräinen varhaisempi näytteenottoajankohta (yleensä 2-4 tunnin kuluttua altistuksesta) on yleensä tarpeen, ellei selvää positiivista vastetta havaita 12-16 tunnin kuluttua. Myös muut näytteenottoajankohdat ovat kuitenkin mahdollisia, mikäli ne voidaan perustella toksikokineettisten tutkimustulosten perusteella.

Lyhytaikaisviljelmät nisäkkäiden maksasoluista perustetaan yleensä siten, että maksaa perfusoidaan kollageenaasilla *in situ* ja tuoreiden irronneiden maksasolujen annetaan kiinnittyä sopivaan pintaan. Negatiivisista kontrollieläimistä kerättyjen maksasolujen elinkykyisyyden (5) pitäisi olla vähintään 50 prosenttia.

1.5.7 **UDS:n määrittäminen**

Hiljattain eristettyjä nisäkkäiden maksasoluja inkuboidaan yleensä ³H-TdR:ää sisältävässä kasvatusväliaineessa sopivan pituinen aika, esim. 3-8 tuntia. Inkubaatioajan päätyttyä kasvatusväliaine erotetaan soluista, minkä jälkeen soluja voidaan inkuboida kasvatusväliaineessa, joka sisältää ylimääräistä merkitsemätöntä tymidiiniä inkorporoitumattoman radioaktiivisuuden vähentämiseksi. Tämän jälkeen solut huuhdellaan, fiksoidaan ja kuivataan. Pitempiä inkubaatioaikoja käytettäessä käsittely merkitsemättömällä tymidiinillä ei ehkä ole tarpeen. Objektilasit kastetaan autoradiografiemulsioon, valotetaan pimeässä (esim. säilytetään jääkaapissa 7-14 päivää), kehitetään, värjätään ja lasketaan valottuneet hopeajyvät. Jokaisesta eläimestä valmistetaan 2-3 objektilasia.

1.5.8 Analyysi

Objektilasipreparaattien tulisi sisältää riittävästi soluja, joiden morfologia on normaali, jotta luotettava UDS-analyysi voidaan tehdä. Preparaateista tehdään mikroskooppitutkimus selvän sytotoksisuuden merkkien havaitsemiseksi (esim. pyknoosi, radioaktiivisuuden väheneminen).

Objektilasit on koodattava ennen jyvästen laskemista. Normaalisti jokaisesta eläimestä lasketaan 100 solua vähintään kahdesta objektilasista; jos lasketaan alle 100 solua/eläin, tämä on perusteltava. Jyvästen määrää ei lasketa S-vaiheessa olevista tumista, mutta S-vaiheessa olevien solujen suhteellinen osuus voidaan rekisteröidä.

Morfologisesti normaalien solujen tumaan ja sytoplasmaan inkorporoituneen $^3\text{H-TdR}$:n määrä, joka näkyy hopeajyvästen kertymänä, on määritettävä soveltuvilla menetelmillä.

Hopeajyvästen määrä määritetään tumien kohdalta (tumassa esiintyvät jyväset, NG) ja tumaa vastaavilta alueilta sytoplasman kohdalta (sytoplasmiset jyväset, CG). CG-määrät mitataan joko valitsemalla sytoplasmasta kaikkein eniten radioaktiivisesti merkittyä ainetta sisältävä alue tai valitsemalla keskimäärin kaksi tai kolme satunnaisesti valittua tuman vierestä laskettua sytoplasmisten jyvästen määrää. Myös muita laskentamenetelmiä (esim. kokosolulaskentaa) voidaan käyttää, jos ne voidaan perustella (6).

2. TULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Jokaisen objektilasian ja jokaisen eläimen tiedot on esitettävä erikseen. Lisäksi kaikkien tietojen yhteenveto on esitettävä taulukkomuodossa. Tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärät (NNG) on laskettava jokaisesta solusta, jokaisesta eläimestä ja jokaisesta annoksesta ja ajankohdasta erikseen vähentämällä CG-lukemat NG-lukemista. Jos ”korjautuvat solut” lasketaan, käsitteen ”korjautuvat solut” kriteerit on perusteltava ja niiden on perustuttava negatiivisista kontrolleista aikaisemmin tai tämän tutkimuksen yhteydessä saatuihin tietoihin. Numeeriset tulokset voidaan arvioida tilastollisin menetelmin. Jos tilastollisia testejä käytetään, ne on valittava ja perusteltava ennen tutkimusta.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

Esimerkkejä positiivisten/negatiivisten vasteiden kriteereistä:

positiivinen	(i)	NNG-arvot ovat aikaisemmin asetettujen, laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvien kynnysarvojen yläpuolella;
tai	(ii)	NNG-arvot ovat merkitsevästi suurempia kuin rinnakkaisessa kontrollissa.
negatiivinen	(i)	NNG-arvot ovat laboratoriokohtaisiin vertailuarvoihin perustuvan kynnysarvon tasalla tai sen alapuolella;
tai	(ii)	NNG-arvot eivät ole merkitsevästi suuremmat kuin rinnakkaisessa kontrollissa.

Tulosten biologista merkitystä on pohdittava: huomioitavia parametrejä ovat eläinten väliset erot, annosvastesuhde ja sytotoksisuus. Tilastollisia menetelmiä voidaan käyttää apuna testitulosten arvioinnissa. Tilastollinen merkitsevyys ei saa kuitenkaan olla ainoa määräävä tekijä positiivisen vasteen arvioinnissa.

Useimmissa testeissä saadaan selvästi positiivisia tai negatiivisia tuloksia, mutta joissakin harvinaisissa tapauksissa saatujen tulosten pohjalta ei voida tehdä varmoja päätelmiä tutkittavan aineen vaikutuksesta. Tulokset saattavat jäädä epäselviksi tai kyseenalaisiksi kokeen toistokertojen määrästä riippumatta.

Nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* tehdyssä UDS-testissä saadut positiiviset tulokset osoittavat, että tutkittava aine aiheuttaa nisäkkäiden maksasoluissa *in vivo* DNA-vaurioita, jotka S-vaiheen ulkopuolinen DNA-synteesi (unscheduled DNA synthesis) voi korjata *in vitro*. Negatiivinen tulos osoittaa, ettei tutkittava aine aiheuta koeolosuhteissa sellaisia DNA-vaurioita, jotka voidaan todeta tällä testillä.

Tutkittavan aineen tai sen metaboliittien todennäköistä pääsyä yleiseen verenkiertoon tai erityisesti kohdekudokseen on pohdittava.

3. **RAPORTOINTI**

TUTKIMUSSELOSTUS

Tutkimusselostuksen on sisällettävä seuraavat tiedot:

Liuotin/kantaja-aine

- kantaja-aineen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen liukoisuus ja stabiliteetti liuotimessa/kantaja-aineessa, jos tiedossa;

Koe-eläimet:

- käytetty eläinlaji/kanta;
- eläinten lukumäärä, ikä ja sukupuoli;
- hankintapaikka, asuinolosuhteet, ruokavalio jne.;
- eläinten yksilöllinen paino testiä aloitettaessa, myös painon vaihteluväli, keskiarvo ja keskihajonta kussakin ryhmässä;

Koeolosuhteet:

- positiiviset ja negatiiviset (kantaja-aine/liuotin) kontrollit;
- mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset;
- annostasojen valintaperusteet;
- tutkittavan aineen valmistelun yksityiskohdat;
- tutkittavan aineen antotavan yksityiskohdat;
- antotavan valintaperusteet;
- menetelmät, joilla on vahvistettu tutkittavan aineen pääsy yleiseen verenkiertoon tai kohdekudokseen, tarvittaessa;
- ravintoon/juomaveteen sekoitetun testattavan aineen pitoisuuden (ppm) muuntaminen todelliseksi annokseksi (mg painokiloa kohti vuorokaudessa, mg/kg/vrk), tarvittaessa;
- yksityiskohtaiset tiedot ravinnon ja veden laadusta;
- yksityiskohtainen kuvaus altistus- ja näytteidenotto-ohjelmasta;

- myrkyvaikutuksen mittaamenetelmät;
- maksasolujen preparointi- ja viljelymenetelmä;
- käytetty autoradiografinen tekniikka;
- preparoitujen objektilasien lukumäärä ja laskettujen solujen lukumäärät;
- arviointikriteerit;
- kriteerit, joiden perustella tutkimukset luokiteltiin positiivisiksi, negatiivisiksi tai epäselviksi.

Tulokset:

- tumassa esiintyvien jyvästen määrien, sytoplasmisten jyvästen määrien ja tumassa esiintyvien jyvästen nettomäärien keskiarvot yksittäistä objektilasia, eläintä ja ryhmää kohti;
- mahdollinen annos-vastesuhde;
- mahdolliset tilastolliset analyysit;
- myrkyvaikutuksen merkit;
- rinnakkaisten negatiivisten (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisten kontrollien tulokset;
- aikaisemmat negatiivisilla (liuotin/kantaja-aine) ja positiivisilla kontroleilla saadut tutkimustulokset sekä vaihteluvälit, keskiarvot ja keskihajonnat;
- ”korjautuvien solujen” lukumäärä, jos määritetty;
- S-vaiheessa olevien solujen lukumäärä, jos määritetty;
- solujen elinkykyisyys.

Tulosten pohdinta.

Johtopäätökset.

4. **KIRJALLISUUTTA**

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, pp. 52-77.
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.40. IHOSYÖVYTTÄVYYS

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Euroopan vaihtoehtoisten menetelmien validointikeskus (ECVAM, Euroopan komission Yhteinen tutkimuskeskus) on validoinut tieteellisesti kaksi *in vitro* ihosyövyttävyydestä, rotan ihon sähkövastusmäärityksen (transcutaneous electrical resistance, TER) ja ihmisihomallitsein (1)(2)(3). ECVAMin validointitutkimuksessa osoitettiin, että molemmilla testeillä voidaan erottaa luotettavasti tunnetut ihoa syövyttävät kemikaalit ja sellaiset kemikaalit, jotka eivät syövytä ihoa. Lisäksi ihmisihomalliin perustuvalla tutkimuksella voitiin erottaa eriasteinen ihosyövyttävyyden (ihoa voimakkaasti syövyttävät aineet, R35, ja ihoa syövyttävät aineet, R34) (2). Seuraavassa esitetään molemmat testit ja niiden suoritusmenetelmät. Käytettävä testi valitaan käyttäjän erityisvaatimusten ja mahdollisuuksien mukaan.

Ks. myös osan B Yleisjohdanto.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Ihosyövyttävyyden (ihokorroosio): palautumattoman kudonvaurion ilmeneminen ihossa testiaineen aplikaation jälkeen.

1.3 VERTAILUAINEET

Vertailuaineita ei täsmennetä. Ks. kuitenkin kohdat 1.5.3.4 ja 1.7.2.3.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE - ROTAN IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYS

Testiainetta aplikoidaan enintään 24 tunnin ajan inhimillisellä tavalla lopetetuista nuorista rotista otettujen ihonäytteiden orvaskesipinnalle. Aineen katsotaan olevan syövyttävä, jos se rikkoo marraskeden ja tuhoaa sen suojavaikutuksen, mikä mitataan ihon sähkövastuksen pienenemisenä tietyn raja-arvon (5 kΩ) alapuolelle (4)(5). Ärsyttävät ja ei-ärsyttävät aineet eivät pienennä ihon sähkövastusta raja-arvon alapuolelle. Pintaaktiivisia aineita ja neutraaleja orgaanisia aineita (ks. määritelmä viitteessä 6) tutkittaessa testimenetelmään voidaan lisätä väriaineensitomisvaihe, jolla voidaan vähentää erityisesti kyseisen tyyppisillä kemikaaleilla saatujen väärin positiivisten tulosten määrää (2) (7).

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS - ROTAN IHON SÄHKÖVASTUSMÄÄRITYS

1.5.1 Eläimet

Ihonäytteiden valmistusta varten tarvitaan nuoria (20-23 päivän ikäisiä) rottia (Wistar tai vastaava kanta). Selästä ja kyljistä ajetaan karvat tarkasti pienillä eläinten karvaleikkureilla. Eläimet pestään pyyhkimällä huolellisesti, ja näytteenottoaluetta käsitellään runsaalla määrällä antibioottiliuosta (jossa on bakteerikasvua tehokkaasti estävät pitoisuudet esim. streptomysiiniä, penisilliiniä, kloramfenikolia ja amfoterisiiniä). Eläimet pestään jälleen antibioottiliuksella kolmantena tai neljäntenä päivänä ensimmäisen pesun jälkeen ja käytetään kokeisiin kolmen päivän sisällä (eläimet eivät saa olla 31 päivää vanhempia ihonäytteitä otettaessa).

1.5.2 Ihonäytteiden valmistus

Eläimet lopetetaan inhimillisesti. Kunkin eläimen selkänahka poistetaan ja nahasta kuoritaan ylimääräinen rasva huolellisesti. Nahka asetetaan PTFE- (polytetrafluoroeteeni-) putken toisen pään yli siten, että orvaskesipinta on kosketuksissa putken kanssa. Nahkanäyte kiristetään paikalleen kumisella O-renkaalla, ja liika nahka leikataan pois. Kuvassa 1 esitetään putken ja O-renkaan mitat. O-rengas tiivistetään huolellisesti PTFE-putken päähän vaseliinilla. Putki kiinnitetään jousipidikkeellä koeastian sisälle, jossa on magnesiumsulfaattiliuosta (154 mM) (Kuva 2).

1.5.3 Testin suoritus

1.5.3.1 Testiaineen aplikoiminen

Nestemäiset testiaineet (150 µl) aplikoidaan putken sisäpuolella olevalle orvaskesipinnalle (Kuva 2). Kun testataan kiinteitä aineita, ainetta on pantava näytepalan päälle riittävä määrä, että se peittää koko orvaskesipinnan. Kiinteän aineen päälle lisätään sitten deionisoitua vettä (150 µl) ja putkia ravistellaan varovasti. Testiaineiden on oltava mahdollisimman hyvin kosketuksissa ihon kanssa. Joitakin kiinteitä aineita voidaan tämän saavuttamiseksi lämmittää aina 30 °C:een testiaineen sulattamiseksi tai jauhaa rakeiseen tai jauhemaiseen muotoon.

Kutakin testiainetta varten käytetään kolme ihonäytettä. Testiaineita aplikoidaan 24 tunnin ajaksi (ks. myös 1.5.3.4). Testiaine poistetaan pesemällä vesihanan alla enintään 30 °C :n lämpötilassa, kunnes ainetta ei enää irtoa. Jos testiaineet ovat jähmettyneet putkessa, niiden irtoamista voi auttaa noin 30 °C :n lämminvesisuihkulla.

1.5.3.2 Ihon sähkövastusmittaus

Ihon sähkövastus mitataan matalajännitevaihtovirtasillalla (esim. AIM 401 tai 6401 tai vastaava). Ennen sähkövastuksen mittausta ihon pintajännitystä pienennetään lisäämällä putkeen 70-prosenttista etanolia riittävästi orvaskeden peittämiseksi. Etanoli poistetaan muutaman sekunnin kuluttua kääntämällä putki ylösalaisin, ja kudoksen hydratoidaan lisäämällä 3 ml magnesiumsulfaattiliuosta (154 mM). Mittaussillan elektrodit asetetaan ihonäytteen molemmille puolille vastuksen mittaamiseksi kilo-ohmeina (kΩ) ihonäytettä kohti (Kuva 2). Elektrodien mitat ja hauenleukapidikkeen alapuolella olevan elektrodin pituus esitetään kuvassa 1. Sisemmän (paksun) elektrodin pidike pidetään mittauksen ajan PTFE-putken päällä sen varmistamiseksi, että sama pituusmäärä elektrodia on upotettuna magnesiumsulfaattiliuokseen. Ulompi (ohut) elektrodi asetetaan koeastian sisälle siten, että se lepää astian pohjalla. Jousipidikkeen pohjan ja PTFE-putken pohjan välinen etäisyys pidetään vakiona (Kuva 1), koska tämä etäisyys vaikuttaa mitattavaan vastuksen arvoon.

Jos mitattu vastuksen arvo on yli 20 kΩ, se voi johtua siitä, että testiaine kyllästää ihonäytteen orvaskesipinnan. Tätä kerrosta voidaan yrittää poistaa esim. sulkemalla PTFE-putki peukalolla (hansikas kädessä) ja ravistelemalla putkea noin 10 sekuntia; magnesiumsulfaattiliuos heitetään pois ja vastusmittaus toistetaan tuoreen magnesiumsulfaattiliuoksen kanssa.

Ihon sähkövastusmittausten keskiarvot hyväksytään, jos samaan aikaan mitatut positiivisten ja negatiivisten kontrollinäytteiden arvot ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa. Suositellut kontrolliaineet ja niiden hyväksyttävät vastusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita ovat:

Kontrolli	Aine	Vastusalue (kΩ)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo (36 %)	0,5 - 1,0
Negatiivinen	Tislattu vesi	10 - 25

1.5.3.3 Muunnettu menetelmä pinta-aktiivisille aineille ja neutraaleille orgaanisille aineille

Jos testiaineet ovat pinta-aktiivisia aineita tai neutraaleja orgaanisia aineita ja niillä saatavat ihon sähkövastusarvot ovat enintään 5 kΩ, voidaan määrittää väriaineen tunkeutuminen kudokseen. Siten selvitetään, ovatko tulokset väärää positiivisia (2).

1.5.3.3.1 Sulforodamiini B -väriaineen aplikaatio ja poistaminen

Kun ihoa on ensin käsitelty testiaineella, kunkin ihonäytteen orvaskesipinnalle aplikoidaan 2 tunniksi 150 µl 10-prosenttista (paino/tilavuus) sulforodamiini B -liuosta tislatussa vedessä. Ihonäytteitä pestään sen jälkeen vesihanan alla huoneenlämpötilassa n. 10 sekuntia liian tai sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Ihonäytteet poistetaan varovasti PTFE-putkista ja pannaan pulloon (esim. 20 ml:n lasinen tuikelaskentapullo), jossa on deionisoitua vettä (8 ml). Pulloja ravistellaan varovasti 5 minuuttia mahdollisen liian tai sitoutumattoman väriaineen poistamiseksi. Huuhtelu toistetaan. Ihonäytteet otetaan pulloista, pannaan toisiin pulloihin, joissa on 5ml 30-prosenttista (paino/tilavuus) natriumdodekyylisulfaattia (SDS) tislatussa vedessä ja inkuboidaan yli yön 60° C:ssa. Inkubaation jälkeen ihonäytteet otetaan pulloista ja heitetään pois. Jäljellä olevaa liuosta sentrifugoidaan 8 minuuttia 21 °C:ssa (suhteellinen keskipakoisvoima ~175). Supernatantista otetaan 1 ml:n näyte, joka laimennetaan 1:5:een (tilavuus/tilavuus) [ts. 1 ml + 4 ml] 30-prosenttisellä (paino/tilavuus) SDS:llä tislatussa vedessä. Liuoksen optinen tiheys (OD) mitataan aallonpituudella (noin) 565 nm.

1.5.3.3.2 Väriaineen pitoisuuden laskeminen

Sulforodamiini B -väriaineen pitoisuus ihonäytteessä lasketaan OD-arvoista (sulforodamiini B:n molaarinen ekstinktiokerroin aallonpituudella 565 nm = $8,7 \times 10^4$; molekyylipaino = 580). Sulforodamiini B -pitoisuus määritetään kullekin ihonäytteelle, ja rinnakkaismäärittämisille lasketaan keskiarvo. Väriaineen sitoutumiskokeen keskiarvotulokset hyväksytään, jos samaan aikaan tehtyjen kontrolliaineiden määritysten tulokset ovat tälle menetelmälle määritellyissä hyväksyttävissä rajoissa. Suositellut kontrolliaineiden hyväksyttävät väriainepitoisuusalueet käytettäessä tätä menetelmää ja näitä laitteita ovat

Kontrolli	Aine	Väriaineen pitoisuusalue (µg/ihonäyte)
Positiivinen	10 M kloorivetyhappo (36 %)	40 - 100
Negatiivinen	Tislattu vesi	15 - 35

1.5.3.4 Lisätietoja

Testiaineet voidaan myös aplikoida ihonäytteille lyhyemmäksi ajaksi (esim. 2 tunniksi), jos halutaan selvittää, mitkä aineet ovat erittäin syövyttäviä. Validointitutkimuksessa havaittiin kuitenkin, että ihon sähkövastuskoe, jonka avulla voitiin erottaa oikein syövyttävät ja ei-syövyttävät aineet 24 tunnin aplikaation jälkeen, yliarvioi useiden testikemikaalien syövyttävyyden, kun niitä aplikoitii ihonäytteille 2 tunniksi (2).

Testauslaitteiden ominaisuudet ja mitat sekä koemenetelmä voivat vaikuttaa saatuihin ihon sähkövastusarvoihin. Viiden kΩ:n syövyttävyyksäraja saatiin tässä ohjeessa selostetuilla erityislaitteilla ja -menetelmällä saatujen tulosten perusteella. Jos testiolosuhteita muutetaan merkittävästi, voi olla tarpeen käyttää eri raja- ja kontrolliarvoja. Siksi suositellaan, että menetelmä ja vastuksen raja-arvo kalibroidaan testaamalla sarja vertailustandardeja, jotka on valittu validointitutkimuksessa käytettyjen kemikaalien joukosta (3).

1.6 TESTIMENETELMÄN PERIAATE - IHMISIHOMALLIMÄÄRITYS

Testiainetta aplikoidaan enintään 4 tunniksi kolmiulotteiseen ihmishomalliin, jossa on rekonstruoitu orvaskesi ja toimiva marraskesi. Syövyttäviksi aineiksi katsotaan aineet, jotka vähentävät solujen elävyyden (määritettynä esim. MTT-pelkistyskokeella) määriteltyjen raja-arvojen alapuolelle tiettyjen altistusajkojen jälkeen. Määrittäminen perustuu oletukseen, että syövyttävät kemikaalit pystyvät tunkeutumaan marrasketeen (diffundoitumalla tai eroosion seurauksena) ja ovat niin myrkyllisiä soluille, että aiheuttavat solukuolemaa allaolevissa solukerroksissa.

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS - IHMISIHOMALLIMÄÄRITYS

1.7.1 Ihmishomallit

Ihmishomallit voivat olla peräisin eri lähteistä, mutta niiden on täytettävä tietyt vaatimukset. Mallissa on oltava toimiva marraskesi, jonka alla on kerros eläviä soluja. Marraskeden suojaavan vaikutuksen on oltava riittävä. Tämä voidaan osoittaa toteamalla, että sellaisten aineiden aplikointi, joiden tiedetään olevan myrkyllisiä soluille mutta jotka eivät normaalisti tunkeudu marraskeden läpi, ei aiheuta sytotoksisia vaikutuksia ihmishomalliin. On osoitettava, että mallilla saadaan toistettavia tuloksia määrityksissä koeolosuhteissa.

Mallin elävien solujen elinkelpoisuuden on oltava riittävä positiivisten ja negatiivisten kontrolliaineiden erottamiseen. Kun malli altistetaan negatiiviselle kontrolliaineelle, solujen elinkelpoisuuden (mitattuna esim. MTT:n pelkistys avulla eli OD-arvona) on oltava kyseiselle mallille hyväksytyjen rajojen sisällä. Samoin positiiviselle kontrolliaineelle altistettujen solujen elävyyden (verrattuna negatiivisen kontrollin arvoihin) on oltava määritellyissä rajoissa. Tärkeintä on, että käytetyn ennustemallin osoitetaan täyttävän kansainväliset validointivaatimukset.

1.7.2 Testin suoritus

1.7.2.1 Testiaineen aplikointi

Nestemäistä testiainetta aplikoidaan määrä, mikä peittää ihonpinnan (vähintään 25 µl/cm²). Kiinteää testiainetta aplikoidaan määrä, mikä peittää ihonpinnan, ja ainetta pitäisi kostuttaa, jotta se olisi hyvin kosketuksissa ihoon. Tarvittaessa kiinteät aineet on jauhettava aplikointia varten. On osoitettava, että aplikaatiomenetelmä sopii monenlaisille kemikaalityypeille (ks. esim. viite 2). Altistuksen päätyttyä testiainetta pestään huolellisesti ihon pinnalta suolaliuoksella.

1.7.2.2 Solujen elinkykyysmittaukset

Solujen elävyyden määrittämiseksi voidaan käyttää mitä tahansa kvantitatiivista ja validoitua menetelmää. Tavallisin määrittäminen on MTT:n pelkistys, jonka on osoitettu antavan tarkkoja ja toistettavia tuloksia eri laboratorioissa (2). Ihonäyte pannaan MTT-liuokseen, 0,3 mg/ml, 20-28 °C:n lämpötilassa 3 tunniksi. Saostunut sininen formatsaani uutetaan (liuotinuotolla), ja formatsaanipitoisuus määritetään mittaamalla OD aallonpituudella 545 – 595 nm.

1.7.2.3 Lisätietoa

Käytetty ihomalli sekä altistusajat ja pesuohjelmat vaikuttavat huomattavasti solujen elävyyteen. Menetelmä ja ennustemalli on suositeltavaa kalibroida testaamalla sarja vertailustandardeja, jotka on valittu ECVAMin validointitutkimuksessa käytettyjen kemikaalien joukosta (3). On tärkeää, että käytetyn menetelmän on osoitettu olevan toistettava laboratorioissa ja niiden välillä useille kemikaaleille kansainvälisten standardien mukaisesti. Menetelmän on vähintäänkin täytettävä tieteelliselle validiteetille aiemmin määritellyt vaatimukset (2), ja tällaisen validointitutkimuksen tulokset on julkaistava refereesivustolla neudattavassa tieteellisessä aikakauslehdessä.

2. MITTAUSTULOKSET

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

2.1.1 Rotan ihon sähkövastusmääritys

Testiaineiden, positiivisten ja negatiivisten kontrollien ja mahdollisten vakiovertailukemikaalien vastusarvot ($k\Omega$) olisi esitettävä taulukkomuodossa, ja myös tulokset rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista, keskiarvot ja tuloksena johdettu luokitus olisi esitettävä.

2.1.2 Ihmishomallimääritys

Testiaineiden, positiivisten ja negatiivisten kontrollien ja mahdollisten standardien vakiovertailukemikaalien OD-arvot ja lasketut prosentuaaliset solujen elävyydet olisi esitettävä taulukkomuodossa, ja myös tulokset rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista, keskiarvot ja tuloksena johdettu luokitus olisi esitettävä.

2.2 TULOSTEN ARVIOINTI JA TULKINTA

2.2.1 Rotan ihon sähkövastusmääritys

Jos testiaineelle saatu ihon sähkövastusarvo on yli $5 k\Omega$, aine ei ole syövyttävä. Jos testiaineelle saatu ihon sähkövastusarvo on enintään $5 k\Omega$, eikä testiaine ole pinta-aktiivinen aine tai neutraali orgaaninen aine, testiaine on syövyttävä.

Jos pinta-aktiivinen aine tai neutraali orgaaninen aine antaa enintään $5 k\Omega$:n ihon sähkövastusarvoja, aineelle voidaan tehdä väriaineen tunkeutumiskoe. Jos ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on vähintään sama kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (36 % HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus, testiaine on oikeasti positiivinen ja siis syövyttävä. Jos ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus on pienempi kuin samanaikaisesti määritetyn positiivisen kontrollin (36 % HCl) aiheuttama ihonäytteen sisältämän väriaineen keskipitoisuus, testiaine on väärä positiivinen, eikä siis ole syövyttävä.

2.2.2 Ihmishomallimääritys

Negatiivisen kontrollin OD-arvo edustaa 100 % solujen elävyyttä. Siksi kullekin testinäytteelle saaduista OD-arvoista voidaan laskea solujen elinkykyisyys prosentteina negatiivisesta kontrollista. Prosentuaalinen solujen elävyyden raja-arvo, jolla erotetaan syövyttävät testiaineet ei-syövyttävistä (tai eri syövyttävyyssluokat), on määriteltävä selvästi ennustemallissa ennen menetelmän validointia, ja sen jälkeen tehtävässä validointitutkimuksessa on osoitettava, että erottava raja-arvo on asianmukainen (ks. esim. viite 2).

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä vähintään seuraavat tiedot:

Testiaine:

- tunnistetiedot, fysikaalinen olomuoto ja tarvittaessa fysikokemialliset ominaisuudet. Nämä tiedot on esitettävä myös mahdollisesti käytetyistä vertailuaineista.

Testiolosuhteet:

- käytetty testimenetelmä yksityiskohtaisesti
- mahdolliset muutokset ja niiden perustelut.

Tulokset:

- taulukoidaan vastusarvot (ihon sähkövastuskokeesta) tai prosentuaalinen solujen elävyys (ihmishomallimäärityksestä) testiaineelle, positiiviselle ja negatiiviselle kontrollille ja mahdollisille vertailukemikaaleille sekä tulokset rinnakkaiskokeista tai toistetuista kokeista ja keskiarvot
- kuvataan mahdolliset muut havaitut vaikutukset.

Tulosten tarkastelu.

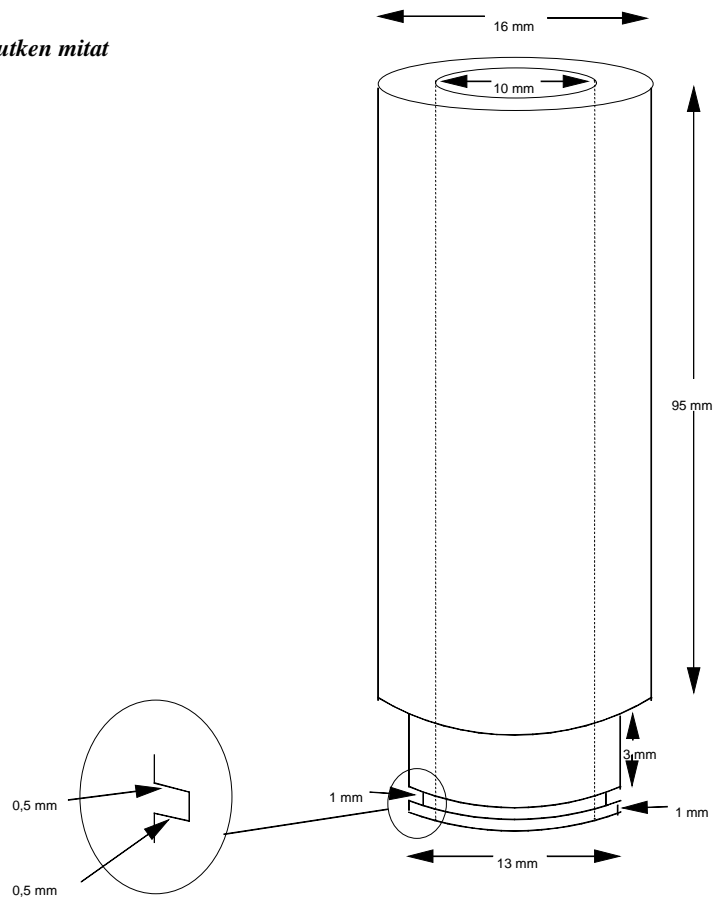
Päätelmät

4. **VIITTEET**

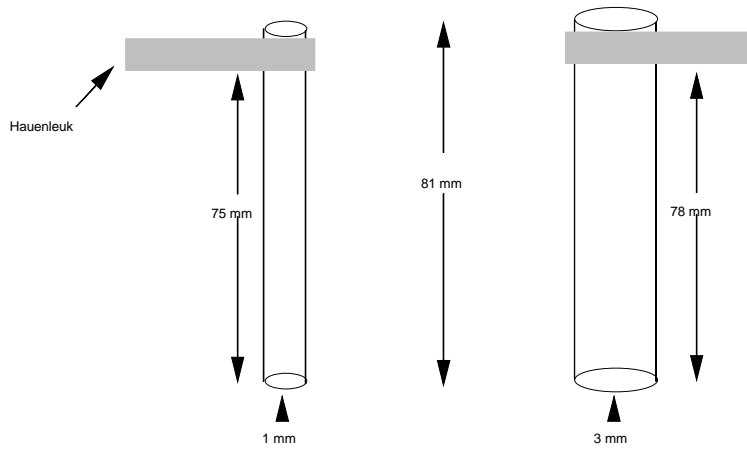
1. ECVAM (1998). ECVAM News & Views. *ATLA* **26**, 275-280.
2. Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H-G. & Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* **12**, 483-524.
3. Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P. & Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. *Toxicology in Vitro* **12**, 471-482.
4. Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A. & Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test - modifications and validation. *Food & Chemical Toxicology* **24**, 507-512.
5. Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J. & Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro*: results of an interlaboratory trial. *Toxicology in Vitro* **6**, 191-194.
6. Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J. & Liebsch, M. (1998). An evaluation of the proposed OECD testing strategy for skin corrosion. *ATLA* **26**, 709-720.
7. Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P. & Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 6. *ATLA* **23**, 219-255.

Kuva 1

PTFE-putken mitat

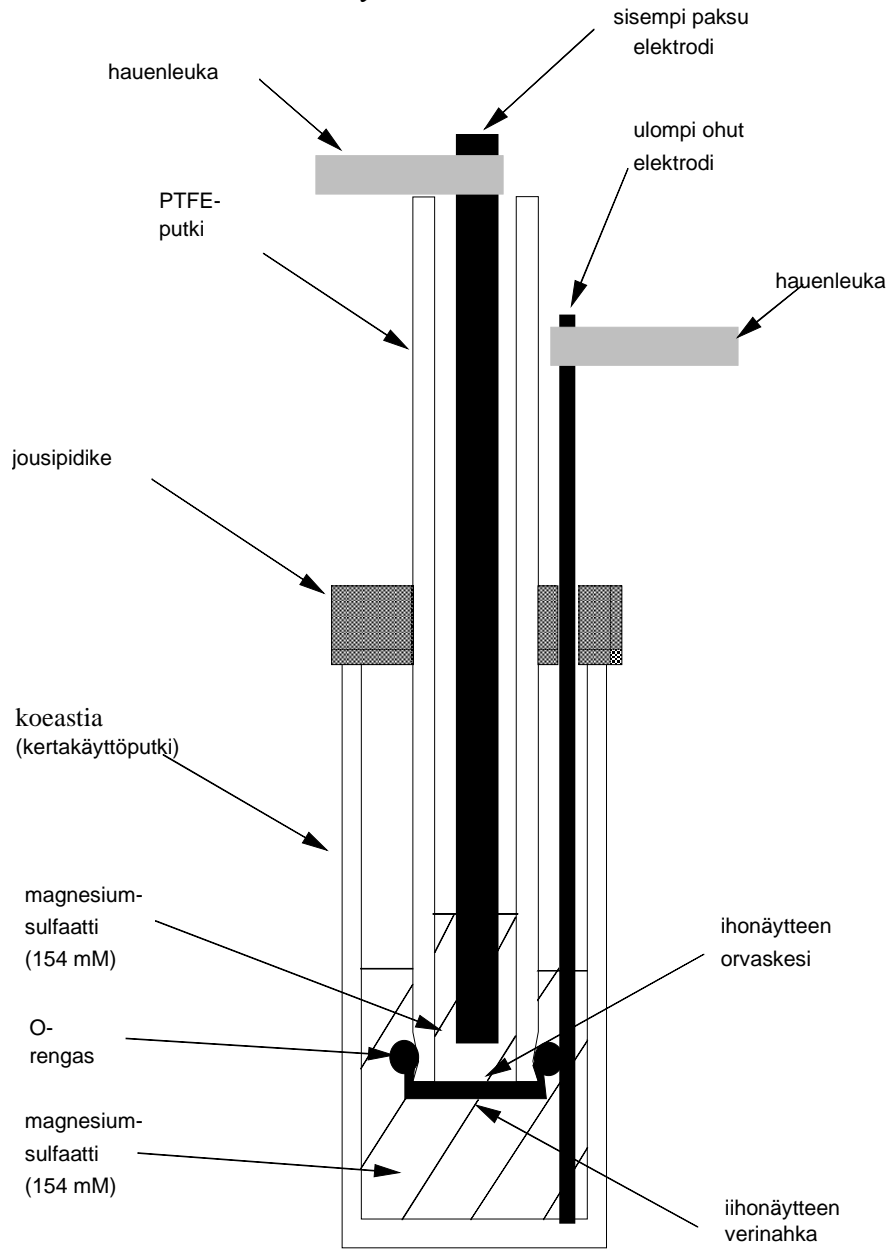


Elektrodien mitat



Kuva 2

Rotan ihon sähkövastuksen määrittäyslaitte



B. 41 VALOMYRKYLLISYYS - *IN VITRO* 3T3 NRU -VALOMYRKYLLISYYSTESTI

1. MENETELMÄ

1.1 JOHDANTO

Valomyrkyllisyys määritellään toksiseksi vasteeksi, joka ilmenee sen jälkeen, kun iho on ensin altistunut tietyille kemikaaleille ja sen jälkeen valolle tai jonka kemikaali aiheuttaa ihoa säteilytettäessä aineen päästyä systeemisesti elimistöön.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestillä saadun informaation avulla voidaan tunnistaa testiaineen valomyrkyllisyystaipumus, ts. voiko testiaine yhdessä UV-valolle ja näkyvälle valolle tapahtuvan altistuksen kanssa aiheuttaa vauriota.

Koska valomyrkyllisyys määritetään *in vitro* -testissä kemikaalin ja valon yhteisvaikutuksesta aiheutuvana *fotosytotoksisuutena*, testillä voidaan tunnistaa sekä yhdisteitä, jotka ovat valomyrkyllisiä *in vivo* elimistöön annettuna ja ihoon jakautuneina ihoon, että yhdisteitä, jotka ovat valoärsyttäviä sen jälkeen, kun niitä on applikoitu iholle paikallisesti.

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystesti kehitettiin ja validoitiin EU:n ja COLIPAn (Eurooppalainen kosmetiikka- ja hajuvesivalmisteyhdistys) yhteisessä hankkeessa vuosina 1992 – 1997 (1)(2)(3). Tarkoituksena oli kehittää validi *in vitro* -vaihtoehto erilaisille käytössä oleville *in vivo* -testeille. Vuonna 1996 OECD:n työryhmässä suositeltiin vaiheittaiseen *in vitro* -testaukseen perustuvaa lähestymistapaa valomyrkyllisyyden määrittämiseksi (4).

In vitro 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestin tuloksia verrattiin akuutteihin valomyrkyllisyys- ja valoärsytysvaikutuksiin eläimillä ja ihmisillä *in vivo*, ja testin osoitettiin ennustavan erinomaisesti näitä vaikutuksia. Testin tarkoituksena ei ole ennustaa muita kemikaalien ja valon yhteisvaikutuksesta aiheutuvia haitallisia vaikutuksia, esim. *fotogenotoksisuutta*, *valoallergiaa* ja *fotokarsinogeenisuutta*, vaikka monet tällaisia erityisominaisuuksia omaavat kemikaalit reagoivat positiivisesti *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä. Testi ei pysty arvioimaan aineen *valomyrkyllisyyspotenssia kvantitatiivisesti*.

Liitteessä 1 esitetään vaiheittainen lähestymistapa kemikaalien valomyrkyllisyyden määrittämiseksi.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Säteilyvoimakkuus: pintaan kohdistuvan ultraviolettivalon (UV) tai näkyvän valon (VIS) intensiteetti mitattuna watteina neliometriä kohti tai watteina neliösenttimetriä kohti (W/m^2 tai mW/cm^2).

Valoannos: pintaan kohdistuvan ultraviolettisäteilyn (UV) tai näkyvän valon säteilyn määrä (= intensiteetti \times aika) ilmaistuna jouleina (= $W \times s$) pinta-alayksikköä kohti, esim. J/m^2 tai J/cm^2 .

UV-valon aallonpituusalueet: Kansainvälisen valaistustoimikunnan (ICI) suosittelemat nimitykset ovat: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm). Muitakin määritelmiä käytetään: UVB- ja UVA-alueen raja asetetaan usein 320 nanometriin ja UVA-alue voidaan jakaa alueisiin UV-A1 ja UV-A2, jolloin raja on noin 340 nanometrissä.

Solujen elävyys: muuttuja, jolla mitataan solupopulaation kokonaisaktiivisuutta (esim. neutraalipunan ottoa solujen lysosomeihin), joka mittaussuureesta ja testimenetelmästä riippuen korreloi solujen kokonaismäärään ja/tai elinkykyyn.

Suhteellinen solujen elävyys: solujen elävyys ilmaistuna suhteessa negatiivisiin kontrolleihin (liuotinkontrolleihin), jotka käyvät läpi testin muuten (joko +UV tai -UV), mutta ei ole käsitelty testikemikaalilla.

Ennustemalli: algoritmi, jonka avulla myrkyllisyydestin tulokset muunnetaan ennusteeksi myrkyllisyyspotentiaalista. Tässä ohjeessa voidaan käyttää PIF:iä ja MPE:tä *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyydestin tulosten muuntamiseen valomyrkyllisyyspotentiaaliennusteeksi.

PIF (valoärsyttävyystekijä): tekijä, joka muodostetaan vertaamalla testikemikaalin kahta yhtä tehokasta solumyrkyllisyypitoisuutta (EC_{50}), jotka on saatukun soluja säteilytetään UVA-/näkyvällä valolla (+UV), joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (-UV).

MPE (keskimääräinen valovaikutus): uusi suure, joka saadaan analysoimalla matemaattisesti kokonaan kaksi pitoisuus–vastekuvaajaa, jotka on saatu, kun soluja säteilytetään UVA/näkyvällä valolla, joka ei ole solumyrkyllistä, ja kun soluja ei säteilytetä (-UV).

Valomyrkyllisyys: akuutti toksinen vaste, joka ilmenee sen jälkeen, kun iho on ensimmäisen kerran altistettu tietyille kemikaaleille ja sen jälkeen valolle, tai jonka ihon säteilytys aiheuttaa samalla tavalla ihon säteilytys sen jälkeen, kun kemikaalia on annettu elimistöön.

Valoärsyttävyyys: Valomyrkyllisyyden alakäsite, jota käytetään vain sellaisista valomyrkyllisistä reaktioista, jotka ilmenevät ihossa (paikallisesti tai suun kautta annetulle) kemikaalille altistumisen jälkeen. Tällaiset valomyrkylliset reaktiot aiheuttavat aina epäspesifistä solutuhoa (auringonpolttan tapaisia reaktioita).

Valoallergia: hankittu immunologinen reaktiivisuus, joka ei ilmene ensimmäisen kemikaali- ja valokäsittelyn yhteydessä ja joka tarvitsee yhden tai kahden viikon induktioajan ennen kuin reaktiivisuus voidaan osoittaa.

Fotogenotoksisuus: genotoksinen vaste, joka havaitaan genotoksisuusmäärityksellä ja joka ilmenee altistettaessa soluja sellaiselle UV-/näkyvän valon annokselle, joka ei ole genotoksinen, ja kemikaalille, joka ei ole genotoksinen.

Fotokarsinogeneisuus: toistuvalla valo- ja kemikaalialtistuksella aiheutettu karsinogeneisuus. Termiä "fotokarsinogeneesi" käytetään, jos kemikaali voimistaa UV-valon aiheuttamaa tuumorigeneesiä.

1.3 VERTAILUAINEET

Kun 3T3 NRU -valomyrkyllisyydesti otetaan käyttöön, suositellaan, että positiivisena kontrollina käytetyn *klooripromatsiinin*, joka olisi testattava samanaikaisesti jokaisessa määrityksessä, lisäksi käytetään vertailukemikaaleina joitakin tämän testin yhteydessä laboratoriodenvälisissä vertailuissa käytetyistä kemikaaleista (1)(3)(13).

1.4 ALUSTAVIA HUOMIOITA

Useantyyppisten kemikaalien on ilmoitettu olevan valomyrkyllisiä (5)(6)(7)(8). Niiden ainoa yhteinen ominaisuus on kyky absorboida valoenergiaa auringonvalon spektrialueella. Valokemian ensimmäisen lain (Grothaus-Draperin laki) mukaan valoreaktio edellyttää riittävää valokvanttien absorptiota. Tämä merkitsee sitä, että ennen kuin harkitaan tämän ohjeen mukaista biologista testausta, testikemikaalin UV-valon ja näkyvän valon absorptiospektri olisi määritettävä (esim. OECD:n testiohjeen 101 mukaisesti). Jos kemikaalin mooliekstinktio- tai absorptiokerroin on pienempi kuin $10 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, kemikaalilla ei ole valoreaktiokykyä eikä sitä tarvitse testata *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyydestillä tai millään muulla haitallisia valokemiallisia vaikutuksia määrittävällä biologisella testillä (Liite 1).

1.5 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnetaan neljä mekanismia, joilla valomyrkyllisyysvaste voi syntyä, kun (kemiallinen) kromofori absorboi valoa (7). Kaikista aiheutuu soluvaurioita. Sen vuoksi *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyydesti perustuu kemikaalin solumyrkyllisyyden vertaamiseen, kun kemikaalia testataan altistettaessa sellaiselle UVA- tai näkyvälle valolle, joka ei ole solumyrkyllinen, ja ilman tällaista valoaltistusta. Solumyrkyllisyys ilmaistaan tässä testissä pitoisuudesta riippuvana neutraalipunan (9) soluunoton/kertymisen vähenemisenä 24 tuntia kemikaalikäsittelyn ja säteilytyksen jälkeen.

Balb/c 3T3 -soluja viljellään 24 tuntia yhden solun vahvuisen kerroksen aikaansaamiseksi. Kutakin testikemikaalia kohti inkuboidaan aluksi yhden tunnin ajan kahta 96 kuopan levyä, joissa on kahdeksaa eri pitoisuutta testattavaa kemikaalia. Sen jälkeen toinen levyistä altistetaan ei-solomyrkylliselle UVA-valon ja näkyvän valon annokselle 5 J/cm² UVA:ta (+UV -koe), ja toinen levy pidetään pimeässä (-UV-koe). Sitten kummankin levyn käsittelyneeste korvataan viljelyneesteellä, inkuboidaan toiset 24 tuntia, ja määritetään solujen elävyys neutraalipunan ottona (NRU) kolmessa tunnissa. Suhteellinen solujen elävyys, joka ilmaistaan prosentiosuutena käsittelemättömistä negatiivisista kontrolleista, lasketaan kullekin kahdeksalle testipitoisuudelle. Valomyrkyllisyyden ennustamiseksi verrataan pitoisuusvasteita, jotka on saatu UV-säteilytyksen kanssa (+UV) ja ilman sitä (-UV), yleensä EC₅₀ -tasolla, ts. siinä pitoisuudessa, joka vähentää solujen elävyyttä 50 prosentilla verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin.

1.6 LAATUVAATIMUKSET

Solujen herkkyys UVA-valolle, solujen aiempaa käyttöä koskevat tiedot: Solujen herkkyys UVA-valolle on tarkistettava säännöllisesti. Soluja pannaan viljelyyn samassa tiheydessä, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä, säteilytetään seuraavana päivänä UVA-valoannoksilla, joiden suuruus on 1 - 9 J/cm², ja määritetään solujen elävyys päivää myöhemmin NRU-määrittelyllä. Solut täyttävät laatuvaatimukset, jos niiden elävyys UVA-säteilytyksen jälkeen, jonka voimakkuus on 5 J/cm², on vähintään 80 % pimeässä pidettyjen kontrollien elinkykyisyydestä. Suurimmalla UVA-annoksella 9 J/cm² elävyyden pitäisi olla vähintään 50 % pimeässä pidettyjen kontrollien elävyydestä. Tämä tarkistus olisi tehtävä suunnilleen joka 10. kerta soluja siirrostettaessa.

Negatiivisten kontrollisolujen UVA-herkkyys, nykyinen testi: Testi täyttää laatuvaatimukset, jos negatiivisten kontrollien (Earlen tasapainotetussa suolaliuoksessa, EBSS, jossa on tai ei ole 1 % dimetyylisulfoksidia, DMSO, tai 1 % etanolia, EtOH, olevat solut) elävyys +UVA-kokeessa on vähintään 80 % samassa liuotuksessa olevien säteilyttämättömien solujen elinkykyisyydestä samaan aikaan tehdyssä pimeäkokeessa (-UVA).

Negatiivisten kontrollien elävyys. Negatiivisten kontrollien neutraalipunautteesta mitattu absoluuttinen optinen tiheys (OD_{540 NRU}) osoittaa, ovatko kuoppaa kohti aplikoidut 1×10⁴ solua lisääntyneet normaalilla nopeudella määritykseen kuuluvien kahden päivän aikana. Testi täyttää hyväksymisvaatimukset, jos käsittelemättömien kontrollien keskimääräinen OD_{540 NRU} on ≥ 0,2.

Positiivinen kontrolli: Kussakin *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä on testattava samanaikaisesti jokin tunnetusti valomyrkyllinen kemikaali. EU/COLIPA-validointitutkimuksessa käytettiin positiivisena kontrollina klooripromatsiinia (CPZ), jota sen vuoksi suositellaan. CPZ:n testaustalle *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyyden standardiprotokollassa määriteltiin seuraavat hyväksyntävaatimukset: CPZ, säteilytetty (+UVA): EC₅₀ = 0,1 – 2,0 µg/ml; CPZ, ei säteilytetty (-UVA): EC₅₀ = 7,0 – 90,0 µg/ml. Valoärsyttävyystekijän (PIF), ts. EC₅₀:n muutoksen, olisi oltava vähintään 6.

CPZ:n sijasta voidaan samanaikaisesti testattavina positiivisina kontrolleina käyttää muita tunnettuja valomyrkyllisiä kemikaaleja, jotka sopivat kyseessä olevalle kemikaaliluokalle tai arvioitavana olevan testikemikaalin liukoisuusominaisuuksiin. Tällöin testin hyväksyntävaatimuksiksi pitäisi määritellä asianmukaisesti EC₅₀-arvojen vaihtelualue ja PIF- tai MPE-arvot (keskimääräinen valovaikutus) aikaisempian tietojen perusteella (historiallinen kontrolli).

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 Valmistelut

1.7.1.1 Solut

Validointitutkimuksessa käytettiin joko ATCC:stä tai ECACC:stä hankittua pysyvää hiiren fibroblastisolulinjaa Balb/c 3T3, kloonina 31, ja siksi sitä suositellaan. Muita soluja tai solulinjoja voidaan käyttää, kun tutkimussuunnitelma on sama, jos viljelyolosuhteet mukautetaan solujen erityistarpeisiin. Samanlaisuus on tällöin osoitettava.

Mykoplasmakontaminaatio on tutkittava säännöllisesti, ja soluja saa käyttää vain jos tutkimustulos on tyydyttävä.

Koska solujen UVA-herkkyys voi lisääntyä siirrostamisten myötä, pitäisi käyttää sellaisia Balb/c 3T3 -soluja, joita on siirrostettu mahdollisimman harvoja kertoja, mieluiten alle 100 kertaa. On tärkeää, että Balb/c 3T3 -solujen UVA-herkkyys tarkistetaan tässä ohjeessa selostetun laadunvalvontamenettelyn mukaisesti.

1.7.1.2 *Viljelyneeste ja viljelyolosuhteet*

Sopivaa viljelyneestettä ja inkubaatio-olosuhteita olisi käytettävä solujen tavanomaiseen siirrostamiseen ja testin aikana. Balb/c 3T3 -soluille käytetään DMEM:iä, jossa on 10 % vastasyntyneen vasikan seerumia, 4 mM glutamiinia, penisilliiniä ja streptomysiiniä, ja soluja inkuboidaan kaapissa, jonka lämpötila on 37 °C ja CO₂-pitoisuus 7,5 %. On erityisen tärkeää, että viljelyolosuhteet ovat sellaiset, että solusykli pysyy samanlaisena kuin se on aiemminkin ollut käytetyillä soluilla tai solulinjalla.

1.7.1.3 *Viljelmien valmistus*

Pakastetuista varastoviljelmistä otettuja soluja inokuloidaan viljelyneesteessä sopivassa tiheydessä, ja niitä siirrostetaan vähintään kerran ennen kuin ne käytetään *in vitro* 3T3 NRU -valomyrkyllisyystestissä.

Valomyrkyllisyystestiä varten soluja inokuloidaan sellaisessa tiheydessä, että viljelmät eivät ole konfluentteja testin päättyessä, ts. kun solujen elinkykyisyys määritetään 48 tunnin kuluttua solujen inokuloinnista. Balb/c 3T3 -soluille, joita viljellään 96-kuoppalevyillä, suositellaan solutiheyttä 1×10^4 solua kuoppaa kohti.

Kutakin testikemikaalia varten soluja inokuloidaan täysin samalla tavalla kahdelle erilliselle 96-kuoppalevyille, jotka käyvät läpi samanaikaisesti koko testiohjelman täysin samanlaisissa olosuhteissa, lukuun ottamatta aikaa, jolloin yhtä kuoppalevyä säteilytetään (+UVA/VIS) ja toinen pidetään pimeässä (-UVA/VIS).

1.7.1.4 *Metabolinen aktivaatio*

Vaikka metaboloivia järjestelmiä yleensä tarvitaan kaikissa *in vitro* -testeissä, joilla ennustetaan genotoksisuutta ja karsinogeenisuutta valomyrkyllisyydelle ei toistaiseksi tunneta kemikaaleja, jotka edellyttäisivät metabolista aktivaatiota, jotta ne voisivat olla valomyrkyllisiä *in vivo* tai *in vitro*. Siten ei katsota olevan tarpeellista eikä tieteellisesti perusteltua suorittaa tätä testiä metabolisen aktivaatiojärjestelmän kanssa.

1.7.1.5 *Testikemikaalin valmistus*

Testikemikaalit on valmistettava välittömästi ennen käyttöä ellei stabiilisuustiedoista ilmene, että varastointi voidaan hyväksyä. Valmistus on mahdollisesti tarpeen tehdä punaisessa valossa, jos aine hajoaa nopeasti valossa.

Testikemikaali pitäisi liuottaa puskuroituun suolaliuokseen, esim. Earlin tasapainotettuun suolaliuokseen (EBSS) tai fosfaatilla puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (PBS), joissa ei saa olla proteiinikontaminanteja tai valoa absorboivia pH-indikaattorivärejä, etteivät ne häiritse reaktioita säteilytyksen aikana.

Huonosti vesiliukoiset testikemikaalit pitäisi liuottaa sopivaan liuottimeen 100-kertaisessa pitoisuudessa loppupitoisuuteen verrattuna ja laimentaa sitten suhteessa 1:100 puskuroidulla suolaliuoksella. Jos käytetään liuotinta, sitä on oltava 1 prosenttiin (tilavuus/tilavuus) vakioitavuudessa kaikissa viljelmissä, ts. myös negatiivisissa kontrolleissa ja kaikissa testikemikaalipitoisuuksissa.

Dimetyylisulfoksidi (DMSO) ja etanoli (EtOH) ovat suositeltavia liuottimia. Muut liuottimet, jotka eivät ole kovin solumyrkyllisiä (esim. asetoni), voivat olla sopivia, mutta niiden erityisominaisuudet (esim. reaktiivisuus testikemikaalin kanssa, valomyrkyllisyysvaikutuksen vaimeneminen tai radikaalien sitomisominaisuus) on arvioitava huolellisesti.

Vortex-sekoitusta ja/tai ultraäänihajoitusta ja/tai lämmittämistä 37 °C:een voidaan käyttää tarvittaessa liukenemisen helpottamiseksi.

1.7.1.6 UV-säteilytys – valmistelu

Valolähde: Sopivan valolähteen ja sopivien suodattimien valitseminen on tärkein asia valomyrkyllisyyden testauksessa. UVA ja näkyvä valo liittyvät yleensä valolle herkistymiseen (7)(10), kun taas UVB on vähemmän tärkeä ja välittömästi soluille erittäin myrkyllinen. Sen valomyrkyllisyys lisääntyy 1000-kertaiseksi aallonpituudelta 313 nm aallonpituudelle 280 nm (11). Perusteena sopivan valolähteen valitsemiseen pitäisi olla mm. olennainen vaatimus, että valolähde emittoi aallonpituuksia, joita testikemikaali absorboi, ja että valoannoksen (joka pitää saavuttaa järkevässä ajassa) pitäisi olla riittävä tunnettujen valolle herkistävien kemikaalien osoittamiseksi. Lisäksi käytetyt aallonpituudet ja annokset eivät saisi olla liian tuhoisia testijärjestelmälle; tällainen vaikutus olisi mm. lämmön muodostuminen (infrapuna-alue).

Auringonvalon simulointia pidetään parhaimpana valolähteenä. Sekä ksenonkaarilamppuja että (seostettuja) elohopeahalidikaarilamppuja käytetään auringonvalosimulaattoreissa. Jälkimmäisillä on se etu, että ne muodostavat vähemmän lämpöä ja ovat halvempia, mutta niiden spektri ei täysin vastaa auringonvalon spektriä. Koska kaikki auringonvalosimulaattorit lähettävät huomattavia määriä UVB-valoa, ne pitäisi suodattaa sopivasti erittäin solumyrkyllisten UVB-aallonpituuksien vaimentamiseksi.

In vitro 3T3 NRU-valomyrkyllisyystestiä varten olisi käytettävä säteilyspektriä, jossa ei käytännöllisesti katsoen ole UVB-valoa (UVA:UVB ~ 1:20). Yksi esimerkki *in vitro* 3T3 NRU-valomyrkyllisyystestin validointitutkimuksessa käytetyn suodatetun auringonvalosimulaattorin säteilyspektrijakaumasta on julkaistu (3).

Dosimetria: Valon voimakkuus (säteilyvoimakkuus, radianssi) olisi tarkistettava säännöllisesti ennen jokaista valomyrkyllisyystestiä käyttämällä sopivaa leveäkaistaista UV-mittaria. UV-mittarin on oltava kalibroitu valolähteen suhteen. Sen suorituskkyky pitäisi tarkistaa, mitä varten suositetaan toisen, samantyyppisen ja täysin samalla tavalla kalibroidun vertailu-UV-mittarin käyttöä. Olisi toivottavaa, että tasaisin välein käytettäisiin spektrosäteilymittaria suodatetun valolähteen säteilyvoimakkuusspektrin mittaamiseen ja leveäkaista-UV-mittarin kalibroimiseen, mutta tällaiset laitteet vaativat asianmukaisesti koulutettua ammattihenkilöstöä niitä käyttämään.

Validointitutkimuksessa todettiin, että annos 5 J/cm² (UVA) ei ollut myrkyllinen Balb/c 3T3 -soluille ja että se pystyi eksitoimaan jopa heikosti valomyrkyllisiä kemikaaleja. Jotta saavutetaan arvo 5 J/cm² 50 minuutin aikana, säteilyvoimakkuus on säädettävä arvoon 1,666 mW/cm². Jos käytetään muuta solulinjaa tai eri valolähdettä, UVA-annosta voi olla tarpeen mukauttaa hiukan ottaen huomioon, että se ei saa vahingoittaa soluja, mutta sen on oltava riittävä valomyrkyllisten standardiaineiden osoittamiseksi. Valoaltistusaika lasketaan seuraavasti:

$$t(\text{min}) = \frac{\text{säteilytysannos (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{säteilyvoimakkuus (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

1.7.2 Testiolosuhteet

Testikemikaalin enimmäispitoisuus ei saisi olla suurempi kuin 100 µg/ml, koska kaikki valomyrkylliset kemikaalit on osoitettu alemmissa pitoisuuksissa, kun taas korkeimmilla pitoisuuksilla väärin positiivisten tulosten määrä nousee (13). Testikemikaalin pH:n pitäisi olla sopiva suurimmassa pitoisuudessa (välillä 6,5 – 7,8).

UVA-valon kanssa (+UVA) ja ilman sitä (-UVA) testattavan kemikaalin pitoisuusalue on määritettävä riittävän laajasti edeltävissä pitoisuusalueenmäärittelykokeissa. Pitoisuussarjan vaihtelualue ja yksittäiset pitoisuudet on asetettava siten, että koetuloksia on riittävästi pitoisuus-vastekuvaajan laatimiseksi. Pitoisuussarjan olisi oltava geometrinen (vakio laimennuskerroin).

1.7.3 **Testimenetelmä¹**

1.7.3.1 *1. päivä*

Valmistetaan viljelyneesteeseen solususpensio, jossa on 1×10^5 solua/ml, ja 100 μ l viljelynestettä pipetoidaan 96-mikrotitterikuoppalevyn laitimmaisiiin kuoppiin (= nollakokeet). Muihin kuoppiin pipetoidaan 100 μ l solususpensiota, jossa on 1×10^5 solua/ml (= 1×10^4 solua/kuoppa). Kutakin testikemikaalia varten valmistetaan kaksi kuoppalevyä: yksi sytotoksisuuden määrittystä varten (-UVA) ja toinen fotosytotoksisuuden määrittystä varten (+UVA).

Soluja inkuboidaan 24 h (7,5 % CO₂, 37 °C), kunnes ne muodostavat puoliksi konfluentin yhden solun vahvuisen kerroksen. Tässä ajassa solut toipuvat ja tarttuvat levyn pohjaan sekä aloittavat eksponentiaalisen kasvun.

1.7.3.2 *2. päivä*

Inkubaation jälkeen viljelyneeste kaadetaan kuopista pois ja solut pestään kahdesti 150 μ l:lla EBSS/PBS:ää kuoppaa kohti. Lisätään 100 μ l EBSS/PBS:ää, jossa on testikemikaalia tai ainoastaan liuotinta (negatiivinen kontrolli). Kuoppiin lisätään 8 eri pitoisuutta testikemikaalia. Soluja inkuboidaan testikemikaalin kanssa pimeässä 60 minuuttia (7,5 % CO₂, 37 °C).

Testin (+UVA)-osaa varten soluja säteilytetään huoneenlämpötilassa 50 minuuttia 96-kuoppalevyn kannen läpi valolla, jonka voimakkuus on 1,7 mW/cm² UVA (= 5 J/cm²). Vesihöyryn tiivistyminen kuoppalevyn kannen alle estetään tuulettimella. Rinnakkaislevyt (-UVA) pidetään huoneenlämpötilassa pimeässä laatikossa 50 min (= UVA-altistus aika).

Testiliuos kaadetaan pois ja solut pestään kahdesti 150 μ l:lla EBSS/PBS:ää. EBSS/PBS korvataan viljelyneesteellä, ja soluja inkuboidaan (7,5 % CO₂, 37 °C) yli yön (18–22 h).

1.7.3.3 *3. päivä*

Mikroskooppitutkimus

Soluja tutkitaan faasikontrastimikroskoopissa. Kirjataan solujen muodonmuutokset, jotka johtuvat testikemikaalin myrkyllisistä vaikutuksista. Tätä kontrollia suositellaan koevirheiden eliminoimiseksi, mutta näitä muistiinpanoja ei käytetä sytotoksisuuden tai fotosytotoksisuuden arvioinnissa.

Neutraalipunatesti

Solut pestään 150 μ l:lla esilämmitettyä EBSS/PBS:ää. Pesuliuos kaadetaan pois ravistamalla levyä varovasti. Kuoppiin lisätään 100 μ l NR-viljelynestettä ja soluja inkuboidaan 3 tunnin ajan 37 °C:ssa kostutetussa ilmakehässä, jossa on 7,5 % CO₂.

Inkubaation jälkeen NR-viljelyneeste poistetaan ja solut pestään 150 μ l:lla BSS/PBS:ää. EBSS/PBS kaadetaan pois ja kuopat kuivataan täysin imeyttäen neste paperiin. (*Vaihtoehtoisesti*: alassuun käännetty kuoppalevy sentrifugoidaan.)

Lisätään tarkasti 150 μ l NR-desorbointiliuosta (juuri valmistettu etanoli/etikkahappo).

Mikrotitterilevyä ravistetaan nopeasti ravistajassa 10 minuutin ajan, kunnes NR on uuttunut soluista ja muodostanut tasaisen liuoksen.

NR-uutteen optinen tiheys luetaan aallonpituudella 540 nm spektrofotometrissä käyttäen vertailuliuksena nollanäytteitä. Mittaustulokset tallennetaan sopivassa muodossa (esim. ASCII) myöhempää analysointia varten.

¹ Lisätietoja annetaan viitteessä (12).

2 MITTAUSTULOKSET

2.1 MITTAUSTULOSTEN LAATU JA MÄÄRÄ

Mittaustulosten avulla pitäisi voida analysoida järkevästi UVA-valon tai näkyvän valon kanssa ja ilman sitä saadut pitoisuusvasteet. Jos havaitaan sytotoksisuutta, sekä pitoisuusalue että yksittäiset pitoisuudet on valittava siten, että koetuloksiin voidaan sovittaa kuvaaja. Koska on mahdollista, että testikemikaali ei ole myrkyllinen soluille edes määritellyssä pitoisuusrajassa 100 µg/ml pimeäkokeessa (-UVA), mutta on erittäin myrkyllinen soluille säteilytettäessä (+UVA), voi olla tarpeen valita kokeen kummassakin osassa testattavat pitoisuusalueet siten, että ne eroavat toisistaan jopa useita kymmenen potensseja, jotta mittaustulosten riittävää laatua koskevat vaatimukset täyttyvät. Jos kokeen kummassakaan osassa (-UVA ja +UVA) ei havaita solumyrkyllisyyttä, riittää testaamiseen korkeimpaan pitoisuuteen asti siten, että yksittäisten annosten välillä on pitkä väli.

Selvästi positiivista tulosta ei tarvitse tarkistaa toistamalla koetta. Myöskään selvästi negatiivisia tuloksia ei tarvitse tarkistaa, jos testikemikaali on testattu riittävän korkeissa pitoisuuksissa. Tällaisissa tapauksissa riittää yksi koe, jota tukee yksi tai useampia pitoisuusaluetta määrittäviä alustavia kokeita.

Testit, joissa on saatu lähellä ennustemallin erotusrajaa olevia tuloksia, olisi toistettava tulosten tarkistuksen vuoksi.

Jos testin toistaminen katsotaan tarpeelliseksi, koeolosuhteiden muuttaminen voi olla tärkeää selvän tuloksen saamiseksi. Keskeinen muuttuja tässä testissä on testikemikaaliuosten valmistaminen. Valmistusolosuhteiden (muut liuottimet, hienontaminen, ultraäänihajotus) muuntelu voi siksi olla tarkoituksenmukaisinta testiä toistettaessa. Vaihtoehtoisesti voidaan harkita säteilytystä edeltävän esi-inkubaatioajan muuntelua. Vedessä hajoaville kemikaaleille voi lyhyt aika olla tarkoituksenmukainen.

2.2 TULOSTEN KÄSITTELY

Aina kun on mahdollista, määritetään testikemikaalin pitoisuus, joka vastaa 50 prosentin laskua solujen NRU-otossa (EC₅₀). Tämä voidaan tehdä soveltamalla pitoisuus-vastetuloksiin mitä tahansa sopivaa ei-lineaarista regressiomenetelmää (mieluiten Hill-funktiota tai logistista regressiota) tai käyttämällä muita sovitusmenetelmiä (14). Ennen kuin EC₅₀:tä käytetään laskuissa, sovituksen laatu olisi tarkastettava asianmukaisesti. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää graafisia sovitusmenetelmiä EC₅₀:n laskemiseksi. Tällöin suositellaan todennäköisyyspaperin käyttöä (x-akseli: log, y-akseli: probiitti), sillä usein pitoisuus-vastefunktio tulee melkein lineaarisesti tämän muunnoksen jälkeen.

2.3 TULOSTEN ARVIOINTI (ENNUSTEMALLIT)

2.3.1 *Ennustemalli versio 1: Valoärsyttävyystekijä (PIF)*

Jos molemmissa tapauksissa – sekä UVA-valon kanssa (+UVA) että ilman sitä (-UVA) – saadaan täydelliset pitoisuus-vastekuvaajat, voidaan valoärsyttävyystekijä (PIF) laskea seuraavasta kaavasta:

$$a) \quad PIF = \frac{EC_{50}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Jos $PIF < 5$, ennuste on "ei valomyrkyllisyyspotentiaalia", kun taas $PIF \geq 5$ ennustaa valomyrkyllisyyspotentiaalin olemassaoloa.

Jos kemikaali on solumyrkyllinen ainoastaan UVA-valon kanssa testatessa mutta ei ilman sitä, PIF:iä ei voida laskea, vaikka tulos viittaakin valomyrkyllisyyspotentiaaliin. Tällöin voidaan laskea "> PIF", jos ilman UV-valoa tehtävä solumyrkyllisyydestä tehdään suurimmalla testipitoisuudella (C_{max}) ja tätä arvoa käytetään "> PIF":n laskemiseen:

$$b) \quad > PIF = \frac{C_{\max}(-UV)}{EC_{50}(+UV)}$$

Jos saadaan ainoastaan arvo "> PIF", kaikki arvot >1 ennustavat valomyrkyllisyyspotentiaalia.

Jos ei voida laskea sen enempää arvoa EC₅₀ (-UV) kuin arvoa EC₅₀ (+UV), koska kemikaali ei osoita solumyrkyllisyyttä korkeimmassakaan pitoisuudessa, tulos merkitsee, ettei kemikaalilla ole valomyrkyllisyyspotentiaalia. Tällöin käytetään muodollista arvoa "PIF = *1" karakterisoimaan tulosta:

$$c) \quad PIF = *1 = \frac{C_{\max}(-UV)}{C_{\max}(+UV)}$$

Jos saadaan ainoastaan arvo "PIF = *1", ennuste on "ei valomyrkyllistä potentiaalia".

Tapauksissa b ja c on valomyrkyllisyyspotentiaalia arvioitaessa huolellisesti tarkasteltava niitä pitoisuuksia, jotka saatiin *in vitro* 3T3 NRU-valomyrkyllisyystestissä.

2.3.2 *Ennustemalli versio 2: Keskimääräinen valovaikutus (MPE)*

Vaihtoehtoisesti voidaan soveltaa uutta valomyrkyllisyyspotentiaalin ennustamiseen tarkoitettua mallia, joka on kehitetty käyttäen EU/COLIPA-validointitutkimuksen (15) tietoja ja testattu sokkokeolosuhteissa myöhemmässä UV-suodinkemikaalien *in vitro* valomyrkyllisyystutkimuksessa (13). Tässä mallissa ei esiinny PIF-mallin rajoitusta silloin, kun EC₅₀-arvoa ei voida saada. Mallissa käytetään "keskimääräistä valovaikutusta" (MPE). Se on suure, joka perustuu täydellisten pitoisuus-vastekuvaajien vertaamiseen. MPE-mallin soveltamiseen kehitettiin Humboldt-yliopistossa (Berliini) erityinen tietokoneohjelma, jonka saa maksutta käyttöön.

2.4 TULOSTEN TULKINTA

Positiivinen tulos *in vitro* 3T3 NRU-valomyrkyllisyystestissä (PIF ≥ 5 tai MPE $\geq 0,1$) merkitsee, että testikemikaalilla on valomyrkyllisyyspotentiaalia. Jos tämä tulos saadaan pitoisuuksilla, jotka ovat pienemmät kuin 10 $\mu\text{g/ml}$, testikemikaali on myös todennäköisesti valomyrkyllinen erilaisissa altistusolosuhteissa *in vivo*. Jos positiivinen tulos saadaan vain suurimmalla testipitoisuudella 100 $\mu\text{g/ml}$, voi vaaran arviointia tai valomyrkyllisyyspotentiaalin arviointia varten olla tarpeen hankkia lisätietoja esimerkiksi kemikaalin kyvystä läpäistä iho sekä sen imeytymisestä ja mahdollisesta kertymisestä ihoon, tai kemikaali on testattava muulla testillä vahvistusta varten, esim. ihmisihoa käyttävällä *in vitro* testillä.

Negatiivinen tulos *in vitro* 3T3 NRU-valomyrkyllisyystestissä (PIF < 5 tai MPE $< 0,1$) merkitsee, että testiaine ei ollut valomyrkyllinen kyseisille nisäkässoluille käytetyissä olosuhteissa. Jos kemikaali pystyttiin testaamaan suurimmassakin pitoisuudessa 100 $\mu\text{g/ml}$, negatiivinen tulos merkitsee, ettei kemikaalilla ole valomyrkyllisyyspotentiaalia, ja valomyrkyllisyys *in vivo* voidaan katsoa epätodennäköiseksi. Tapauksissa, joissa samat pitoisuus-myrkyllisyysvasteet (EC₅₀+UV ja EC₅₀-UV) on saatu pienemmillä pitoisuuksilla, tulokset tulkittaisiin samalla tavalla. Jos sitä vastoin myrkyllisyyttä ei voida osoittaa (+UV ja -UV) ja jos aineen liukenemattomuus veteen rajoittaa pitoisuudet pienemmiksi kuin 100 $\mu\text{g/ml}$, voidaan asettaa kyseenalaiseksi, sopiiko testiaine kyseiseen määrittelyyn, ja on harkittava vahvistavaa määrittelyä (esim. käyttämällä *in vitro* -ihomallia, *ex vivo* -ihomallia tai *in vivo* -testiä).

3 RAPORTOINTI

TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

Testikemikaali:

- tunnistetiedot ja CAS-numero, jos se tiedetään
- fysikaalinen olomuoto ja puhtaus
- fysikokemialliset ominaisuudet, jotka vaikuttavat tutkimuksen tekemiseen
- stabiilius ja valostabiilius, jos tunnetaan

Liutin:

- perustelut liuottimen valinnalle
- testikemikaalin liukoisuus tähän liuottimeen
- liuottimen pitoisuus prosentteina käsittelynestessä (EBSS tai PBS)

Solut:

- solujen tyyppi ja lähde
- onko soluissa mykoplasmaa
- solujen siirrostusjärjestysluku, jos se tiedetään
- solujen herkkyys UVA:lle määritettynä sillä säteilylaitteella, jota käytetään *in vitro* 3T3 NRU-valomyrkyllisyystestissä

Testiolosuhteet a: inkubointi ennen käsittelyä ja sen jälkeen

- viljelynesteen tyyppi ja koostumus
- inkubaatio-olosuhteet (CO₂-pitoisuus, lämpötila, kosteus)
- inkubaatioaika (esikäsitteily, jälkikäsitteily)

Testiolosuhteet b: käsittely kemikaalilla:

- perustelut testikemikaalin pitoisuuksien valintaan käytettäväksi sekä UV-valon / näkyvän valon kanssa että ilman sitä
- jos testikemikaali on huonoliukoinen eikä osoita solumyrkyllisyyttä, perustelut suurimmalle testatulle pitoisuudelle
- käsittelynesteen tyyppi ja koostumus (puskuroitu suolaliuos)
- kemikaalikäsittelyn kesto

Testiolosuhteet c: säteilytys:

- perustelut käytetyn valolähteen valinnalle
- valolähteen säteilyspektrin ominaisuudet
- käytetyn suotimen (käytettyjen suotimien) transmissio - ja absorptio-ominaisuudet
- säteilymittarin ominaisuudet ja sen kalibrointi yksityiskohtaisesti
- valolähteen etäisyys testijärjestelmästä
- UVA-säteilyn voimakkuus kyseisellä etäisyydellä, mW/cm²
- UV-altistuksen tai näkyvälle valolle altistuksen kesto
- UVA-annos (säteilyvoimakkuus × aika), ilmaistuna laatuna J/cm²
- soluviljelmien lämpötila säteilytyksen aikana ja samanaikaisesti pimeässä pidettyjen soluviljelmien lämpötila

Testiolosuhteet d: NRU-testi

- NR-nesteen koostumus
- NR-inkubaation kesto
- inkubaatio-olosuhteet (CO₂-pitoisuus, lämpötila, kosteus)
- NR-uutto-olosuhteet (uuttoaine, kesto)
- aallonpituus, jolla NR:n optinen tiheys luettiin spektrofotometrillä
- toinen (vertailu-) aallonpituus, jos sellaista käytettiin
- spektrofotometrin mahdollisen nollaliuoksen sisältö

Tulokset

- solujen elinkykyisyys, joka on saatu kullekin testikemikaalin pitoisuudelle, ilmaistuna prosentteina kontrollien keskimääräisestä elinkykyisyydestä
- pitoisuus-vastekuvaajat (testikemikaalin pitoisuus vs. suhteellinen solujen elinkykyisyys), joka on saatu samanaikaisesti tehdyissä (+UVA)- ja (-UVA)-kokeissa
- pitoisuus-vastekuvaajien tietojen analyysi; jos mahdollista, lasketaan EC₅₀ (+UVA) ja EC₅₀ (-UVA)
- niiden kahden pitoisuus-vastekuvaajan vertailu, jotka on saatu UVA-valon tai näkyvän valon kanssa ja ilman sitä, joko laskemalla valoärsyttävyystekijä (PIF) tai laskemalla keskimääräinen valovaikutus (MPE)
- valomyrkyllisyyspotentiaaliln luokitus
- testin hyväksyttävyysskriteerit, a: *samanaikainen negatiivinen kontrolli*:
 - säteilytettyjen ja säteilyttämättömien solujen absoluuttinen elävyys (NR-uutteen optinen tiheys)
 - negatiivista kontrollia koskevat aiemmat tiedot, keskiarvo ja vakiopoikkeama
- testin hyväksyttävyysskriteerit, b: *samanaikainen positiivinen kontrolli*:
 - positiivisen kontrollikemikaalin EC50(+UVA) ja EC50(-UVA) ja PIF
 - positiivista kontrollikemikaalia koskevat aiemmat tiedot: EC50(+UVA) ja EC50(-UVA) ja PIF, keskiarvo ja vakiopoikkeama

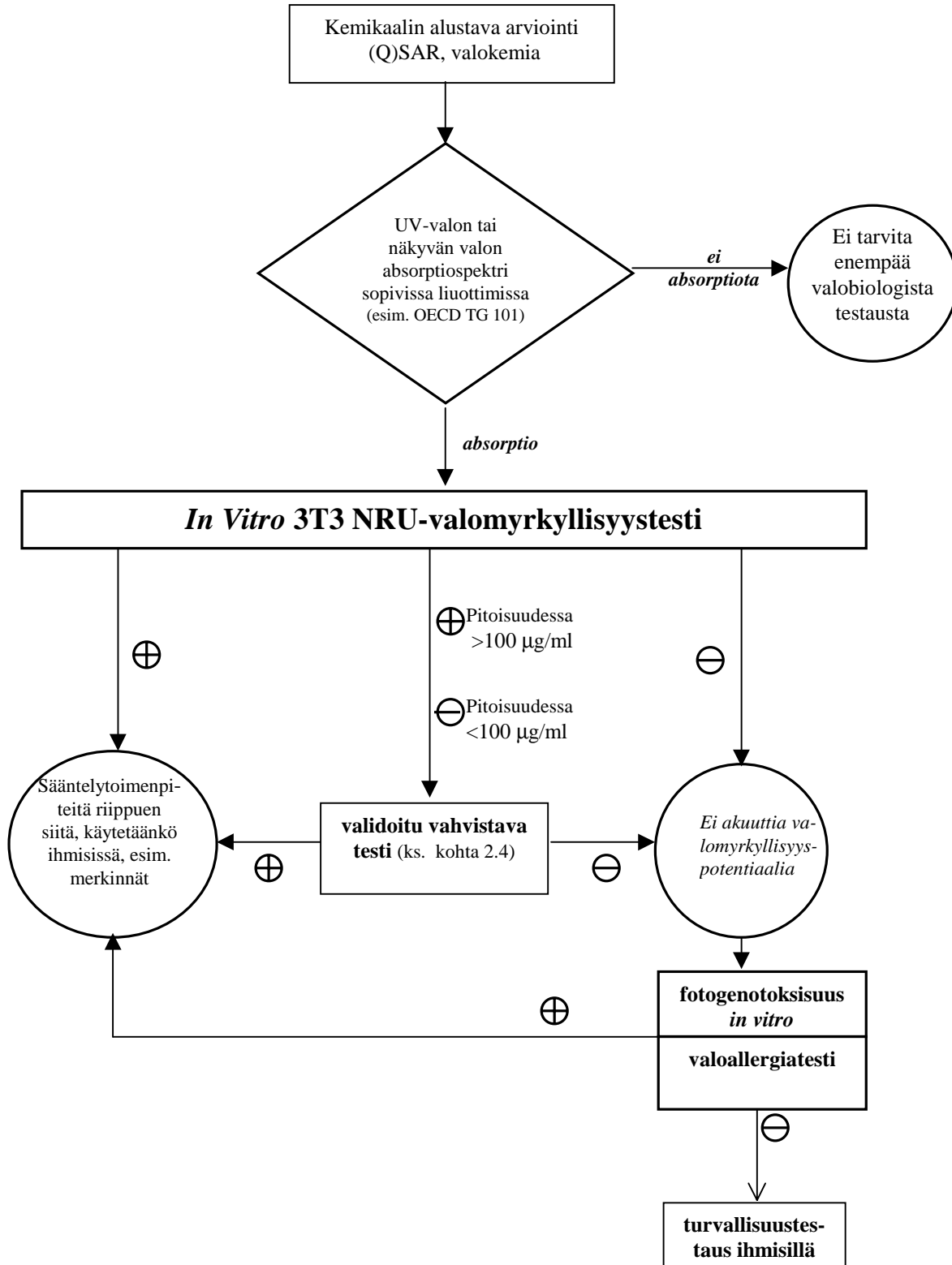
Tulosten tarkastelu

Päätelmät

1. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicology in Vitro* **8**, 793-796.
2. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA **26**, 7-8.
3. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W and Brantom, P. (1998) EU/COLIPA "In vitro phototoxicity" validation study, results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxicology in Vitro* **12**, 305-327.
4. OECD Test Guidelines Programme, ENV/MC/CHEM/TG(96)9: Final Report of the OECD Workshop on Harmonisation of Validation and Acceptance Criteria of Alternative Toxicological Test Methods - *OECD Publications Office*, Paris, 1996.
5. Lovell W. W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxicology in Vitro* **7**, 95-102.
6. 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, pp. XI-XXXV.
7. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA **22**, 314-348.
8. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of photobiology"; edited by KC Smith. Plenum Press, New York; 2nd edition, pp. 79-110.
9. Borenfreund, E. and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **24**, 119-124.
10. Lambert L. A, Warner W.G. and Kornhauser A. (1996). Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology"; edited by FN Marzulli and HI Maibach. Published by Taylor & Francis, Washington DC; 5th Edition, pp. 515-530.
11. Tyrrell R. M. and Pidoux M (1987). Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Research* **47**, 1825-1829.
12. ZEBET / ECVAM / COLIPA - Standard Operating Procedure: Balb/c 3T3 NRU Phototoxicity Test. Drafted 23 December 1997 by M. Liebsch and approved 6 March 1998 by the Management Team of the EU/COLIPA project "In Vitro Photoirritation".
13. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W. and Pfannenbecker (1998). A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test. ATLA **26**, 679-708.
14. Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. *Journal of Biological Systems* **3**, 127-138.
15. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA **25**, 445-462.

LIITE 1

3T3 NRU-valomyrkyllisyystestin asema kemikaalien valomyrkyllisyyden testauksessa



C.13 BOKERTYVYYS: TESTI KALOILLA LÄPIVIRTAUSOLOSUHTEISSA

1. MENETELMÄ

Tämä biokertyvyysmenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 305 (1996).

1.1. JOHDANTO

Tällä menetelmällä karakterisoidaan kemiallisten aineiden biokertymispotentiaalia kaloihin läpivirtausolosuhteissa. Vaikka läpivirtausolosuhteissa suoritettu testaus on paras, puolistaattiset olosuhteet ovat hyväksyttäviä, jos validiteetti on varmistettu.

Menetelmässä annetaan riittävän tarkat ohjeet testin suorittamiseksi samalla kun on mahdollista mukauttaa koejärjestelyä laboratorioiden erityisolosuhteisiin ja testattavien aineiden erilaisiin ominaisuuksiin. Luotettavimmin voidaan testata stabiileja orgaanisia aineita, joiden $\log P_{ow}$ -arvot ovat 1,5 - 6,0(1), mutta myös erityisen lipofiilisiä aineita ($\log P_{ow} > 6.0$). Alustava arvio tällaisten erityisen lipofiilisten aineiden biokertyvyystekijälle (bioconcentration factor, BCF), josta käytetään joskus merkintää K_B , on todennäköisesti korkeampi kuin laboratoriokokeista saatava biokertyvyystekijä tasapainotilassa (BCF_{SS}). Orgaanisille aineille, joiden $\log P_{ow}$ -arvot saattavat olla jopa 9,0, voidaan saada biokertyvyystekijän alustavia arvioita Binteinin et al (2) yhtälön avulla. Biokertyvyyspotentiaalia luonnehtivia muuttujia ovat mm. kertymävakio (k_1), poistumavakio (k_2) ja BCF_{SS} .

Radioaktiivisilla isotoopeilla leimatut aineet saattavat helpottaa vesi- ja kalanäytteiden analysointia, ja niitä voi käyttää sen arvioimiseksi, onko hajoamistuotteet tunnistettava ja kvantifioitava. Jos mitataan radioaktiivisten jäämien kokonaismäärä (esim. polttamalla tai kudosta liuottamalla), BCF perustuu perusyhdisteeseen, mahdollisesti jäljellä oleviin aineenvaihduntatuotteisiin sekä assimiloituneeseen hiileen. Radioaktiivisten jäämien kokonaismäärään perustuva BCF ei siis ole välttämättä suoraan verrattavissa BCF:ään, joka on johdettu pelkästään perusyhdisteen spesifisestä kemiallisesta analyysistä.

Jos käytetään radioaktiivisia leimoja, voidaan tehdä puhdistustoimenpiteitä perusyhdisteeseen perustuvan BCF:n määrittämiseksi, ja tärkeimmät aineenvaihduntatuotteet voidaan karakterisoida, jos se katsotaan tarpeelliseksi. On myös mahdollista yhdistää kalan aineenvaihduntatutkimus ja biokertyvyystutkimus, jossa kudoksissa esiintyvät jäämät analysoidaan ja tunnistetaan.

1.2. MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Biokertyvyys (biokonsentraatio) on organismissa tai sen pinnalla (sen tietyssä kudoksessa) olevan testattavan aineen pitoisuuden lisääntyminen verrattuna testattavan aineen pitoisuuteen väliaineessa.

Biokertyvyystekijä (bioconcentration factor BCF tai K_B) minä tahansa tämän kertyvyystestin kertymävaiheen ajankohtana on testattavan aineen pitoisuus kalassa (kalan pinnalla) tai tietyssä kalan kudoksessa [C_f , $\mu\text{g/ml}$ (ppm)] jaettuna kyseisen aineen pitoisuudella väliaineessa [C_w , $\mu\text{g/ml}$ (ppm)].

Biokertyvyystekijä tasapainotilassa (steady state) (BCF_{SS} tai K_B) ei muutu merkittävästi pitkän ajanjakson aikana, kun testattavan aineen pitoisuus väliaineessa on vakio tänä aikana.

Tasapainotila saavutetaan kalassa esiintyvän testattavan aineen määrää (C_f) ajan funktiona esittävässä käyrässä silloin, kun käyrä on aika-akselin suuntainen, kolme peräkkäistä vähintään kahden vuorokauden välein otetuista näytteistä tehtyä C_f -määritystä ovat samat ± 20 prosenttia eikä näiden kolmen näyteenottoajanjakson välillä ole merkittäviä eroja. Yhdistettyjä näytteitä määritettäessä vaaditaan vähintään neljä peräkkäistä määritystä. Kun testataan aineita, joiden kertyminen kudoksiin tapahtuu hitaasti, välit voivat olla pikemminkin seitsemän vuorokautta.

Biokertyvyystekijöitä, jotka lasketaan suoraan kineettisistä nopeusvakioista (k_1/k_2), sanotaan kineettisiksi kertyvyystekijöiksi BCF_K .

Oktanoli-vesi -jakautumiskerroin (P_{ow}) on kemiallisen aineen n-oktanoliliukoisuuden ja vesiliukoisuuden suhde tasapainotilassa (menetelmä A.8), josta käytetään myös merkintää K_{ow} . P_{ow} :n logaritmia käytetään merkitsemään kemiallisen aineen biokertyvyyttä vesieliöissä.

Altistumis- eli kertymisvaihe on aika, jona kalat altistetaan testattavalle kemikaalille.

Kertymävakio k_1 on numeerinen arvo, joka määrittelee testattavan aineen pitoisuuden lisääntymisen nopeuden kalassa tai kalan pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa), kun kalat altistetaan kyseiselle kemikaalille (k_1 :n laatu on päivää⁻¹).

Poistumavaihe (altistuksen jälkeinen vaihe) on se ajanjakso (sen jälkeen kun testattavat kalat on siirretty testattavaa ainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta), jonka aikana kyseisen aineen (netto)poistumaa testattavista kaloista (tai niiden tietyistä kudoksista) tutkitaan.

Poistumavakio (k_2) on numeerinen arvo, joka kuvaa testattavan aineen pitoisuuden alenemisen nopeutta kalassa (tai sen tietyssä kudoksessa), kun kalat on siirretty testattavaa ainetta sisältävästä väliaineesta sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole kyseistä ainetta (k_2 :n laatu on päivää⁻¹).

1.3. TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Testissä on kaksi vaihetta: kertymävaihe (altistusvaihe) ja poistumavaihe (altistuksen jälkeinen vaihe). Kertymävaiheessa yhtä lajia olevat erilliset kalaryhmät altistetaan vähintään kahdelle testattavan aineen pitoisuudelle. Kalat siirretään tämän jälkeen poistumavaihetta varten sellaiseen väliaineeseen, jossa ei ole testattavaa ainetta. Kokeessa on aina oltava poistumavaihe, ellei aineen kertyminen kertymisvaiheen aikana ole ollut mitättömän pieni (esim. BCF alle 10). Testattavan aineen pitoisuutta kalassa tai kalan pinnalla (tai sen tietyssä kudoksessa) seurataan testin molempien vaiheiden aikana. Kahden testipitoisuuden lisäksi pidetään kalojen vertailuryhmää samoissa olosuhteissa (lukuun ottamatta testattavan aineen läsnäoloa), jotta biokertyvyyskokeessa mahdollisesti havaittavia haitallisia vaikutuksia voidaan verrata vertailukelpoiseen vertailuryhmään ja jotta saadaan testattavan aineen taustapitoisuudet.

Kertymisvaihe on 28 vuorokautta, jollei osoiteta, että tasapainotila on saavutettu aikaisemmin. Kertymisvaiheen kestoa ja tasapainotilan saavuttamiseen tarvittavaa aikaa voidaan ennustaa liitteessä 3 olevan yhtälön avulla. Poistumavaihe aloitetaan siirtämällä kalat puhtaaseen kammioon samaan väliaineeseen, jossa ei ole testattavaa ainetta. Biokertyvyystekijä lasketaan mahdollisuuksien mukaan sekä kalassa olevan pitoisuuden C_f ja vedessä olevan pitoisuuden C_w suhteena (BCF_{SS}), kun tasapainotila näyttää olevan saavutettu, että kineettisenä biokertyvyystekijänä (BCF_K) kertymävakion k_1 ja poistumavakion k_2 suhteena, kun oletetaan, että reaktio noudattaa ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos on ilmeistä, että reaktio ei noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, olisi käytettävä monimutkaisempia malleja (liite 5).

Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokaudessa, kertymävaihetta on pidennettävä, kunnes tasapainotila saavutetaan, tai 60 vuorokauteen, sen mukaan, kumpi on ensin; minkä jälkeen aloitetaan poistumavaihe.

Kertymävakio, poistumavakio (tai vakiot, jos käytetään monimutkaisempia malleja), biokertyvyystekijä ja mahdollisuuksien mukaan näiden muuttujien luottamusvälit lasketaan mallista, joka parhaiten kuvaa testattavan aineen mitattuja pitoisuuksia kaloissa ja vedessä.

BCF ilmaistaan kalan kokonaismärkäpainoa kohti. Erytyssyistä voi kuitenkin käyttää tiettyjä kudoksia tai elimiä (esim. lihas, maksa), jos kala on riittävän suurikokoinen tai jos se voidaan jakaa syötävään (filee) ja syömäkelvottomaan (sisälmykset) osaan. Koska monien orgaanisten aineiden biokertyvyyspotentiaalini ja lipofiilisyyden välillä on selvä suhde, on myös testattavan kalan rasvapitoisuuden ja kyseisten aineiden havaitun biokertyvyuden välillä vastaava suhde. Jotta tästä johtuvaa testitulosten vaihtelua hyvin lipofiilisten aineiden ($\log P_{ow} > 3$) osalta voidaan pienentää, biokertyvyys olisi ilmaistava sekä rasvapitoisuutta että kokonaiselopainoa kohti.

Rasvapitoisuus olisi mahdollisuuksien mukaan määritettävä samasta biologisesta aineksestä, jota käytetään testattavan aineen pitoisuuden määrittämiseksi.

1.4. TESTATTAVAA AINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Ennen biokertyvyystestin suorittamista pitäisi testattavasta aineesta olla käytettävissä seuraavat tiedot:

- a) aineen vesiliukoisuus
- b) oktanoli-vesi -jakautumiskerroin P_{ow} (josta käytetään myös merkintää K_{ow} , ja joka määritetään HPLC-menetelmällä, liite A.8)
- c) hydrolyysi
- d) valomuuntuminen vedessä määritettynä oikeassa tai jäljitellyssä auringonvalossa ja samoissa säteilyolosuhteissa kuin ne, joissa biokertyvyyskoe tehdään (3)
- e) pintajännitys (aineet, joiden $\log P_{ow}$:ta ei voida määrittää)
- f) höyrynpaine
- g) nopea biologinen hajoavuus (tapauksen mukaan).

Muita tarvittavia tietoja ovat toksisuus testissä käytettävälle kalalajille, mieluiten asymptoottinen (ajasta riippumaton) LC_{50} . Koeliuksissa ja biologisessa aineksessa olevan testattavan aineen kvantifioimiseksi täytyy olla käytettävissä sopiva määritysmenetelmä, jonka tarkkuus, täsmällisyys ja herkkyys tunnetaan, ja samoin on oltava olemassa näytteen valmistusta ja säilyttämistä koskevat yksityiskohtaiset tiedot. Testattavan aineen määritysraja sekä vedessä että kalan kudoksissa pitäisi myös olla tiedossa. Käytettäessä ^{14}C -merkittyä testattavaa ainetta on tunnettava epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden prosenttiosuus.

1.5. TESTIN LUOTETTAVUUS (VALIDITEETTI)

Testi on luotettava (validi), jos

- lämpötilavaihtelu on vähemmän kuin $\pm 2^\circ C$,
- liuenneen hapen pitoisuus ei laske alemmaksi kuin 60 % kyllästymisarvosta,
- testattavan aineen pitoisuus testauskammioissa pidetään 20 prosentin rajoissa kertymävaiheessa mitattujen arvojen keskiarvosta,
- kuolleisuus tai muut haitalliset vaikutukset tai sairaudet sekä vertailu- että koekaloissa on alle 10 % testin lopussa; jos koe kestää useita viikkoja tai kuukausia, kuolleisuuden tai muiden haitallisten vaikutusten olisi oltava molemmissa ryhmissä alle 5 % kuukautta kohti, eikä se saisi kaikkiaan olla enemmän kuin 30 %.

1.6. VERTAILUAINEET

Tunnetun biokertyvyyskyvyn omaavien vertailuyhdisteiden käyttö olisi hyödyllistä koejärjestelyjen tarkistamiseksi tarvittaessa. Vielä ei kuitenkaan voida suositella mitään tiettyjä aineita.

1.7. TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1. Laitteisto

Missään laitteiston osissa ei saisi käyttää materiaaleja, jotka voivat liueta, sorboitua tai uuttua ja vaikuttaa kaloihin haitallisesti. Tavallisia laatikon- tai lieriönmuotoisia säiliöitä, jotka on tehty kemiallisesti inertistä aineesta ja jotka ovat kooltaan sopivia syöttönopeus huomioon ottaen, voidaan käyttää. Pehmeää muovilettoa pitäisi käyttää mahdollisimman vähän. Mieluummin käytetään teflonista (R), ruostumattomasta teräksestä ja/tai lasista valmistettua putkea/letkua. Kokemus on osoittanut, että aineille, joilla on korkea adsorptiokerroin, kuten synteettiset pyretroidit, voi olla tarpeen käyttää silanoitua lasia. Tällöin välineet on heitettävä pois käytön jälkeen.

1.7.2.

Vesi

Testissä käytetään yleensä luonnon vettä, jonka on oltava pilaantumaton ja laadultaan tasaista. Laimennusveden on oltava laadultaan sellaista, että kokeeseen valitut kalat elävät siinä totuttautumisvaiheen ja testin aikana ilman, että niiden ulkonäössä tai käyttäytymisessä havaitaan mitään epänormaalia muutosta. Olisi ihanteellista pystyä osoittamaan, että koelaji elää, kasvaa ja lisääntyy laimennusvedessä (esim. laboratoriokasvatuksessa tai koko sukupolvenkierron käsittävissä toksisuustestissä). Vedestä on tunnettava ainakin pH, kovuus, kiinteiden aineiden kokonaispitoisuus, orgaanisissa yhdisteissä olevan hiilen kokonaismäärä ja mieluiten myös ammonium-ioni- ja nitriittipitoisuus sekä emäksisyys ja merieliöiden osalta suolapitoisuus. Kalojen hyvinvoinnille tärkeät tekijät tunnetaan hyvin, mutta liitteessä I annetaan suositeltavat enimmäispitoisuudet useille makean ja meriveden testivesien muuttujille.

Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. pH-arvo voi olla 6,0 - 8,5, mutta vaihtelun on pysyttävä tietyn testin ajan 0,5 pH-yksikön sisällä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta) tai vaikuta haitallisesti kalakannan vointiin, näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrittäviä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrittäviä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein).

Luonnosta peräisin olevien hiukkasten samoin kuin orgaanisen hiilen kokonaismäärän (TOC) laimennusvedessä olisi oltava mahdollisimman alhainen, jotta testiaine ei adsorboituisi orgaanisen aineen pintaan, mikä vähentäisi sen biologista hyötyosuutta (4). Suurin hyväksyttävä arvo on 5 mg/l hiukkasille (kuiva-aine, joka ei läpäise 0,45 µm:n suodatinta) ja 2 mg/l orgaanisen hiilen kokonaismäärälle (katso liite 1). Vesi on tarvittaessa suodatettava ennen käyttöä. Testattavista kaloista (ulosteet) ja ruoanjätteistä peräisin olevan orgaanisen hiilen määrän pitäisi olla mahdollisimman alhainen. Koko testin aikana orgaanisen hiilen pitoisuus testausastiasa ei saa ylittää testattavasta aineesta ja mahdollisesti käytetystä liuotusaineesta peräisin olevaa pitoisuutta yli 10 milligrammalla litraa kohti (±20 %).

1.7.3.

Testiliuokset

Testattavasta aineesta tehdään kantaliuos, jonka pitoisuus on sopiva. Kantaliuos valmistetaan mieluiten joko sekoittamalla tai sekoittamalla voimakkaasti testattava aine laimennusveteen. Liuottimien tai liuotusaineiden (dispergoivien aineiden) käyttöä ei suositella. Niitä voi kuitenkin joskus käyttää, jotta saadaan tehdyksi väkevä kantaliuos. Sallittuja liuottimia ovat etanoli, metanoli, etyleeniglykolimonometyylietteri, etyleeniglykolidimetylietteri, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sallittuja liuotusaineita ovat Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metyyliiselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Testattava aine voi olla leimattu radioaktiivisella aineella ja sen pitäisi olla mahdollisimman puhdasta kemiallisesti (miehellään esimerkiksi yli 98-prosenttista).

Läpivirtaustestissä on käytettävä testattavan aineen kantaliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testikammioihin. Testikammioiden veden pitäisi vaihtua mielellään ainakin viisi kertaa vuorokaudessa. Läpivirtausmalli on paras, mutta jos sitä ei voida käyttää (jos se esimerkiksi haittaa testattavia eliöitä), voidaan käyttää puolistaattista järjestelmää, mikäli validiteettikriteerit täyttyvät. Kantaliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava sekä 48 h ennen testiä että vähintään kerran päivässä testin aikana. Tässä tarkistuksessa mitataan myös läpivirtausnopeus kaikissa testikammioissa ja varmistetaan, ettei se vaihtele yli 20 % yhdessä kammiossa tai kammioiden välillä.

1.7.4.

Lajin valinta

Tärkeitä perusteita lajin valinnassa ovat se, että lajia on helposti saatavilla, sitä voi saada sopivan kokoisina yksilöinä ja sitä voidaan helposti ylläpitää laboratoriossa. Muita perusteita kalalajin valitsemiselle voivat olla virkistyskäyttö, kaupallinen tai ekologinen merkitys sekä samanlainen herkkyyys, onnistunut käyttö aikaisemmin ym.

Suosittelvat lajit luetellaan liitteessä 2. Muita lajeja voidaan käyttää, mutta testausmenetelmää voi joutua muuttamaan siten, että saadaan sopivat koeolosuhteet. Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin valitsemiseen ja koemenetelmä.

1.7.5. *Kalojen olosuhteet testauskammioissa*

Kalojen kantapopulaatiota totutetaan vähintään kahden viikon ajan testauslämpötilassa ja kaloja ruokitaan riittävästi ja samantyyppisellä rehulla kuin se, jota annetaan testin aikana.

Kuolleiden kalojen määrä kirjataan 48 tunnin alkutututtelun jälkeen, jonka jälkeen noudatetaan seuraavia periaatteita:

- jos kuolleita kaloja on yli 10 % populaatiosta seitsemän vuorokauden aikana, koko erä hylätään,
- jos kuolleita kaloja on 5 - 10 % populaatiosta seitsemän vuorokauden aikana, kaloja totutetaan vielä seitsemän vuorokautta,
- jos kuolleita kaloja on alle 5 % populaatiosta seitsemän vuorokauden aikana, erä hyväksytään, mutta jos kuolleita on yli 5 % seuraavien seitsemän vuorokauden aikana, koko erä hylätään.

On tarkastettava, ettei testeissä käytettävissä kaloissa ole havaittavia tauteja tai poikkeavuuksia. Sairaast kalat on heitettävä pois. Kaloja ei saisi hoitaa sairauden takia kahden viikon aikana ennen testiä tai testin aikana.

1.8. TESTIN SUORITTAMINEN

1.8.1. *Esitesti*

Voi olla hyvä tehdä esitesti lopullisen kokeen olosuhteiden optimoimiseksi, esim. testattavan aineen pitoisuuden (pitoisuuksien) valitseminen, kertymä- ja poistumavaiheen kesto.

1.8.2. *Altistumisolosuhteet*

1.8.2.1. Kertymävaiheen kesto

Kertymävaiheen kestoa voi arvioida käytännön kokemuksen perusteella (esim. aiemmasta kemikaalin kertyvyystutkimuksesta) tai tietyistä kokemuseräisistä suhteista käyttämällä joko testattavan aineen vesiliukoisuutta tai oktanoli-vesi -jakaantumiskerrointa koskevia tietoja (ks. liite 3).

Kertymävaiheen on kestettävä 28 vuorokautta, ellei voida osoittaa, että tasapainotila on saavutettu aikaisemmin. Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokauden kuluessa, kertymävaihetta jatketaan ja mittauksia tehdään, kunnes tasapainotila saavutetaan tai 60 vuorokautta on kulunut, sen mukaan, kumpi tapahtuu aiemmin.

1.8.2.2. Poistumavaiheen kesto

Puolet kertymävaiheesta riittää tavallisesti asianmukaiseen (esim. 95 %) vähenemiseen kalaan kertyneessä aineessa (katso liite 3, arvioinnin selostus). Jos 95 prosentin vähenemiseen pääseminen kestää erittäin kauan, esimerkiksi yli kaksi kertaa kertymävaiheen normaali kesto (ts. yli 56 vuorokautta), voidaan hyväksyä lyhyempi aika (ts. kunnes testattavan aineen pitoisuus on alle 10 % tasapainotilasta). Jos aineen kertymä- ja poistumakinetiikka on monimutkaisempi kuin yhden osaston mallissa, jota voidaan kuvata ensimmäisen asteen kinetiikalla, on poistumavaiheen oltava pitempi poistumavaiheen määrittämiseksi. Tämä aika voidaan kuitenkin määrätä esim. sen perusteella, kuinka kauan testattavan aineen pitoisuus kalassa pysyy määritysrajan yläpuolella.

1.8.2.3. Testikalorien määrä

Kalojen lukumäärän jokaista testipitoisuutta kohti on oltava sellainen, että on saatavilla vähintään neljä kalaa näytettä kohti. Jos tarvitaan suurempaa tilastotietoa, tarvitaan enemmän kaloja näytettä kohti.

Jos käytetään täysikasvuisia kaloja, ilmoitetaan, ovatko ne koiraita, naaraita vai molempia. Jos käytetään molempia sukupuolia, on osoitettava ennen totuttautumisvaihetta, että erot rasva-ainepitoisuudessa sukupuolien välillä ovat merkityksettömät. Määrittystä varten voi olla tarpeen yhdistää kaikki koiraat ja kaikki naarat.

Jokaiseen testiin on valittava samanpainoisia kaloja, jolloin pienimpien on painettava vähintään kaksi kolmasosaa suurimmista. Kaikkien pitäisi olla samaa vuosiluokkaa ja peräisin samasta lähteestä. Koska paino ja ikä näyttävät vaikuttavan joskus merkittävästi BCF-arvoihin (1), on ne kirjattava tarkasti. Suositellaan, että osa näyttekaloista punnitaan ennen testiä keskipainon arvioimiseksi.

1.8.2.4. Kalojen lastaaminen testikammioon

Vesimäärän on oltava suuri suhteessa kalojen määrään, jotta C_w laskee mahdollisimman vähän, kun kalat lisätään kammioon testin alussa, ja myös siksi, ettei liunneen hapen pitoisuus laske. On tärkeää, ettei kaloja lisätä kammioon liian nopeasti. Joka tapauksessa lastausnopeudeksi suositellaan normaalisti 0,1 - 1,0 g kalaa (märkäpainona) litraa vettä kohti vuorokaudessa. Lastaus voidaan tehdä nopeammin, jos osoitetaan, että testattavan aineen pitoisuus voidaan pitää nimellisarvossa ± 20 prosenttia eikä liunneen hapen pitoisuus laske alemmaksi kuin 60 prosenttia kyllästyneisyysarvosta.

Valittaessa sopiva lastaustapaa on otettava huomioon kalalajin luonnollinen elinympäristö. Esimerkiksi pohjakalat voivat vaatia samaa vesitilavuutta kohti suuremman pohjapinta-alan kuin pelagiset kalalajit.

1.8.2.5. Ruokkiminen

Totuttamisvaiheessa ja testin aikana kalojen ravinnossa noudatetaan ruokavaliota, jonka rasvapitoisuus ja valkuaisaineiden kokonaispitoisuus tunnetaan. Rehua annetaan riittävästi niin, että kalat pysyvät terveinä ja niiden paino ei laske. Rehua annetaan päivittäin totuttamisvaiheessa ja testin aikana noin 1 - 2 % kalan painosta vuorokaudessa. Tällöin useimpien kalalajien rasvapitoisuus pysyy suhteellisen vakiona testin aikana. Rehun määrä olisi laskettava uudelleen esimerkiksi kerran viikossa, jotta kalan paino ja rasvapitoisuus pysyisivät samana. Tässä laskutoimituksessa kussakin kammiossa olevien kalojen paino voidaan arvioida viimeksi kyseisestä kammioista näytteeksi otetun kalan painosta. Kammiossa olevia kaloja ei punnita.

Syömättä jäänyt rehu ja ulosteet poistetaan testikammioista päivittäin vähän ruokinnan jälkeen (30 minuuttia - 1 tunti). Kammiot pidetään mahdollisimman puhtaina koko testin ajan, jotta orgaanisen aineksen pitoisuus pysyy mahdollisimman alhaisena, koska orgaaninen hiili saattaa vaikuttaa haitallisesti testattavan aineen biologiseen hyötyosuuteen (1).

Koska monet rehut on valmistettu kalajauhosta, on määritettävä, onko rehussa testattavaa ainetta. On suotavaa määrittää myös, onko rehussa torjunta-aineita ja raskasmetalleja.

1.8.2.6. Valo ja lämpötila

Valoisa aika on tavallisesti 12 - 16 tuntia. Lämpötilan pitäisi olla kalalajille sopiva eikä se saisi vaihdella enempää kuin $\pm 2^\circ$. Valaistuksen tyyppi ja ominaisuudet on tunnettava. Testattavan aineen mahdollinen muuntuminen tutkimuksen säteilyolosuhteissa on otettava huomioon. Valaistusolosuhteiden olisi oltava asianmukaiset, ja on vältettävä kalojen altistamista epäluonnolliselle valolle. Joskus voi olla tarpeen suodattaa pois alle 290 nm:n UV-säteily.

1.8.2.7. Testipitoisuudet

Kalat altistetaan läpivirtausolosuhteissa vähintään kahdelle testattavan aineen pitoisuudelle vedessä. Tavallisesti valitaan korkeampi (tai korkein) testattavan aineen pitoisuus siten, että se on noin 1 % aineen akuutista asymptoottisesta LC_{50} -arvosta ja vähintään 10 kertaa korkeampi kuin sen havaitsemisraja vedessä käytettävällä määrittymenettelmällä.

Korkein testipitoisuus voidaan myös määrittää jakamalla akuutti 96 tunnin LC₅₀-arvo asianmukaisella akuutti/krooninen-suhteella (asianmukaiset suhteet joillekin kemikaaleille voivat olla noin 3 - 100). Jos se on mahdollista, valitaan toinen pitoisuus (toiset pitoisuudet) siten, että sen ero edelliseen pitoisuuteen on kymmenkertainen. Jos tämä ei ole mahdollista, kun otetaan huomioon kriteeri "1 % LC₅₀-arvosta" ja määrittäysraja, voidaan käyttää pienempää tekijää kuin 10 tai harkita ¹⁴C-leimatun testattavan aineen käyttöä. Mikään testipitoisuus ei saa olla suurempi kuin testattavan aineen liukoisuus.

Jos käytetään liuotusainetta, sen pitoisuus ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l, ja pitoisuuden on oltava sama kaikissa testiastioissa. Sen osuus orgaanisen hiilen kokonaismäärästä, samoin kuin testattavan aineen osuus, on tunnettava. Näitä aineita on kuitenkin pyrittävä välttämään mahdollisimman täydellisesti.

1.8.2.8. Kontrollit

Testisarjan lisäksi on tehtävä yksi kontrolli laimennusvedellä tai - jos liuotusainetta on käytetty - yksi kontrolli, jossa on liuotusainetta, jos on osoitettu, ettei liuotusaine vaikuta kaloihin. Ellei tätä ole osoitettu, on tehtävät molemmat kontrollit.

1.8.3. Veden laatua koskevien mittausten taajuus

Testin aikana on mitattava liuennut happi, TOC (orgaanisen hiilen kokonaismäärä), pH ja lämpötila kaikista astioista. Veden kokonaiskovuus ja suola, mikäli se on aiheellista, mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta, jossa on korkeampi (korkein) pitoisuus. Vähintään on mitattava kolme kertaa liuennut happi ja suola, mikäli aiheellista (alussa, kertymävaiheen keski- ja loppuvaiheessa) ja kerran viikossa poistumavaiheen aikana. TOC on mitattava testin alussa (24 ja 48 tuntia ennen kertymävaiheen alkua), ennen kalojen lisäämistä astiaan ja vähintään kerran viikossa sekä kertymä- että poistumavaiheen aikana. Lämpötila on mitattava joka päivä, pH kunkin vaiheen alussa ja lopussa ja kovuus kerran testin aikana. Lämpötilaa olisi mieluiten mitattava jatkuvasti vähintään yhdestä astiasta.

1.8.4. Näytteenotto ja mittaukset kaloista ja vedestä

1.8.4.1. Näytteenoton aikataulu

Testattavan aineen pitoisuuden määrittämiseen käytetyistä testauskammioista otetaan vesinäyte ennen kalojen lisäämistä sekä kertymä- ja poistumavaiheen aikana. Vedestä on otettava näytteet vähintään samoina aikoina kuin kaloista ja ennen ruokkimista. Kertymävaiheen aikana määritetään testattavan aineen pitoisuudet sen tarkistamiseksi, täyttyvätkö validiteettikriteerit.

Kaloista otetaan näyte ainakin viidesti kertymävaiheen aikana ja neljästi poistumavaiheen aikana. Koska voi olla joskus vaikea laskea kohtuullisen tarkkaa arviota BCF-arvosta tämän näytemäärän perusteella (erityisesti, jos näyttää siltä, että poistuma noudattaa muuta kuin yksinkertaista ensimmäisen asteen kinetiikkaa), voi olla suositeltavaa ottaa näytteitä tiheämmin molemmissa vaiheissa (katso liite 4). Ylimääräiset näytteet säilytetään ja analysoidaan vain, jos ensimmäisen analyysikierroksen tulokset osoittautuvat riittämättömiksi BCF:n laskemiseksi halutulla tarkkuudella.

Hyväksyttävästä näytteenottoaikataulusta on esimerkki liitteessä 4. Muunlaisia aikatauluja voi laskea helposti käyttäen muita oletettuja P_{ow}-arvoja 95 prosentin kertymään tarvittavan altistusajan laskemiseksi.

Näytteenottoa jatketaan kertymävaiheen aikana, kunnes saavutetaan tasapainotila tai 28 vuorokauden ajan, kumpi tapahtuu aikaisemmin. Jos tasapainotilaa ei ole saavutettu 28 vuorokauden kuluessa, näytteenottoa jatketaan, kunnes tasapainotila saavutetaan tai 60 vuorokauden ajan, sen mukaan, kumpi tapahtuu aikaisemmin. Ennen poistumavaiheen aloittamista kalat siirretään puhtaisiin kammioihin.

1.8.4.2. Näytteenotto ja näytteiden valmistus

Vesinäytteet otetaan esimerkiksi lapolla inertin putken/letkun kautta kammion keskivaiheilla olevasta kohdasta. Koska sen enempää suodatuksella kuin sentrifugoinnillakaan ei aina ilmeisesti voida erottaa toisistaan niitä testattavan aineen osia, joita kala ei biohyödynnä ja joita se biohyödyntää (erityisesti superlipofiilisten kemikaalien, ts. kemikaalien, joiden log P_{ow} > 5, osalta) (1) (5), näytteille ei tarvitse välttämättä tehdä näitä toimenpiteitä.

Sen sijaan on huolehdittava siitä, että kammiot pidetään mahdollisimman puhtaina, ja orgaanisen hiilen kokonaismäärää on seurattava sekä kertymä- että poistumavaiheessa.

Sopiva määrä kaloja (normaalisti vähintään neljä) otetaan testikammioista kutakin näytettä varten. Näytteeksi otetut kalat huuhdellaan nopeasti vedellä, kuivataan (pyyhkeellä), tapetaan välittömästi sopivimmalla ja inhimillisimmällä tavalla ja punnitaan.

On suositeltavaa tehdä määritykset kaloista ja vedestä heti näytteenoton jälkeen, jotta ei tapahtuisi hajoamista tai muuta ainehävikkiä ja jotta voidaan laskea likimääräiset kertymä- ja poistumanopeudet testin edetessä. Kun näytteet määritetään heti, voidaan myös nähdä nopeasti, milloin tasapainotila on saavutettu.

Jos näytteitä ei voi määrittää heti, ne säilytetään sopivalla tavalla. Ennen testin aloittamista on hankittava tietoja kyseisen testattavan aineen oikeasta säilytystavasta, esimerkiksi pakastamisesta, säilyttämisestä 4°C:ssa, säilytysajasta, uuttamisesta jne.

1.8.4.3. Määrittymenetelmän laatu

Koska koko menetelmä riippuu olennaisesti testattavan aineen määrittämiseen käytettävän menetelmän tarkkuudesta, täsmällisyydestä ja herkkyydestä, on todettava kokeellisesti, että kyseisessä menetelmässä kemiallisen määrittämisen täsmällisyys ja toistettavuus samoin kuin testattavan aineen saalis sekä vedestä että kaloista ovat tyydyttäviä. On myös tarkastettava, ettei testattavaa ainetta ole laimennukseen käytetyssä vedessä mitattavia määriä.

Tarvittaessa testissä saadut C_w - ja C_r -arvot korjataan kontrollien saaliin ja tausta-arvojen suhteen. Kala- ja vesinäytteitä käsitellään koko ajan siten, että kontaminoituminen ja hävikki (joka voi johtua esimerkiksi adsorboitumisesta näytteenottolaitteistoon) ovat mahdollisimman pienet.

1.8.4.4. Kalanäytteistä tehtävät määritykset

Jos testissä käytetään radioaktiivisia merkkiaineita, on mahdollista määrittää kokonaisradioaktiivisuus (ts. perusyhdiste ja siitä syntyneet aineenvaihduntatuotteet) tai näytteet voidaan puhdistaa siten, että perusyhdiste voidaan määrittää erikseen. Myös tärkeimmät aineenvaihduntatuotteet voidaan karakterisoida tasapainotilassa tai kertymävaiheen lopussa, sen mukaan, kumpi tapahtuu aikaisemmin. Jos BCF on ≥ 1000 % ilmaistuna radioaktiivisten jäämien kokonaismääränä, voi olla suositeltavaa - ja tiettyihin luokkiin kuuluvien kemikaalien kuten torjunta-aineiden ollessa kyseessä erittäin suositeltavaa - tunnistaa ja määrittää kvantitatiivisesti hajoamistuotteet, joiden määrä on ≥ 10 % kalan kudoksissa tasapainotilassa olevista jäämistä. Jos kaloista tunnistetaan ja määritetään kvantitatiivisesti ≥ 10 %:n luokkaa olevia hajoamistuotemääriä, niin on suositeltavaa tunnistaa ja määrittää kvantitatiivisesti hajoamistuotteet myös testivedestä.

Testattavan aineen pitoisuus olisi tavallisesti määritettävä kustakin yksittäisestä punnitusta kalasta. Jos tämä ei ole mahdollista, voidaan samaan aikaan otetut näytekalat yhdistää, mutta yhdistäminen rajoittaa tilastomenetelmiä, joita voidaan käyttää tulosten käsittelyyn. Jos on tärkeää, että käytetään tiettyä ja tietyn tehoista tilastollista menetelmää, pitäisi testissä olla riittävä määrä kaloja, jotta haluttu kalojen yhdistäminen ja tilastollinen teho voidaan ottaa huomioon (6) (7).

BCF pitäisi ilmaista sekä kokonaismärkäpainoa kohti että erittäin lipofiilisten aineiden osalta myös rasvapitoisuutta kohti. Kalojen rasvapitoisuus määritetään jokaisen näytteenoton yhteydessä, jos mahdollista. Sopivia menetelmiä on käytettävä rasvapitoisuuden määrittämiseksi (liitteessä 3 olevat viitteet 8 ja 2). Kloroformi-metanoliuuttoa voi suositella standardimenetelmänä (9). Eri menetelmillä ei saada samoja arvoja (10), joten on tärkeää kuvailla käytetty menetelmä. Aina kun se on mahdollista, rasvat olisi määritettävä samasta uutteensta, josta testattava aine määritetään, koska rasvat täytyy usein poistaa uutteensta ennen kuin sitä voi käyttää kromatografiseen määrittämiseen. Kalan rasvapitoisuus (mg/kg märkäpainoa kohti) kokeen lopussa ei saisi poiketa rasvapitoisuudesta kokeen alussa enempää kuin ± 25 %. Kudoksen kiinteän aineen prosenttiosuus pitää myös ilmoittaa, jotta rasvapitoisuus voidaan muuntaa märkäarvosta kuiva-arvoksi.

2. MÄÄRITYSTULOKSET

2.1. TULOSTEN KÄSITTELY

Testattavan aineen kertymäkäyrä saadaan esittämällä kalassa tai kalan pinnalla (tai määritellyissä kudoksissa) kertymävaiheen aikana olevan aineen pitoisuus ajan funktiona aritmeettisella asteikolla. Jos käyrä osoittaa tasapainotilaa (ts. käyrä on suunnilleen asymptoottinen aika-akselin kanssa), tasapainotilaa vastaava BCF_{ss} lasketaan kaavasta

$$\frac{C_f \text{ as steady-state (mean)}}{C_w \text{ as steady-state (mean)}}$$

as steady-state (mean) = tasapainossa (keskiarvo)

Jos tasapainotilaa ei saavuteta, voi olla mahdollista laskea vaarallisuuden arviointiin riittävän tarkka BCF_{ss} 80 (1.6/ k_2)prosentin tai 95 prosentin (3,0/ k_2) "tasapainon" perusteella.

Myös konsentraatiotekijä (BCF_K) määritetään kahden ensimmäisen asteen kineettisen vakion suhteena (k_1/k_2). Poistumavakio (k_2) määritetään tavallisesti poistumakäyrästä (ts. käyrästä, joka kuvaa testattavan aineen pitoisuuden vähenemistä kalassa ajan funktiona). Kertymävakio (k_1) lasketaan sitten, kun tunnetaan k_2 ja jokin kertymäkäyrästä saatu C_f :n arvo, (katso myös liite 5). Paras menetelmä BCF_K :n ja nopeusvakioiden k_1 ja k_2 laskemiseksi on estimoida tietokoneella epälineaariset parametrit (11). Muuten voidaan käyttää graafisia menetelmiä k_1 ja k_2 :n määrittämiseksi. Jos poistumakäyrä ei selvästikään noudata ensimmäisen asteen kinetiikkaa, pitäisi käyttää monimutkaisempia malleja (katso liitteessä 3 olevat viitteet) ja pyytää neuvoa biostatistiikan asiantuntijoilta.

2.2. TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnaissa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut tulokset ovat lähellä määrittämenetelmän havaitsemisrajaa.

Selvät kertymä- ja poistumakäyrät osoittavat hyviä biokonsentraatiotuloksia. Vaihtelun kertymä/poistumavakioissa kahden testipitoisuuden välillä pitäisi olla alle 20 %. Jos havaitaan merkittäviä eroja kertymä-/poistumanopeuksien välillä käytettyjen kahden testipitoisuuden välillä, ne on kirjattava ja selitettävä, jos voidaan. BCF :ien luotettavuusväli hyvin suunnitelluissa kokeissa on yleensä lähellä ± 20 prosenttia.

3. TULOSTEN ILMOITTAMINEN

Testiraportissa on ilmoitettava seuraavat tiedot:

3.1. TESTATTAVA AINE

- fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä;
- kemialliset tunnistetiedot (mukaan lukien orgaanisen hiilen pitoisuus tarvittaessa);
- jos aine on radioaktiivisesti leimattu, leimatun atomin (leimattujen atomien) tarkka sijainti ja epäpuhtauksiin liittyvän radioaktiivisuuden määrä;

3.2. TESTATTAVA LAJI

- tieteellinen nimi, kanta, lähde, mahdollinen esikäsitteily, totuttamistiedot, ikä, koko jne.

3.3. TESTIOLOSUHTEET

- käytetty testimenettely, esim. läpivirtaus- tai puolistaattinen;
- käytetty valaistustyyppi ja valon ominaisuudet sekä valoperiodi(t);

- testimenetelmän kuvaus, esim. testikammioiden lukumäärä ja koko, veden vaihtumisnopeus, rinnakkaisnäytteiden määrä, kalojen lukumäärä rinnakkaisnäytteessä, testipitoisuuksien lukumäärä, kertymä- ja poistumavaiheiden kesto, kala- ja vesinäytteiden näytteenottotaajuus;
- kantaliuosten valmistus ja niiden uusimistaajuus (liuotusaine ja sen pitoisuus sekä sen osuus testivedessä olevan orgaanisen hiilen kokonaismäärästä on ilmoitettava, jos liuotusainetta käytetään);
- nimelliset testipitoisuudet, testikammioissa mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat ja menetelmä, jolla ne on laskettu;
- laimennusveden alkuperä, mahdolliset esikäsitellyt, osoitukset kalojen kyvystä elää tässä vedessä sekä vettä koskevat tiedot: pH, kovuus, lämpötila, liuunneen hapen pitoisuus, jäännöskloorin tasot (jos ne on mitattu), orgaanisen hiilen kokonaispitoisuus, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos aiheellista) ja muut mahdolliset mittaukset;
- testikammioissa olevan veden laatu, pH, kovuus, TOC, lämpötila ja liuunneen hapen pitoisuus;
- yksityiskohtaiset tiedot ruokkimisesta (esim. rehutyypin, sen alkuperän, koostumuksen - vähintään rasva- ja valkuaisainepitoisuus mahdollisuuksien mukaan, annetut määrät ja syöttötaajuus);
- kala- ja vesinäytteiden käsittelyä koskevat tiedot, mukaan lukien testattavan aineen valmistusta, säilyttämistä, uuttamista ja määrittämenetelmiä (ja niiden täsmällisyyttä) sekä rasvapitoisuutta koskevat tiedot (jos on mitattu).

3.4.

TULOKSET:

- mahdollisista esikokeista saadut tulokset;
- vertailukalojen ja kussakin altistuskammiossa olevien kalojen kuolleisuus sekä mahdollinen tavallisuudesta poikkeava käyttäytyminen;
- kalojen rasvapitoisuus (jos se on määritetty testin yhteydessä);
- testattavan kemikaalin kertymää ja poistumaa kuvaavat käyrät (mukaan lukien kaikki mittaustulokset) ja tasapainotilan saavuttamiseen tarvittu aika;
- C_f ja C_w (sekä keskihajonta ja vaihteluväli, jos aiheellista) kaikkien näytteenottoaikojen osalta (C_f ilmaistuna mikrogrammoina grammaa märkäpainoa kohti tai ppm:inä koko kalaa tai sen tiettyjä kudoksia, esim. rasvakudosta kohti, ja C_w mikrogrammoina millilitraa kohti eli ppm:inä); C_w arvot verrokkisarjalle (tausta) on myös ilmoitettava;
- tasapainotilassa mitattu biokonsentraatiotekijä (BCF_{ss}) ja/tai kineettinen konsentraatiotekijä (BCF_K) sekä mahdolliset 95 prosentin luotettavuusvälit kertymä- ja poistumavakioille (kaikki ilmaistuna eläimen tai sen tiettyjen kudosten kokonaispainoa tai kokonaisrasvapitoisuutta kohti, jos ne on mitattu), luotettavuusvälit ja keskihajonta, jos ovat saatavina, sekä tuloksiin sovellettu tietokoneanalyysi kullekin käytetylle testipitoisuudelle;
- jos on käytetty radioaktiivisesti leimattuja aineita, voidaan tarvittaessa esittää mahdollisten havaittujen aineenvaihduntatuotteiden kertymistä koskevat tiedot;
- mahdolliset epätavalliset tapahtumat testin aikana, poikkeamat näistä menettelyistä ja muut mahdolliset asiaan liittyvät tiedot.

On vältettävä ilmoittamasta "ei havaittu havaitsemisrajalla". Menetelmää ja koejärjestelyä on kehitettävä ennen testiä, koska edellä mainitunlaisia tuloksia ei voi käyttää nopeusvakioiden laskemiseen.

4. KIRJALLISUUSVIITTEET

- 1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **102**, pp 117-156.
- 2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Nonlinear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, **1**, 29-390.
- 3) OECD, Paris (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No. 3.
- 4) Kristensen P. (1991) Bioconcentration in fish: Comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.
- 5) US EPA 822-R-94-002 (1994) Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Doc. for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.
- 6) US FDA, (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide analytical manual, **1**, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.
- 7) US EPA (1974). Section 5, A(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.
- 9) Gardner et al, (1995) *Limn. & Oceanogr.* **30**, 1099-1105.
- 10) Randall R.C., Lee H., Ozretich R.J., Lake J.L. and Pruell R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Envir. Toxicol. Chem.* **10**, pp 1431-1436.
- 11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method-Ring Test Programme, 1984-1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.
- 12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988) Standard Practice for conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

LIITE 1**HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIALLISET OMINAISUUDET**

	AINE	RAJAPITOISUUS
1	Kiinteät aineet/hiukkaset	5 mg/l
2	Orgaanisen hiilen kokonaismäärä	2 mg/l
3	Ionisoitumaton ammoniakki	1 µg/l
4	Jäännöskloori	10 µg/l
5	Orgaanista fosforia sisältävien torjunta- aineiden kokonaismäärä	50 ng/l
6	Orgaanista klooria sisältävät torjunta-aineet ja polyklooratut bifenyylit	50 ng/l
7	Orgaanisen kloorin kokonaismäärä	25 ng/l
8	Alumiini	1µg/l
9	Arseeni	1µg/l
10	Kromi	1µg/l
11	Koboltti	1µg/l
12	Kupari	1µg/l
13	Rauta	1µg/l
14	Lyijy	1µg/l
15	Nikkeli	1µg/l
16	Sinkki	1µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Elohopea	100 ng/l
19	Hopea	100 ng/l

LIITE 2

TESTAUKSEEN SUOSITELLUT KALALAJIT

	Suositteltu laji	Suositteltu lämpötilaväli (°C)	Suositteltu koe-eläimen kokonais-pituus (cm)
1	Danio rerio ⁽¹⁾ (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton-Buchanan) Seeprakala	20 - 25	3.0 ± 0.5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque) Paksupäämutu	20 - 25	5.0 ± 2.0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) Karppe	20 - 25	5.0 ± 3.0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck and Schlegel) (engl. Ricefish)	20 - 25	4.0 ± 1.0
5	Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters) (engl. Guppy)	20 - 25	3.0 ± 1.0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) Isoaurinkoahven	20 - 25	5.0 ± 2.0
7	Oncorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) Kirjolohi	13 - 17	8.0 ± 4.0
8	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linnaeus) Kolmipiikki	18 - 20	3.0 ± 1.0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231

Erlaisia suisto- ja merikalalajeja on käytetty eri maissa, esimerkiksi:

(Engl.) Spot	<i>Leiostomus xanthurus</i>
(Engl.) Sheepshead minnow	<i>Cyprinodon variegatus</i>
Hopeakylki	<i>Menidia beryllina</i>
(Engl.) Shiner perch	<i>Cymatogaster aggregata</i>
(Engl.) English sole, eräs kielikampela	<i>Parophrys vetulus</i>
Simppu	<i>Leptocottus armatus</i>
Kolmipiikki	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Meriahven	<i>Dicentracus labrax</i>
Salakka	<i>Alburnus alburnus</i>

KALOJEN SAATAVUUS

Edellä olevassa taulukossa lueteltuja makean veden kaloja on helppo kasvattaa ja/tai niitä on helposti saatavissa läpi vuoden, kun taas meri- tai suistokalalajeja on lähinnä saatavissa vastaavissa maissa. Niitä voidaan kasvattaa joko kalanviljelylaitoksissa tai laboratoriossa taudeilta ja loisilta valvotuissa olosuhteissa niin, että saadaan terveitä koe-eläimiä, joiden alkusukuperä tunnetaan. Näitä kaloja on saatavissa monissa osissa maailmaa.

LIITE 3

KERTYMÄ- JA POISTUMAVAIHEEN KESTON ARVIOIMINEN

1. Kertymävaiheen keston arvioiminen

Ennen testin suorittamista voidaan saada arvio k_2 :sta ja siten jokin prosenttimäärä tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavasta ajasta, kun tunnetaan empiirisiä suhteita k_2 :n ja n-oktanoli-vesi - jakautumiskertoimen (P_{ow}) tai k_2 :n ja vesiliukoisuuden (s) välillä.

Arvio k_2 :sta (vuorokautta⁻¹) saadaan esimerkiksi seuraavasta empiirisestä suhteesta:

$$\log_{10} k_2 = -0.414 \log_{10}(P_{ow}) + 1.47 (r^2=0.95) \quad \text{[yhtälö 1]}$$

Muita suhteita on viitteessä (2).

Jos jakautumiskerrointa (P_{ow}) ei tunneta, voidaan tehdä arvio (3), jos tunnetaan aineen vesiliukoisuus (s):

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0.862 \log_{10}(s) + 0.710 (r^2 = 0.994) \quad \text{[yhtälö 2]},$$

jossa s = liukoisuus (moolia/l) : (n=36).

Nämä suhteet koskevat vain kemiallisia aineita, joiden $\log P_{ow}$ -arvot ovat 2 - 6.5 (4).

Aika, joka tarvitaan jonkin prosenttiasteisen tasapainotilan saavuttamiseksi, voidaan saada k_2 -arviota soveltamalla yleisestä kertymä- ja poistumavaihetta kuvaavasta yhtälöstä (ensimmäisen asteen kinetiikka):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot c_w - k_2 \cdot c_f$$

tai jos C_w on vakio:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot c_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{[yhtälö 3].}$$

Kun lähestytään tasapainotilaa ($t \rightarrow \infty$), yhtälö 3 voidaan muuttaa (5) (6) seuraavasti:

$$c_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot c_w \quad \text{tai} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

Tällöin $k_1 / k_2 \cdot C_w$ lähenee pitoisuutta kalassa 'tasapainotilassa' ($C_{f,s}$).

Yhtälö 3 voidaan kirjoittaa seuraavasti:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{tai} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{[yhtälö 4]}$$

Soveltamalla yhtälöä 4 voidaan arvioida jonkin prosenttiasteen tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittava aika, kun k_2 on arvioitu ensin yhtälöstä 1 tai 2.

Tilastollisesti paras kertymävaiheen kesto tilastollisesti hyväksyttävien tulosten saamiseksi (BCF_K) on aika, joka tarvitaan, jotta kalassa olevan testattavan aineen pitoisuuden logaritmia lineaarisen ajan funktiona kuvaava käyrä tulee keskikohtaansa, eli $1,6/k_2$ tai 80 % tasapainotilasta, mutta ei enempää kuin $3,0 k_2^{-1}$ tai 95 % tasapainotilasta (7).

Aika, joka tarvitaan 80-prosenttisen tasapainotilan saavuttamiseen on (yhtälö 4):

$$0.80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{tai} \quad t_{80} = \frac{1.6}{k_2} \quad [\text{yhtälö 5}].$$

Samaten 95 % tasapainotilasta on: $t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$ [yhtälö 6].

Esimerkiksi kertymävaiheen (uptake phase, up) kesto testattavalle aineelle, jonka $\log P_{ow} = 4$, olisi (käyttäen yhtälöitä 1,5,6):

$$\begin{aligned} \log_{10} k_2 &= -0.414 \cdot (4) + 1.47 & k_2 &= 0.652 \text{ vrk}^{-1} \\ \text{up (80 \%)} &= 1.6/0.652, \text{ ts. } 2.45 \text{ vrk (59 tuntia)} \\ \text{tai} \quad \text{up (95 \%)} &= 3.0/0.652, \text{ ts. } 4.60 \text{ vrk (110 tuntia)}. \end{aligned}$$

Samaten testattavalle aineelle, jonka $s = 10^{-5}$ mol/l ($\log(s) = -5.0$), kertymävaiheen kesto olisi (käyttäen yhtälöitä 1,2,5,6):

$$\begin{aligned} \log_{10} (P_{ow}) &= -0.862 (-5.0) + 0.710 = 5.02 \\ \log_{10} K_2 &= -0.414 (5.02) + 1.47 \\ k_2 &= 0.246 \text{ vrk}^{-1} \\ \text{up (80 \%)} &= 1.6/0.246, \text{ ts. } 6.5 \text{ vrk (156 tuntia)} \\ \text{tai up (95 \%)} &= 3.0/0.246, \text{ ts. } 12.2 \text{ vrk (293 tuntia)}. \end{aligned}$$

Vaihtoehtoisesti yhtälöä

$$t_{eq} = 6.54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55.31 \text{ (tuntia)}$$

voidaan käyttää tosiasiallisen tasapainotilan saavuttamiseksi tarvittavan ajan laskemiseen (4).

2. Poistumavaiheen keston arvioiminen

Ennakoarvio ajasta, joka tarvitaan eläimeen kertyneen aineen pitoisuuden jonkin prosenttimäärän poistumiseen, voidaan myös saada kertymä- ja poistumavaihetta (ensimmäisen asteen kinetiikka) kuvaavasta yleisestä yhtälöstä (1) (8).

Oletetaan, että C_w on poistumavaiheessa nolla. Yhtälö saa seuraavan muodon:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{tai} \quad C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

jossa $C_{f,o}$ on pitoisuus poistumavaiheen alussa. Siten saavutetaan 50 prosentin poistuma ajankohtana (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \quad \text{tai} \quad t_{50} = \frac{0.693}{k_2}$$

Samaten 95 prosentin poistuma saavutetaan ajankohtana:

$$t_{95} = \frac{3.0}{k_2}$$

Jos 80%:n kertymää käytetään ensimmäisessä vaiheessa ($1.6/k_2$) ja 95 prosentin poistumaa poistumavaiheessa ($3.0/k_2$), niin poistumavaihe on suunnilleen kaksi kertaa niin pitkä kuin kertymävaihe.

On kuitenkin tärkeä huomata, että nämä arviot perustuvat siihen, että kertymä- ja poistumavaihe noudattavat ensimmäisen asteen kinetiikkaa. Jos näin ei selvästikään ole, on käytettävä monimutkaisempia malleja [esim. viite (1)].

KIRJALLISUUSVIITTEET (liite 3)

- 1) **Spacie A.** and Hamelink J.L. (1982) Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* **1**, pp 309-320.
- 2) **Kristensen P.** (1991) Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) **Chiou C.T.** and Schmedding D.W. (1982) Partitioning of organic compounds in octanol-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **16** (1), pp 4-10.
- 4) **Hawker D.W.** and Connell D.W. (1988) Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* **22** (6), pp 701-707.
- 5) **Branson D.R.,** Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975) *Transactions of the American Fisheries Society*, **104** (4), pp 785-792.
- 6) **Ernst W.** (1985) Accumulation in Aquatic organisms. In: *Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed. by Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P.H. Part 4.4 pp 243-255. SCOPE, 1985, John Wiley & Sons Ltd. N.Y.
- 7) **Reilly P.M.,** Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977) Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models, *Can. J. Chem. Eng.* **55**, pp 614-622.
- 8) **Könemann H.** and Van Leeuwen K. (1980) Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chlorobenzenes by Guppies. *Chemosphere*, **9**, pp 3-19.

LIITE 4

TEOREETTINEN ESIMERKKI KERTYMÄTESTIN AIKATAULUSTA AINEILLE,

JOIDEN $\log P_{ow} = 4$

Kala-näytteiden otto	Näytteenottoaikataulu		Vesinäyt-teiden lukumäärä	Kalojen lukumäärä näytettä kohti
	Vaadittu vähimmäis-taajuus (vrk)	Lisä-näytteet		
Kertymä-vaihe	-1 0		2* 2	lisättävä 45-80 kalaa
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
Poistuma-vaihe				Siirto veteen, jossa ei ole testattavaa kemikaalia
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)

* Vedestä otetaan näyte, kun kammioon on lisätty vähintään 3 kammion tilavuutta vettä.

Suluissa olevat luvut ovat mahdollisten lisänäytteiden (vesi, kala) määrä.

Huom.: Ennen testiä tehty arvio k_2 :lle, kun $\log P_{ow}$ on 4,0, on $0,652 \text{ vrk}^{-1}$. Koko kokeen kesto on

$3 \times \text{up} = 3 \times 4,6 \text{ vrk}$ eli 14 vrk. Ottovaiheen (up) arviota varten katso liite 3.

LIITE 5

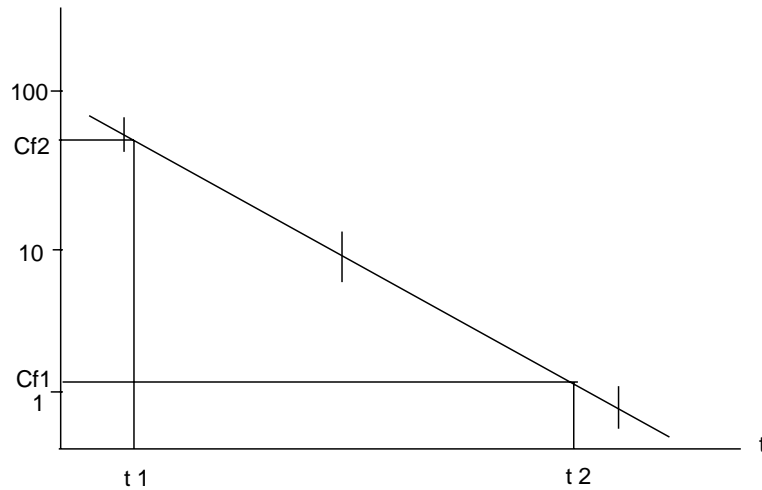
MALLIN VALITSEMINEN

Biokertymistulosten on yleensä oletettu noudattavan "kohtuullisesti" yksinkertaista kahden osaston ja kahden muuttujan mallia. Sen osoittaa suora kuvaaja, joka vastaa kalassa poistumavaiheessa havaittuja pitoisuuksia, kun ne esitetään puolilogaritmi-paperilla. (Jos näistä pitoisuuksista ei muodostu suoraa kuvaajaa, olisi käytettävä monimutkaisempia malleja, katso esim. Spacie ja Hamelink, liitteen 3 viite 1).

GRAAFINEN MENETELMÄ POISTUMAVAKION k_2 MÄÄRITTÄMISEKSI

Kussakin kalanäytteessä mitattu testattavan aineen pitoisuus esitetään näytteenottoajankohdan funktiona puolilogaritmi-paperilla. Tämän kuvaajan kulmakerroin on k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



On huomattava, että poikkeamat suorasta viivasta voivat viitata monimutkaisempaan poistumaan kuin ensimmäisen asteen kinetiikkaa noudattavaan poistumaan. Graafista menetelmää voidaan käyttää sellaisten poistumatyyppien selvittämiseen, jotka poikkeavat ensimmäisen asteen kinetiikasta.

GRAAFINEN MENETELMÄ KERTYMÄVAKION k_2 MÄÄRITTÄMISEKSI

Kun tunnetaan K_2 , lasketaan k_1 seuraavasti:

$$k_1 = \frac{c_f k_2}{c_w X(1 - e^{-k_2 t})} \quad [\text{yhtälö 1}].$$

C_f :n arvo luetaan mittaustuloksista saadun tasaisen käyrän keskikohdasta, kun pitoisuuden logaritmi on esitetty ajan funktiona (aritmeettisellä asteikolla).

KERTYMÄ- JA POISTUMAVAKIOIDEN LASKEMINEN TIETOKONEELLA

Biokertyvyystekijä sekä k_1 - ja k_2 -nopeusvakiot lasketaan mieluiten tietokoneella käyttäen epälineaarisia parametrien arviointimenetelmiä. Tällaisilla ohjelmilla saadaan arvot k_1 :lle ja k_2 :lle, jos on sarja peräkkäisiä aika-konsentraatiotuloksia ja malli:

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad \text{[yhtälö 2]}$$

$$c_f = c_w \cdot \frac{k_1}{k_2} x(e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t > t_c \quad \text{[yhtälö 3],}$$

joissa t_c = aika, jolloin kertymävaihe loppuu.

Tällä menetelmällä saadaan myös k_1 :n ja k_2 :n keskihajonnan keskivirheet.

Koska k_2 voidaan useimmissa tapauksissa arvioida poistumakäyrästä suhteellisen suurella tarkkuudella ja koska k_1 ja k_2 korreloivat vahvasti, jos ne arvioidaan samanaikaisesti, voi olla suositeltavaa laskea ensin k_2 poistumavaiheen tuloksista ainoastaan ja laskea sitten k_1 kertymävaiheen tuloksista käyttäen epälineaarisen regression menetelmää.

C.14. KALANPOIKASILLA TEHTÄVÄ KASVUTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä kasvun mittaukseen perustuva myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 215 (2000).

1.1 JOHDANTO

Testin tarkoituksena on arvioida vaikutukset, jotka pitkäaikaisella altistuksella kemikaaleille on kalanpoikasten kasvuun. Testi perustuu Euroopan unionissa kehitettyyn ja rengastettuun (1)(2) menetelmään, jolla arvioidaan kemikaalien vaikutus kirjolohen poikasen (*Oncorhynchus mykiss*) kasvuun läpivirtausolosuhteissa. Muitakin hyvin dokumentoituja lajeja voidaan käyttää. Kokemusta on esimerkiksi seeprakalalla (*Danio rerio*)¹ (3)(4) ja medakalla (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7) tehdyistä kasvutesteistä.

Ks. myös osan C Yleisjohdanto.

1.2 MÄÄRITELMÄT

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus): Pienin testiaineen testattu pitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan merkitsevän vaikutuksen (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kuitenkin kaikilla LOEC-tasoa suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä haitallinen vaikutus kuin LOEC-tasolla.

NOEC (No Observed Effect Concentration, vaikutukseton pitoisuus): Välittömästi LOEC-tasoa pienempi testipitoisuus.

EC_x: tässä testimenetelmässä se testiaineen pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin muutoksen kalan kasvunopeudessa verrattuna kontrolleihin.

Lastaustiheys: kalojen märkäpaino tilavuusyksikköä kohti.

Varastotiheys: kalojen lukumäärä tilavuusyksikköä kohti.

Yksittäisen kalan spesifinen kasvunopeus: yksittäisen kalan kasvunopeus verrattuna sen alkupainoon.

Tankkikohtainen keskimääräinen spesifinen kasvunopeus: tankin populaation keskimääräinen kasvunopeus yhdessä pitoisuudessa.

Spesifinen pseudokasvunopeus: yksittäisen kalan kasvunopeus verrattuna tankkipopulaation keskimääräiseen alkupainoon.

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.

1.3 TESTIN PERIAATE

Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa olevat kalanpoikaset punnitaan ja pannaan testiastioihin, jossa ne altistetaan useille veteen liuotettujen testiaineiden subletaaleille pitoisuuksille mieluiten läpivirtausolosuhteissa, tai jos se ei ole mahdollista, sopivissa puolistaattisissa (staattinen järjestelmä, jossa liuokset vaihdetaan) olosuhteissa. Testin kesto on 28 vuorokautta. Kalat ruokitaan päivittäin. Rehun määrä suhteutetaan kalojen alkupainoon, ja se voidaan laskea uudelleen 14 vuorokauden kuluttua. Testin lopussa kalat punnitaan uudelleen. Vaikutukset kasvunopeuteen analysoidaan käyttämällä regressiomallia sen pitoisuuden estimoimiseksi, joka aiheuttaisi x prosentin vaikutuksen kasvunopeuteen, ts. EC_x , (esim. EC_{10} , EC_{20} tai EC_{30}). Vaihtoehtoisesti tuloksia voidaan verrata kontrolliarvoihin pienimmän havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden arvioimiseksi ja siitä edelleen sen pitoisuuden arvioimiseksi, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Välittömän myrkyllisyyden testin (ks. menetelmä C 1), joka on mieluiten tehty tähän testiin valitulla lajilla, tulosten pitäisi olla käytettävissä. Tämä tarkoittaa sitä, että testiaineen vesiliukoisuus ja höyrynpaine tunnetaan, että käytettävissä on luotettava analyttinen menetelmä aineen kvantifioimiseksi testiliuoksissa ja että menetelmän tarkkuus ja detektoraja tunnetaan ja ne on raportoitu.

Hyödyllisiä tietoja ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilisuus vedessä ja valossa, pK_a , P_{ow} ja nopean biohajoavuuden testin tulokset (ks. menetelmä C 4).

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos

- kontrollien kuolleisuus ei ole suurempi kuin 10 % testin lopussa.
- kontrollikalojen keskimääräinen paino on noussut niin paljon, että voidaan osoittaa merkitseväksi katsottu kasvunopeuden minimivaihtelu. Rengastestissä (2) on osoitettu, että kirjolohelle kontrollikalojen keskimääräisen painon on noustava 28 vuorokaudessa vähintään puolella (ts. 50 %) verrattuna niiden alkupainoon. Esim: alkupaino: 1 g/kala (= 100 %), loppupaino 28 vuorokauden kuluttua: $\geq 1,5$ g/kala (≥ 150 %).
- liuenneen hapen pitoisuus on vähintään 60 % ilman kyllästysarvosta koko testin ajan.
- veden lämpötila vaihtelee enintään 1° C testiastioiden välillä milloin tahansa testin aikana ja poikkeaa enintään 2° siitä lämpötila-alueesta, joka on määritelty kyseiselle testilajille (liite 1).

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 Laitteet ja tarvikkeet

Tavallisia laboratoriolaitteita ja erityisesti seuraavat:

- a) happi- ja pH-mittarit
- b) laitteet veden kovuuden ja emäksisyyden mittaamiseen
- c) asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön ja mieluiten sen jatkuvaan seurantaan
- d) tankkeja, jotka ovat kemiallisesti inerttiä materiaalia ja riittävän suuria suhteessa suositeltuun lastaus- ja varastotiheyteen (ks. kohta 1.8.5 ja liite 1)
- e) riittävän tarkka vaakka (ts. $\pm 0,5\%$).

1.6.2 Vesi

Testissä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista vettä, jossa testilaji elää ja kasvaa sopivan kauan. Veden laadun pitäisi pysyä vakiona testin ajan. Veden pH:n olisi oltava välillä 6,5–8,5, mutta kunkin testin aikana se ei saa vaihdella enempää kuin 0,5 pH-yksikköä. Suositeltava veden kovuus on yli 140 mg/l (CaCO_3). Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta), näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrittäviä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrittäviä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein). Liitteessä 2 luetellaan joitakin hyväksyttävän laimennusveden ominaisuuksia.

1.6.3 Testiliuokset

Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla.

Varastoliuos valmistetaan mieluiten yksinkertaisesti sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mekaanisia menetelmiä tai ultraääntä. Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voidaan käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi.

Liuottimien tai liuotusapuaineiden (dispergointiaineiden) käyttö voi olla tarpeen joissakin tapauksissa riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Sopivia liuottimia ovat esimerkiksi asetoni, etanoli, metanoli, dimetyylisulfoksidi, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esimerkiksi Cremophor RH40, Tween 80, 0,01-prosenttinen metyyliiselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita (kuten asetonia) ja/tai helposti haihtuvia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta kalojen kasvuun eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia kalanpoikasiin. Se on osoitettava ainoastaan liuotinta sisältävän kontrollin avulla.

Läpivirtaustesteissä on käytettävä testiaineen varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) eri pitoisuuksia sisältävien näytteiden annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 % koko testin aikana. Rengastestissä (2) on osoitettu, että hyväksyttävä vedenvaihtotaajuus on kirjolohelle 6 litraa grammaa kalaa kohti päivässä (ks. kohta 1.8.2.2).

Puolistaattisissa (joissa liuokset vaihdetaan) testeissä kasvatusnesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta, mutta vaihtoa suositellaan kerran päivässä. Jos alustavista stabiilisuustesteistä (ks. kohta 1.4) tiedetään, ettei testiaineen pitoisuus pysy vakiona (ts. se ei ole välillä 80-120 % nimellisarvosta tai se laskee alle 80 prosenttiin mitatusta alkupitoisuudesta) vaihtojen välillä, olisi harkittava läpivirtaustestiä.

1.6.4 **Kalalajin valinta**

Kirjolohi (*Oncorhynchus mykiss*) on suositeltava laji tähän testiin, koska rengastestissä on eniten kokemusta siitä (1)(2). Muutakin hyvin dokumentoitua lajia saa käyttää, mutta testimenetelmää on mahdollisesti mukautettava, jotta testiolosuhteet olisivat sopivat. Kokemusta on esim. seeprakalasta (*Danio rerio*) (3)(4) ja medakasta (*Oryzias latipes*) (5)(6)(7). Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

1.6.5 **Kalojen hoito**

Testikalat on valittava yhdestä populaatiosta, mieluiten samasta poikueesta, jota on pidetty vähintään kaksi viikkoa ennen testiä samanlaatuudessa vedessä ja samanlaisissa valaistusolosuhteissa kuin ne, joita käytetään testissä. Kaloille olisi annettava ravintoa vähintään 2 % ja mieluiten 4 % elopainoa kohti päivässä niiden kasvatusaikana ja testin aikana.

Kalojen kuolleisuus rekisteröidään 48 tunnin sopeutumisaikajakson jälkeen. Tämän jälkeen sovelletaan seuraavia perusteita:

- jos kuolleisuus on yli 10 % populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: koko erä hylätään.
- jos kuolleisuus on välillä 5–10 % populaatiosta: kaloja totutetaan vielä seitsemän päivää. Jos kuolleisuus on yli 5 % näiden toisten seitsemän päivän aikana, koko erä hylätään.
- jos kuolleisuus on alle 5 % populaatiosta seitsemässä vuorokaudessa: erä hyväksytään.

Kaloille ei saisi antaa mitään hoitoa sairautta varten testiä edeltävien kahden viikon aikana eikä testin aikana.

1.7 TESTIN SUUNNITTELU

"Testin suunnittelu" tarkoittaa testipitoisuuksien lukumäärän ja pitoisuusvälien valintaa, tankkien lukumäärää kutakin pitoisuutta kohti ja kalojen lukumäärää tankkia kohti. Testi pitäisi suunnitella mieluiten niin, että otetaan huomioon

- a) tutkimuksen tarkoitus
- b) käytettävä tilastollisen analyysin menetelmä
- c) kokeessa tarvittavien resurssien saatavuus ja kustannukset

Tavoitteita ilmoitettaessa olisi mahdollisuuksien mukaan spesifioitava, millä tilastollisella teholla tietynsuuruinen ero (esim. kasvunopeudessa) on osoitettava tai vaihtoehtoisesti millä tarkkuudella EC_x (esim. kun $x = 10, 20$ tai 30 , ja mieluiten vähintään 10) on estimoitava. Muuten tutkimuksen kokoa ei voida määritellä tarkasti.

On tärkeää huomata, että suunnitelma, joka on optimaalinen (hyödyntää resurssit parhaiten) yhdelle tilastoanalyysimenetelmälle, ei ole välttämättä optimaalinen toiselle menetelmälle. LOEC/NOEC-arvon estimoinnille suositeltava suunnitelma ei siis olisi sama kuin regressioanalyysiä varten suositeltava.

Useimmissa tapauksissa regressioanalyysi on parempi kuin varianssianalyysi. Syitä ovat käsitteet Stephan ja Rogers (8). Jos kuitenkin ei löydetä sopivaa regressiomallia ($r^2 < 0.9$), olisi käytettävä NOEC/LOEC-menetelmää.

1.7.1 Regressioanalyysille suositeltava testisuunnitelma

Regressioanalyysillä käsiteltävän testin suunnitelmassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

- a) Testissä käytettävien pitoisuuksien on katettava vaikutuspitoisuus (esim. $EC_{10,20,30}$) ja se pitoisuusalue, joka on merkityksellinen kyseisen testiaineen kannalta. Tarkkuus, jolla vaikutuspitoisuuksien estimaatit voidaan tehdä, on paras, kun vaikutuspitoisuus sijoittuu testattujen pitoisuuksien keskialueelle. Alustava pitoisuusalueen määrittely voi auttaa sopivien testipitoisuuksien valinnassa.
- b) Jotta tilastollinen mallitus olisi mahdollista, testissä pitäisi olla vähintään yksi kontrollitankki ja viisi muuta tankkia, joissa on eri pitoisuudet. Jos käytetään liuotusapuaineita, on testisarjan lisäksi määritettävä yksi kontrolli, joka sisältää liuotusapuainetta suurimmassa testipitoisuudessa (ks. kohdat 1.8.3 ja 1.8.4).
- c) Sopivaa geometrista tai logaritmista sarjaa (9) (ks. liite 3) voidaan käyttää. On suositeltavaa tehdä pitoisuuksista logaritminen sarja.
- d) Jos käytettävissä on enemmän kuin kuusi tankkia, lisätankit olisi käytettävä joko rinnakkaismäärittelyyn tai niissä olevat pitoisuudet olisi sijoitettava koko pitoisuusalueen yli, jotta pitoisuuksien eroja voidaan pienentää. Kumpikin tapa on yhtä hyvä.

1.7.2 **Varianssianalyysillä (ANOVA) käsiteltävälle NOEC/LOEC-menetelmälle suositeltava testisuunnitelma**

Kullekin pitoisuudelle pitäisi olla mieluiten rinnakkaiset tankit, ja tilastollinen analyysi pitäisi tehdä tankkien tasolla (10). Ilman rinnakkaisia tankkeja ei voida tehdä korjauksia tankkien välisen vaihtelun ottamiseksi huomioon sen vaihtelun lisäksi, joka johtuu yksittäisistä kaloista. Kokemus on kuitenkin osoittanut (11), että tankkien välinen vaihtelu on erittäin pieni verrattuna tankin sisäiseen (ts. kalojen väliseen) vaihteluun. Suhteellisen hyväksyttävä vaihtoehto on siksi tehdä tilastollinen analyysi yksittäisten kalojen tasolla.

Tavanomaisesti käytetään vähintään viittä testipitoisuutta geometrisessa sarjassa, jolloin kerroin ei mielellään saa ylittää arvoa 3.2.

Yleensä kun testeissä on rinnakkaisia tankkeja, rinnakkaisten kontrollitankkien lukumäärän ja siten kalojen määrän pitäisi olla kaksi kertaa niiden määrä kussakin testipitoisuudessa, joiden pitäisi olla samansuuruiset (12)(13)(14). Jos sen sijaan ei käytetä rinnakkaisia tankkeja, kontrolliryhmän kalojen lukumäärän olisi oltava sama kuin niiden lukumäärä kussakin testipitoisuudessa.

Jos ANOVA-analyysin on määrä perustua tankkeihin eikä yksittäisiin kaloihin (mikä edellyttäisi joko kalojen yksilöllistä merkitsemistä tai spesifisen pseudokasvunopeuden käyttöä (ks. kohta 2.1.2)), on rinnakkaisia tankkeja oltava niin paljon, että kutakin pitoisuutta varten käytettävien tankkien välinen keskihajonta voidaan määrittää. Tämä tarkoittaa sitä, että virhettä koskevien vapausasteiden määrän varianssianalyysissä on oltava vähintään 5 (10). Jos vain kontrolleista on rinnakkaiset, on vaara, että virheen vaihtelu vääristyy, koska se voi kasvaa kyseessä olevan kasvunopeuden keskiarvon mukana. Koska kasvunopeus todennäköisesti pienenee pitoisuuden noustessa, tämä saattaa johtaa vaihtelun estimointiin liian suureksi.

1.8 **MENETTELY**

1.8.1 **Kalojen valinta ja punnitus**

On tärkeää minimoida kalojen painon vaihtelu testin alussa. Liitteessä 1 mainitaan, minkälainen kokovaihtelu sopii tähän testiin suositelluille eri lajeille. Testissä käytettävässä koko kalaerässä yksittäisten kalojen painot eivät saisi vaihdella testin alussa mielellään enempää kuin $\pm 10\%$ aritmeettisesta keskiarvosta eikä missään tapauksessa enemmän kuin 25% . Suositellaan, että punnitaan alustava erä kaloja keskimääräisen painon arvioimiseksi.

Kantapopulaatiota ei saisi ruokkia 24 tuntiin ennen testin alkua. Kalat valitaan sitten satunnaistetusti. Kalat anestisoidaan yleisellä anestesia-aineella (esim. vesiliuos, jossa on 100 mg/l trikaiinimetäänisulfonaattia (MS 222), joka on neutralisoitu lisäämällä kaksi osaa natriumbikarbonaattia yhtä osaa MS 222:ta kohti) ja punnitaan yksittäin (märkäpaino; pyyhkekuivattuna) liitteessä 1 mainitulla tarkkuudella. Kalat, joiden paino on annetuissa rajoissa, otetaan testiin ja jaetaan satunnaistetusti testiastioihin. Kalojen kokonaismärkäpaino kussakin testiastiassa kirjataan. Anestesia samoin kuin kalojen käsittely (kuten kuivaaminen ja punnitus) voi aiheuttaa kalanpoikasille, erityisesti pienikokoisille kaloille, stressiä ja vaurioita. Kalanpoikasia on siksi käsiteltävä äärimmäisen varoen stressin ja vahingoittumisen välttämiseksi.

Kalat punnitaan uudelleen päivänä 28 (ks. kohta 1.8.6). Jos katsotaan, että ruoka-annos on laskettava uudelleen, kalat voidaan punnita uudelleen päivänä 14 (ks. kohta 1.8.2.3). Muitakin menetelmiä, kuten valokuvaamista, voidaan käyttää kalojen koon muutosten määrittämiseksi. Rehun määrä voidaan siteen mukauttaa koon muutoksiin.

1.8.2 **Altistusolosuhteet**

1.8.2.1 *Testin kesto*

Testin kesto on ≥ 28 vuorokautta.

1.8.2.2 *Lastaus- ja varastotiheys*

On tärkeää, että lastaus- ja varastotiheys ovat käytetylle kalalajille sopivia (ks. liite 1). Jos varastotiheys on liian suuri, ahtausta aiheuttaa stressiä, jonka seurauksena kasvunopeus laskee ja kalat voivat sairastua. Jos varastotiheys on liian pieni, voi aiheutua territoriaalikäyttäytymistä, joka voi myös vaikuttaa kasvuun. Joka tapauksessa lastaus- ja varastotiheyden pitäisi olla niin pieni, että liuenneen hapen pitoisuus voidaan pitää vähintään arvossa 60 % ilman ilmastusta. Rengastestissä (2) on osoitettu, että hyväksyttävä lastaus- ja varastotiheys kirjolohelle on 16 kirjolohta (paino 3–5 g) 40 litrassa. Suositeltava veden vaihtamistajuus testin aikana on 6 litraa grammaa kohti kalaa vuorokaudessa.

1.8.2.3 *Ruokkiminen*

Kaloille pitäisi antaa sopivaa ravintoa (liite 1) riittävästi, jotta kasvunopeus on hyväksyttävä. On varottava, ettei vedessä kasva mikrobeja eikä se samennu. Kirjolohelle mainitut edellytykset todennäköisesti täyttävä ruokintatiheys on 4 % elopainosta vuorokaudessa (2)(15)(16)(17). Päiväannos voidaan jakaa kahteen yhtä suureen osaan ja antaa kahtena kertana päivässä. Ruokintojen välin on oltava vähintään 5 tuntia. Annoksen määrä perustuu kalojen kokonaispainoon kutakin testiastiaa kohti testin alussa. Jos kalat punnitaan uudelleen päivänä 14, annos lasketaan uudelleen. Kaloja ei saa ruokkia 24 tuntiin ennen punnitusta.

Syömättä jäänyt rehu ja ulosteet on poistettava testiastioista päivittäin puhdistamalla tankkien pohjat huolellisesti imulaitteella.

1.8.2.4 *Valo ja lämpötila*

Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitäisi olla sopivia käytetyille testilajille (liite 1).

1.8.3 **Testipitoisuudet**

Yleensä tarvitaan viisi testipitoisuutta riippumatta testisuunnitelmasta (ka. kohta 1.7.2). Jos testiaineen myrkyllisyydestä on aiempia tietoja (esim. akuutista testistä ja/tai alustavista pitoisuusalueen määrittämisistä), ne auttavat sopivien testipitoisuuksien valinnassa. Jos käytetään vähempää kuin viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Suurin testipitoisuus ei saisi olla suurempi kuin aineen liukoisuus veteen.

Kun varastoliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotusapuaainetta, sen lopputilavuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l, ja tilavuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa (ks. kohta 1.6.3). Näiden aineiden käyttöä on kuitenkin vältettävä mahdollisimman pitkälle.

1.8.4 **Kontrollit**

Laimennusvesikontrollien lukumäärä riippuu testisuunnitelmasta (ks. kohdat 1.7-1.7.2). Jos käytetään liuotusapuaainetta, testiin on otettava mukaan yhtä monta liuotusapuaainekontrollia kuin laimennusvesikontrolleja.

1.8.5 **Analyttisten määritysten ja mittausten taajuus**

Testiaineen pitoisuudet on määritettävä säännöllisin määräajoin testin aikana (ks. jäljempänä).

Läpivirtaustesteissä laimennusveden ja myrkyllistä ainetta sisältävän varastoliuoksen virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 % koko testin aikana. Jos testiainepitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 % prosentin sisällä nimellisarvosta (ts. välillä 80-120 %, ks. kohdat 1.6.2 ja 1.6.3), suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet testin alussa ja viikon välein sen jälkeen. Jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 % prosentin sisällä nimellisarvosta (aineen stabiilisuutta koskevien tietojen perusteella), on analysoitava kaikki pitoisuudet noudattaen samanlaista järjestelmää.

Puolistaattisissa (jossa liokset vaihdetaan) testeissä suositellaan, että määritetään vähintään suurimmat ja pienimmät pitoisuudet tuoreesta liuksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa testin alussa ja viikon välein sen jälkeen, jos testiainepitoisuuksien odotetaan pysyvän 20 % prosentin sisällä nimellisarvosta. Jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 % prosentin sisällä nimellisarvosta, on analysoitava kaikki pitoisuudet noudattaen samanlaista järjestelmää kuin stabiilimmille aineille.

Suosittelaa, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että testiaineen pitoisuus pysyy tyydyttävästi 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuuksia tai mitattuja pitoisuuksia.

Näytteet voivat edellyttää sentrifugointia tai suodatusta (esim. 0,45 µm:n huokoskoon suotimella). Sentrifugointia suositellaan. Jos testiaine ei adsorboidu suotimiin, voi myös suodatus olla hyväksyttävää.

Liennut happi, pH ja lämpötila on mitattava testin aikana kaikista testiastioista. Veden kokonaiskovuus, emäksisyys ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) mitataan kontrolleista ja yhdestä astiasta, jossa on suurin pitoisuus. Vähintään olisi mitattava liennut happi ja suolapitoisuus (jos sillä on merkitystä) kolmesti (testin alussa, keskivaiheilla ja lopussa). Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä liennut happi mitataan useammin, mieluiten ennen kutakin veden vaihtoa ja sen jälkeen tai vähintään kerran viikossa. pH olisi mitattava kunkin vedenvaihdon alussa ja lopussa puolistaattisissa testeissä ja vähintään viikoittain läpivirtaustesteissä. Kovuus ja emäksisyys olisi mitattava kerran testin aikana. Lämpötilaa olisi mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

1.8.6 Havainnot

Paino: Testin lopussa on määritettävä kaikkien elossa olevien kalojen märkäpaino (pyyhekuivattuna) joko ryhmittäin testiastiaa kohti tai yksittäin. Punnitseminen testiastiaa kohti on parempi kuin yksittäisten kalojen punnitseminen, jolloin kalat olisi merkittävä yksilöllisesti. Jos mitataan kunkin kalan paino yksilöspesifisen kasvunopeuden määrittämiseksi, olisi valittava sellainen merkintätapa, joka ei stressaisi eläimiä (kylmämerkinnän vaihtoehdot, esim. hienon värillisen siiman käyttö, voivat olla sopivia).

Kaloja on havainnoitava päivittäin testin aikana, ja kaikki ulkoiset poikkeavuudet (kuten verenvuoto, värin muutokset) olisi pantava merkille. Mahdolliset kuolemantapaukset on kirjattava ja kuolleet kalat poistettava mahdollisimman nopeasti tankista. Kuolleiden kalojen tilalle ei panna uusia, sillä lastaus- ja varastotiheys ovat niin suuret, että kunkin tankin kalojen määrän muutokset eivät vaikuta kasvuun. Ruokkimistaajuutta on kuitenkin mukautettava.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Suositellaan, että sekä testin suunnittelussa että analysoinnissa on mukana tilastotieteilijä, koska menetelmä mahdollistaa huomattavaa joustoa kokeen suunnittelussa. Esim. testiastioiden lukumäärä, testipitoisuuksien lukumäärä ja kalojen lukumäärä voivat olla erilaiset.

Kasvunopeuksia ei lasketa sellaisille testiastioille, joissa kuolleisuus on yli 10 %. Kuolleisuus olisi kuitenkin ilmoitettava kaikille testipitoisuuksille.

Riippumatta tulosten analysointiin käytettävästä menetelmästä keskeinen käsite on spesifinen kasvunopeus r ajankohden t_1 ja t_2 välillä. Se voidaan määrittellä useilla tavoilla riippuen siitä, onko kalat merkitty yksilöllisesti vai ei ja siitä, tarvitaanko tankin keskiarvoa.

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

jossa

r_1 = yksittäisen kalan spesifinen kasvunopeus

r_2 = tankkikohtainen keskimääräinen kasvunopeus

r_3 = spesifinen pseudokasvunopeus

w_1, w_2 = tietyn kalan paino ajankohdalla t_1 ja t_2

$\log_e w_1$ = yksittäisen kalan painon logaritmi testin alussa

$\log_e w_2$ = yksittäisen kalan painon logaritmi testin lopussa

$\overline{\log_e w_1}$ = w_1 -arvojen logaritmien keskiarvo tankin kaloille testin alussa

$\overline{\log_e w_2}$ = w_2 -arvojen logaritmien keskiarvo tankin kaloille testin lopussa

t_1, t_2 = aika (päiviä) testin alussa ja lopussa

r_1, r_2, r_3 voidaan laskea ajalle 0–28 vuorokautta ja tarvittaessa (ts. kun päivänä 14 on tehty mittaus) ajalle 0–14 vuorokautta ja 14–28 vuorokautta.

2.1.1 Tulosten regressioanalyysi (pitoisuus-vastemallitus)

Tässä analyysimenetelmässä sovitetaan sopiva matemaattinen vastaavuussuhde spesifisen kasvunopeuden ja pitoisuuden välille, ja sen avulla voidaan estimoida EC_x , ts. mikä tahansa EC-arvo. Tämä menetelmä ei edellytä r -arvon laskemista yksittäisille kaloille (r_1); sen sijaan analyysi perustuu tankkia kohti määritettyyn keskiarvoon (r_2). Jälkimmäinen menetelmä on suositeltava. Se on parempi myös pienikokoisille kalalajeille.

Tankkikohtainen keskimääräinen spesifinen kasvunopeus (r_2) esitetään kuvaajassa pitoisuuden funktiona, jotta voidaan tarkastella pitoisuus-vastesuhdetta.

Jotta r_2 -arvon ja pitoisuuden välinen suhde voidaan ilmaista, on valittava sopiva malli, ja valinnan tueksi on esitettävä asianmukaiset perustelut.

Jos elossa olevien kalojen määrä tankeissa on erilainen, on mallin sovitusta – olipa se yksinkertainen tai epälineaarinen – painotettava siten, että siinä otetaan huomioon ryhmien epätasainen koko.

Mallin sovitusmenetelmän on oltava sellainen, että voidaan estimoida esim. EC_{20} ja laskea sen hajonta (joko keskivirhe tai luottamusväli). Sovitetun mallin kuvaaja on esitettävä mittaustulosten kanssa, jotta mallin sopivuus voidaan nähdä (8)(18)(19)(20).

2.1.2 Tulosten analysointi LOEC-arvon estimoimiseksi

Jos testissä on rinnakkaiset tankit kaikilla pitoisuuksilla, LOEC-arvon estimointi voi perustua tankkikohtaisen keskimääräisen spesifisen kasvunopeuden varianssianalyysiin (ANOVA) (ks. kohta 2.1), jonka jälkeen sopivalla menetelmällä (esim. Dunnettin tai Williamsin testillä (12)(13)(14)(21)) verrataan kullakin pitoisuudella saatua r-arvoa kontrollien keskimääräiseen r-arvoon, jotta voidaan tunnistaa pienin pitoisuus, jolla kyseinen ero on merkitsevä todennäköisyystasolla 0.05. Jos parametristen menetelmien edellyttämät vaatimukset eivät täyty – epänormaali jakauma (esim. Shapiro-Wilkin testi) tai heterogeeninen varianssi (Bartlettin testi) – olisi harkittava mittaustulosten muuntamista varianssien homogenisoimiseksi ennen ANOVA-analyysiä tai painotetun ANOVAn tekemistä.

Jos testissä ei ole rinnakkaisia tankkeja kaikilla pitoisuuksilla, tankkeihin perustuva ANOVA on epäherkkä tai mahdoton suorittaa. Tällaisessa tilanteessa on hyväksyttävää perustaa ANOVA yksittäisten kalojen spesifiseen pseudokasvunopeuteen r_3 .

Kunkin testipitoisuuden keskimääräistä r_3 -arvoa voidaan sitten verrata kontrollien keskimääräiseen r_3 -arvoon. LOEC-arvo voidaan sitten määrittää kuten edellä. On todettava, että tässä menetelmässä ei voida ottaa lainkaan huomioon suurempaa tankkien välistä vaihtelua kuin minkä yksittäisten kalojen välinen vaihtelu selittää. Kokemus on kuitenkin osoittanut (8), että tankkien välinen vaihtelu on erittäin pieni verrattuna tankkinsisäiseen (ts. kalojen väliseen) vaihteluun. Jos analyysi ei ota huomioon yksittäisiä kaloja, on selostettava suuresti poikkeavien näytteiden tunnistamiseen käytetty menetelmä ja perusteltava se.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnessa on oltava varovainen, jos testiliuosten myrkyllisen aineen pitoisuudet ovat lähellä määrittämenetelmän havaitsemisrajaa tai jos puolistaattisessa testissä testiaineen pitoisuus ennen liuoksen vaihtoa on pienempi kuin juuri valmistetussa liuoksessa.

2.3 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.3.1 Testiaine

- fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä
- kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtausaste, ja testiaineen kvantifointiin käytettävä analyttinen menetelmä (tarvittaessa).

2.3.2 Testissä käytettävät kalalajit

- mahdollisesti tieteellinen nimi
- kanta, koko, toimittaja, mahdolliset esikäsittelyt jne.

2.3.3 Koelosuhteet:

- käytetty testimenetelmätyyppi (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, lastaustiheys, varastotiheys)
- testin suunnittelu (esim. testiastioiden, testipitoisuuksien ja rinnakkaisten näytteiden lukumäärä, kalojen lukumäärä astiaa kohti)
- varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)
- nimelliset testipitoisuudet, mitattujen arvojen keskiarvot ja niiden keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset on tehty todella liuoksessa olevasta testiaineesta
- laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenneen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuus (jos se on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja muut mahdolliset mittaukset
- testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus.
- yksityiskohtaiset tiedot ruokinnasta (esim. rehu(je)n tyyppi, alkuperä, annettu määrä ja antotaajuus).

2.3.4 Tulokset:

- näyttö siitä, että kontrollit täyttivät eloonjäämistä koskevan validiteettivaatimuksen, ja missä tahansa pitoisuudessa esiintynyttä kuolleisuutta koskevat tarkat tiedot
- käytetyt analyyttiset tilastomenetelmät, rinnakkaisnäyte- tai kalaperusteiset tilastot, mittaustulosten käsittely ja käytettyjen tekniikoiden perustelut
- taulukoidut mittaustulokset yksittäisten kalojen painoista ja keskimääräisistä painoista päivinä 0, 14 (jos on mitattu) ja 28, tankkikohtaiset keskimääräiset kasvunopeudet tai spesifiset pseudokasvunopeudet ajanjaksoille 0-28 vuorokautta tai mahdollisesti ajanjaksoille 0-14 ja 14-28 vuorokautta
- tilastollisen analyysin (ts. regressioanalyysin tai ANOVAn) tulokset mieluiten taulukko- ja kuvaajamuodossa sekä LOEC-arvo ($p = 0.05$) ja NOEC-arvo tai EC_x -arvo sekä keskivirheet, jos mahdollista
- kalojen mahdolliset epätavalliset reaktiot ja testiaineen aiheuttamat mahdolliset näkyvät vaikutukset.

LÄHDELUETTELO

- 1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.
- 2) Ashley S., Mallett M.J. and Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- 3) Crossland N.O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, **14**, pp 1855-1870.
- 4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B.B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, **21**, pp 157-164.
- 5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.
- 6) Holcombe , G.W., Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. and Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Arch. Environ. Conta. Toxicol.* 28, pp 287-297.
- 7) Benoit, D.A., Holcombe, G.W. and Spehar, R.L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth, Minesota.
- 8) Stephan C.E. and Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891*, R C Bahner and D J Hansen, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 328-338.
- 9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 p.
- 10) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.
- 11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12 December 1991.
- 12) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, *J. Amer. Statist. Assoc.*, **50**, pp 1096-1121.
- 13) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, **20**, pp 482-491.
- 14) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* **27**, pp 103-117.
- 15) Johnston, W.L., Atkinson, J.L., Glanville N.T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* **120**, 123-133.

- 16) Quinton, J. C. and Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, 33-41.
- 17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Textbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 P.
- 18) Bruce, R.D. and Versteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.
- 19) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. and McIntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo alto, CA.
- 20) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- 21) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp 510-531.

LIITE 1

TESTIIN SUOSITELLUT KALALAJIT JA SOPIVAT TESTIOLOSUHTEET

Laji	Suosittelu lämpötila-alue (°C)	Valojaksot (tuntia)	Suosittellut kalojen painorajat testin alussa (g)	Vaadittu mittaustarkkuus	Lastaustiheys (g/l)	Varastotiheys (litraa kohti)	Rehu	Testin kesto (vrk)
Suosittellut kalalajit:								
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Kirjolohi	12.5 – 16.0	12 – 16	1 – 5	100 mg	1.2 – 2.0	4	Kaupallinen lohikalojen poikasten kuivarehu	≥ 28
Muita hyvin dokumentoituja lajeja:								
<i>Danio rerio</i> Seeparakala	21 – 25	12 – 16	0.050 – 0.100	1 mg	0.2 – 1.0	5 – 10	Elävää ravintoa (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	21 – 25	12 – 16	0.050 – 0.100	1 mg	0.2 – 1.0	5 – 20	Elävää ravintoa (<i>Brachionus</i> <i>Artemia</i>)	≥ 28

LIITE 2

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIAALLISIA OMINAISUUKSIA

AINE	PITOISUUS
Kiinteät aineet	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifebyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

LIITE 3

MYRKYLLISYYSTESTIIN SOVELTUVIEN PITOISUUKSIEN LOGARITMISET SARJAT (9)

Sarake (välillä 100–10 tai välillä 10–1 olevien pitoisuuksien lukumäärä)*						
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

* Sarakkeesta voi valita viiden (tai useamman) peräkkäisen pitoisuuden sarjan. Sarakkeessa (x) olevien pitoisuuksien keskiluvulla olevia arvoja on sarakkeessa (2x + 1). Luetellut arvot voivat olla prosenttiosuuksina tilavuusyksikköä tai painoyksikköä kohti ilmaistuja pitoisuuksia (mg/l tai µg/l). Arvot voidaan tarvittaessa jakaa tai kertoa kymmenen potensseilla. Saraketta 1 voidaan käyttää, jos myrkyllisyystaso on hyvin epävarma.

C.15 KALAN ALKIO- JA RUSKUAISPUSIVAIHEEN POIKASILLA TEHTÄVÄ LYHYTAIKAINEN MYRKYLLISYYSTESTI

1. MENETELMÄ

Tämä lyhytaikainen myrkyllisyystesti on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 212 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä lyhytaikainen kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen poikasilla tehtävä myrkyllisyystesti on lyhytaikainen testi, jossa altistetaan testiaineelle varhaisessa kehitysvaiheessa olevia kalan alkioita juuri hedelmöittyneistä munista ruskuaispussivaiheen loppuun asti. Alkio- ja ruskuaispussivaihetestissä ei anneta ravintoa, joten testi pitäisi lopettaa vaiheessa, jossa ruskuaispussivaihealkio saa vielä ravintonsa ruskuaispussista.

Testissä on tarkoitus määrittää kemikaalien letaalit ja rajoitetussa määrin subletaalit vaikutukset tietyn lajin tietyissä kehitysvaiheissa oleviin poikasiin. Tästä testistä saatavat tiedot olisivat hyödyllisiä, koska a) testin avulla voitaisiin muodostaa yhteys letaalien ja subletaalien vaikutusten välille, b) sitä voitaisiin käyttää joko täydellisen varhaiskehitysvaiheiden testin tai pitkäaikaisten myrkyllisyystestien seulontatestinä ja c) sillä voitaisiin testata lajeja, joiden kasvatuserämenetelmät eivät ole vielä niin kehittyneet, että hallittaisiin vaihe, jolloin eläin siirtyy endogeenisestä ravinnonotosta eksogeeniseen ravinnonottoon.

Olisi muistettava, että kemikaalien pitkäaikainen myrkyllisyys kaloille voidaan yleensä arvioida tarkasti vain testeillä, jotka kattavat kaikki kalan elinkierron vaiheet. Jos altistetaan vain tietyissä kehitysvaiheissa olevia kaloja, testin herkkyys kärsii, ja pitkäaikainen myrkyllisyys voidaan aliarvioida. Sen vuoksi on odotettavissa, että alkio- ja ruskuaispussivaihetesti on vähemmän herkkä kuin täydellinen varhaiskehitysvaiheiden testi, erityisesti kun kysymyksessä ovat erittäin lipofiiliset ($\log P_{ow} > 4$) kemikaalit ja sellaiset kemikaalit, joiden myrkyllisyysvaikutus on spesifinen. Kuitenkin voidaan odottaa, että kyseisten kahden testin väliset herkkyserot ovat pienempiä kemikaaleilla, joilla on epäspesifinen narkootinen vaikutus (1).

Ennen tämän testin julkaisemista useimmat tiedot alkio- ja ruskuaispussivaiheen kaloilla on saatu makeassa vedessä elävällä *Danio rerio* Hamilton-Buchanan -kalalla (Teleostei, Cyprinidae; yleinen nimi seeprakala). Tällä kalalla suoritettavasta testistä annetaan siksi yksityiskohtaisemmat ohjeet Liitteessä 1. Muitakin lajeja, joista on kokemusta, voidaan kuitenkin käyttää (Taulukko 1).

1.2 MÄÄRITELMÄT

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testiaineen testattu pitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan merkitsevän vaikutuksen (arvolla $p < 0,05$) verrattuna kontrolliin. Kuitenkin kaikilla LOEC-tasoa suuremmilla testipitoisuuksilla on oltava vähintään yhtä haitallinen vaikutus kuin LOEC-tasolla.

NOEC (No Observed Effect Concentration): Välittömästi LOEC-tasoa pienempi testipitoisuus.

1.3 TESTIN PERIAATE

Alkio- ja ruskuaispussivaiheessa olevia kaloja altistetaan veteen liuotetun testiaineen eri pitoisuuksille. Testi voidaan tehdä testiaineesta riippuen joko puolistaattisena tai läpivirtaustestinä. Testin alussa hedelmöityneet munat pannaan testiastioihin, ja testi lopetetaan juuri ennen kuin mahdollisten toukkien ruskuaispussi on imeytynyt täydellisesti yhdessäkään testiastiassa tai ennen kuin kontrolleissa havaitaan ravinnonpuutteesta johtuvia kuolemantapauksia. Letaalit ja subletaalit vaikutukset arvioidaan ja niitä verrataan kontrolliarvoihin pienimmän havaittavan vaikutuksen aiheuttavan pitoisuuden arvioimiseksi ja siitä edelleen sen pitoisuuden arvioimiseksi, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta. Vaihtoehtoisesti vaikutukset voidaan arvioida käyttämällä regressiomallia sen pitoisuuden estimoimiseksi, joka aiheuttaisi tietyn prosentuaalisen vaikutuksen (ts. LC/EC_x , jossa x on määritelty prosenttiarvo).

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Välittömän myrkyllisyyden testin (ks. menetelmä C.1) tulosten pitäisi olla käytettävissä. Mieluiten samalla lajilla tehdyn testin tuloksista voi olla hyötyä valittaessa sopivaa pitoisuusaluetta varhaisten kehitysvaiheiden testiin. Testiaineen vesiliukoisuuden (myös liukoisuuden testissä käytettävään veteen) ja höyrynpaineen pitäisi olla tiedossa. Käytettävissä pitäisi olla myös tarkkuudeltaan ja määritysrajaltaan tunnettu sopiva analyytinen menetelmä aineen määrittämiseksi kvantitatiivisesti testiliuoksissa.

Testiainetta koskevia tietoja, joista on hyötyä testiolosuhteiden määrittelemiseksi, ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, valostabiilisuus, stabiilisuus testiolosuhteissa, pK_a , P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin tulokset (ks. menetelmä C.4).

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos

- hedelmöityneiden munien eloonjäämisaste kontrolleissa ja tapauksen mukaan ainoastaan liuotinta sisältävissä astioissa on vähintään yhtä suuri kuin liitteissä 2 ja 3 on määritelty
- liuenteen hapen pitoisuus on 60 – 100 % ilman kyllästysarvosta koko testin ajan
- veden lämpötila vaihtelee enintään $\pm 1,5$ °C testiastioiden välillä tai peräkkäisinä päivinä milloin tahansa testin aikana ja on niissä rajoissa, jotka on määritelty kyseiselle testilajille (liitteet 2 ja 3).

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 Testiastiat

Mitä tahansa lasista tai kemiallisesti inertistä materiaalista valmistettua astiaa voi käyttää. Astian pitäisi olla riittävän suuri kalamäärään nähden (ks. kohta 1.7.1.2). Suositellaan, että testiastiat sijoitetaan satunnaistetusti koealueelle. Satunnaistettu eristetty sijoittelu siten, että kussakin käsittelyssä olevia testiastioita on kussakin eristetyssä sijoituspaikassa, on parempi kuin täysin satunnaistettu järjestely, jos laboratoriossa on järjestelmällisiä vaikutuksia, jotka voidaan hallita eristyksellä. Jos eristystä käytetään, se on otettava huomioon tulostietojen käsittelyssä. Testiastiat olisi suojattava ei-toivotuilta häiriöiltä.

1.6.2 Kalalajin valinta

Suosittelavat kalalajit luetellaan Taulukossa 1 A. Muitakin lajeja voidaan käyttää (esimerkkejä annetaan taulukossa 1 B), mutta testimenetelmää on silloin ehkä muutettava, jotta testiolosuhteet olisivat sopivat. Tällaisessa tapauksessa olisi selostettava syyt lajin ja koemenetelmän valitsemiseen.

1.6.3 Siitoskalojen kasvatus

Siitoskannan kasvatuksesta tyydyttävissä oloissa annetaan yksityiskohtaiset ohjeet OECD:n testiohjeessa nro 210¹ ja viitteissä (2)(3)(4)(5)(6).

1.6.4 Alkioiden ja toukkien käsittely

Alkioiden ja toukkien altistus voidaan tehdä ison astian sisällä olevissa pienemmissä astioissa, joiden laidoissa tai päädyissä on verkot, jolloin testiliuos pääsee virtaamaan astian läpi. Pienten astioiden läpi johdetaan pyörteetön virtaus ripustamalla astiat varteen, jota voidaan nostaa ja laskea astiassa siten, että eliöt ovat nestepinnan alla koko ajan. Myös lappoa ja nesteenisäysjärjestelmää voidaan käyttää. Hedelmöityneitä lohensukuisten kalojen munia voidaan pitää telineissä tai verkoissa, joiden reiät ovat niin suuret, että toukat putoavat niistä läpi kuoriuduttuaan. Pasteur-pipettejä voidaan käyttää alkioiden ja toukkien poistamiseksi puolistaattisissa testeissä, jossa neste vaihdetaan päivittäin (ks. kohta 1.6.6).

Jos munien pitämiseksi isossa testiastiasa käytetään telineitä, ritilöitä tai verkkoja, ne olisi poistettava toukkien kuoriutumisen jälkeen¹. Verkot pitäisi kuitenkin säilyttää kalojen karkaamisen estämiseksi. Jos toukkia on siirrettävä, niitä ei saisi ottaa vedestä ilmaan eikä verkkoja saisi käyttää kalojen irrottamiseksi munatelineistä (tämä varokeino ei ehkä ole tarpeen, jos käytetään kestävämpiä kalalajeja, kuten karppeja). Siirtoajankohta vaihtelee lajeittain, eikä siirto ehkä ole aina välttämätöntä. Puolistaattisessa menetelmässä voidaan käyttää dekanterilaseja tai matalia astioita, ja niihin voi tarvittaessa kiinnittää verkon hieman pohjan yläpuolelle. Jos astiat ovat riittävän suuria kalamäärään nähden (ks. 1.7.1.2), alkioita tai toukkia ei ehkä tarvitse siirtää.

1.6.5 Vesi

Testivedeksi käy vesi, joka täyttää liitteessä 4 mainitut hyväksyttävän laimennusveden kemiallisia ominaisuuksia koskevat vaatimukset ja jossa testilaji säilyy elossa vähintään yhtä kauan kuin liitteissä 2 ja 3 edellytetään. Veden laadun on oltava tasainen testin ajan. pH:n vaihtelu ei saisi olla suurempi kuin $\pm 0,5$ pH-yksikköä. Sen varmistamiseksi, ettei laimennusvesi vaikuta liikaa testituloksiin (esimerkiksi kompleksoimalla testattavaa ainetta) tai haitallisesti siitoskalakannan vointiin, näytteitä olisi otettava säännöllisin väliajoin määrityksiä varten. Raskasmetallit (esim. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), tärkeimmät anionit ja kationit (esim. Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), torjunta-aineet (esim. orgaanista fosforia ja orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaispitoisuudet), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus ja suspendoituneet kiinteät aineet olisi määritettävä esimerkiksi kolmen kuukauden välein, jos laimennusveden laatu tiedetään suhteellisen vakioksi. Jos veden laadun on osoitettu pysyvän vakiona ainakin vuoden ajan, määrityksiä voidaan tehdä harvemmin (esim. kuuden kuukauden välein).

¹ OECD, Pariisi, 1992, Test Guideline 210, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test".

1.6.6 Testiliuokset

Halutunpitoiset testiliuokset valmistetaan varastoliuoksista laimentamalla.

Varastoliuos valmistetaan sekoittamalla testattava aine laimennusveteen käyttäen mieluiten mekaanisia menetelmiä tai ultraääntä. Saturaatiopylväitä (liukoisuuspylväitä) voi käyttää riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Liuottimien tai dispergointiaineiden (liuotusapuaineiden) käyttöä on vältettävä, jos mahdollista. Ne voivat kuitenkin olla joskus välttämättömiä riittävän väkevän varastoliuoksen valmistamiseksi. Sopivia liuottimia ovat esimerkiksi asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esimerkiksi Cremophor RH40, Tween 80, 0,01-prosenttinen metyyliiselluloosa ja HCO-40. Helposti biohajoavia aineita (kuten asetonia) ja/tai helposti haihtuvia aineita käytettäessä on oltava varovainen, koska ne voivat aiheuttaa ongelmia bakteerikasvuston takia läpivirtaustesteissä. Jos käytetään liuotusapuaineita, niillä ei saa olla merkittävää vaikutusta eloonjäämiseen eikä näkyviä haitallisia vaikutuksia varhaisiin kehitysvaiheisiin. Tämä on osoitettava pelkkää liuotinta sisältävällä kontrollilla. Tällaisten aineiden käyttöä on kuitenkin pyrittävä välttämään aina, kun se on mahdollista.

Puolistaattisissa testissä voidaan käyttää kahta eri liuoksenvaihtomenetelmää: i) uudet testiliuokset valmistetaan puhtaissa astioissa ja elossa pysyneet munat ja toukat siirretään varovasti uusiin astioihin pienessä määrässä vanhaa liuosta välttämällä kosketusta ilman kanssa tai ii) testieliöt pidetään astioissa ja osa (vähintään kolme neljäsosa) testivedestä vaihdetaan. Kasvatusnesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta, mutta vaihtoa suositellaan kerran päivässä. Jos alustavista stabiilisuustesteistä (ks. kohta 1.4) tiedetään, ettei testiaineen pitoisuus pysy vakiona (ts. se ei ole välillä 80 – 120 % nimellisarvosta tai se laskee alle 80 prosentin mitatusta alkupitoisuudesta) vaihtojen välillä, olisi harkittava läpivirtaustestiä. Joka tapauksessa olisi varottava stressaamasta toukkia veden vaihdon yhteydessä.

Läpivirtaustesteissä on käytettävä testiaineen varastoliuosta jatkuvasti annostelevaa ja laimentavaa järjestelmää (esim. annostelupumppua, laimenninta, kyllästävää järjestelmää) testipitoisuuksien annostelemiseksi testiastioihin. Varastoliuosten ja laimennusveden virtausnopeudet on tarkistettava säännöllisin väliajoin, mieluiten kerran päivässä, ja virtausnopeus saisi vaihdella enintään 10 % koko testin aikana. Virtausnopeus, joka on vähintään viisi kertaa testiastian tilavuus 24 tunnissa, on havaittu sopivaksi (2).

1.7 MENETTELY

Kirjallisuudesta löytyy hyödyllistä tietoa kalan alkio- ja ruskuaispussivaiheen myrkyllisyystestin suorituskyvystä. Joitakin esimerkkejä on tämän ohjeen kirjallisuusluettelossa (7)(8)(9).

1.7.1 Altistusolosuhteet

1.7.1.1 Testin kesto

Testi olisi aloitettava 30 minuutin kuluessa munien hedelmöityksestä. Alkiot upotetaan testiliuokseen ennen alkiolevyn jakaantumisvaihetta tai mahdollisimman pian sen jälkeen, ja joka tapauksessa ennen gastrulavaiheen alkamista. Jos munat on hankittu kaupalliselta toimittajalta, ei testiä voi ehkä aloittaa heti hedelmöityksen jälkeen. Koska testin herkkyys voi kärsiä huomattavasti aloituksen viivästyksen johdosta, testi olisi aloitettava 8 tunnin kuluessa hedelmöityksestä. Koska toukkia ei ruokita altistuksen aikana, testi olisi lopetettava juuri ennen kuin mahdollisten toukkien ruskuaispussi on imeytynyt täydellisesti yhdessäkin testiastiassa tai ennen kuin kontrolleissa havaitaan ravinnonpuutteesta johtuvia kuolemantapauksia. Testin kesto riippuu käytetystä lajista. Liitteissä 2 ja 3 annetaan joitakin suosituksia testin kestosta.

1.7.1.2 *Kalojen lisääminen testiastiaan*

Hedelmöityneiden munien määrän testin alussa pitäisi olla riittävä tilastollista käsittelyä varten. Munat olisi jaettava satunnaistetusti eri käsittelyryhmiin, ja yhtä pitoisuutta kohti olisi käytettävä vähintään 30 hedelmöitynyttä munaa tasaisesti jaettuina (tai niin tasaisesti kuin mahdollista, koska voi olla vaikeaa saada aikaan yhtä suurua erää joillakin lajeilla) vähintään kolmeen rinnakkaiseen testiastiaan. Kalojen määrän (biomassa testiliuoksen tilavuusyksikköä kohti) pitäisi olla niin pieni, että liuon hapen pitoisuus voidaan pitää vähintään arvossa 60 % ilman ilmastusta. On suositeltu, että läpivirtaustesteissä kalojen määrä saa olla enintään 0,5 g/l per 24 tuntia ja enintään 5 g/l liuosta minä tahansa ajankohtana (2).

1.7.1.3 *Valo ja lämpötila*

Valoisan ajan ja testiveden lämpötilan pitäisi olla sopivia käytetylle testilajille (liitteet 2 ja 3). Lämpötilan seuranta varten voi olla tarpeen ylimääräinen testiastia.

1.7.2 **Testipitoisuudet**

Tavallisesti tarvitaan viisi testiaineen pitoisuutta, joiden välinen ero on vakio ja enintään 3,2-kertainen. Käyrää, jossa esitetään LC_{50} välittömän myrkyllisyydestin altistusajan funktiona, olisi käytettävä apuna valittaessa testipitoisuusaluetta. Vähemmän kuin viisi pitoisuutta voi olla riittävä määrä esim. raja-arvotesteissä, ja pitoisuuksien väli voi olla pienempi joissakin tapauksissa. Jos käytetään alle viittä testipitoisuutta, se on perusteltava. Pitoisuuksia, jotka ovat suurempia kuin 96 tunnin LC_{50} tai 100 mg/l (näistä alhaisempi arvo), ei tarvitse testata. Kemikaaleja ei pitäisi testata niiden liukoisuusrajaa suuremmissa pitoisuuksissa.

Kun testiliuosten valmistuksessa käytetään jotakin liuotusapuaainetta (ks. kohta 1.6.6), sen lopputilavuus testiastioissa ei saisi olla suurempi kuin 0,1 ml/l, ja tilavuuden pitäisi olla sama kaikissa testiastioissa.

1.7.3 **Kontrollit**

Testisarjan lisäksi on määritettävä yksi laimennusvesikontrolli (ja rinnakkaiset) sekä tapauksen mukaan yksi kontrolli, jossa on liuotusapuaainetta (ja asianmukaiset rinnakkaiset).

1.7.4 **Analyttisten määritysten ja mitausten taajuus**

Testiaineen pitoisuudet on määritettävä määräjain testin aikana.

Suosittelaaan, että puolistaattisissa testeissä, joissa testiainepitoisuuden odotetaan pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (ts. välillä 80 – 120 %; ks. kohta 1.4 ja 1.6.6), analysoidaan vähintään suurin ja pienin pitoisuus juuri valmistetusta liuksesta ja juuri ennen liuoksen vaihtoa vähintään kolme kertaa testin aikana tasaisin väliajoin (ts. samasta liuksesta otetaan näyte, kun liuos on juuri valmistettu ja liuosta vaihdettaessa).

Jos testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän 20 prosentin sisällä nimellisarvosta (aineen stabiilisuutta koskevien tietojen perusteella), on analysoitava kaikki pitoisuudet tuoreesta liuksesta ja liuosta vaihdettaessa noudattaen samanlaista järjestelmää (eli vähintään kolme kertaa testin aikana tasaisin väliajoin). Ennen liuoksen vaihtoa tehtävä määrittäminen tarvitsee tehdä vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullakin testipitoisuudella. Määritysten väli saa olla enintään seitsemän vuorokautta. Suositellaan, että tulosten perusteina käytetään mitattuja pitoisuuksia. Jos kuitenkin on näyttöä siitä, että testiaineen pitoisuus pysyy tyydyttävästi 20 prosentin sisällä nimellispitoisuudesta tai mitatusta alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulosten perustana voidaan käyttää nimellispitoisuutta tai mitattua alkupitoisuutta.

Läpivirtaustesteille sopii samanlainen näytteenottojärjestelmä kuin puolistaattisille testeille (vaikka "vanhoja" liuoksia ei mitata). Jos testi kuitenkin kestää yli seitsemän vuorokautta, voi olla suositeltavaa lisätä näytteiden lukumäärää ensimmäisen viikon aikana (esim. kolme sarjaa määrittäviä) sen varmistamiseksi, että testipitoisuudet ovat pysyneet stabiileina.

Näytteet voivat edellyttää sentrifugointia tai suodatusta (esim. 0,45 µm:n huokoskoon suotimella). Koska sen enempää sentrifugoimalla kuin suodattamalla ei aina pystytä erottamaan testiaineen biologisesti hyödyntämiskelvotonta osaa biologisesti hyödynnettävästä osasta, näytteille ei tarvitse välttämättä tehdä kyseisiä toimenpiteitä.

Liennut happi, pH ja lämpötila on mitattava testin aikana kaikista testiastioista. Veden kokonaiskovuus ja suolapitoisuus, jos se on merkityksellinen, mitataan kontroleista ja yhdestä astiasta, jossa on suurin pitoisuus. Liennut happi ja suolapitoisuus, jos se on merkityksellinen, olisi mitattava kolmesti (testin alussa, keskivaiheilla ja lopussa). Suositellaan, että puolistaattisissa testeissä liennut happi mitataan useammin, mieluiten ennen kutakin veden vaihtoa ja sen jälkeen tai vähintään kerran viikossa. pH olisi mitattava kunkin vedenvaihdon alussa ja lopussa puolistaattisissa testeissä ja vähintään viikoittain läpivirtaustesteissä. Kovuus olisi mitattava kerran testin aikana. Lämpötila olisi mitattava päivittäin, ja sitä olisi mielellään seurattava jatkuvasti vähintään yhdessä testiastiassa.

1.7.5 **Havainnot**

1.7.5.1 *Alkiokehityksen vaiheet*

Alkiokehitysvaihe alistuksen alussa (ts. gastrulaatiovaihe) olisi varmistettava mahdollisimman tarkasti. Siinä voidaan käyttää sopivasti säilytettyä ja kirkastettua edustavaa näytettä munista. Kuvauksia ja kuvia alkiokehityksen vaiheista löytyy kirjallisuudesta (2)(5)(10)(11).

1.7.5.2 *Kuoriutumisen ja eloonjääminen*

Kuoriutumisesta ja eloonjäämisestä olisi tehtävä havaintoja vähintään kerran päivässä, ja yksilöiden lukumäärät on kirjattava. Voi olla toivottavaa tehdä havaintoja tiheämmin testin alussa (esim. 30 minuutin välein kolmen ensimmäisen tunnin aikana), koska joissakin tapauksissa elossapysymisaika voi olla merkityksellisempi kuin kuolemantapauksien lukumäärä (esim. silloin kun on välittömiä myrkyvaikutuksia). Kuolleet alkio ja toukat olisi poistettava heti, kun ne havaitaan, koska ne voivat hajota nopeasti. Kuolleita yksilöitä poistettaessa on oltava erittäin varovainen, ettei vieressä olevia muna tai toukkia kosketa tai vahingoiteta fyysisesti, sillä ne ovat hyvin herkkiä ja hauraita. Kuolemantapaukset todetaan eri kehitysvaiheessa eri tavoin:

- **munat:** erityisesti varhaisvaiheissa läpikuultavuus vähenee ja väri muuttuu, mikä johtuu valkuaisaineiden hyytymisestä ja/tai saostumisesta, josta on seurauksena valkoinen väri ja läpinäkymättömyys
- **alkiot:** vartalo ei liiku ja/tai sydän ei lyö ja /tai läpinäkymättömyys tai värinmuutos sellaisessa lajissa, jonka alkio ovat normaalisti läpikuultavia
- **toukat:** toukat eivät liiku ja/tai niiden hengitysliikkeet puuttuvat ja/tai sydän ei lyö ja/tai keskushermosto on valkoinen ja läpinäkymätön ja/tai toukka ei reagoi mekaanisiin ärsykkeisiin.

1.7.5.3 *Epänormaali ulkonäkö*

Sellaisten toukkien lukumäärä, joiden ruumiinmuodossa havaitaan epänormaalisuutta ja/tai pigmentaatiota, sekä ruskuaispussin absorptioaste olisi kirjattava määräjain testin kestosta ja kuvatun epänormaalisuuden laadusta riippuen. Huomattakoon, että epänormaaleja alkioita ja toukkia esiintyy luonnollisesti, ja niiden määrä voi olla useita prosentteja kontroll(e)issa joissakin lajeissa. Epänormaalit eläimet olisi vain poistettava testiastioista, kun ne kuolevat.

1.7.5.4 *Epänormaali käyttäytyminen*

Epänormaali käyttäytyminen, esimerkiksi hyperventilaatio, koordinoimaton uinti ja epätyypillinen liikkumattomuus, olisi kirjattava sopivin väliajoin testin aikana. Vaikka tällaisia vaikutuksia on vaikea kvantifioida, niiden havainnoiminen voi auttaa kuolleisuusdatan tulkinnassa, ts. niistä voi saada tietoa aineen myrkyvaikutuksen laadusta.

1.7.5.5 *Pituus*

Suosittelaaan, että testin lopussa mitataan yksilöiden pituus. Voidaan käyttää vakio-, lovi- tai kokonaispituutta. Jos pyrstöevä tai muut evät ovat syöpyneet, on käytettävä vakiopituutta. Hyvin tehdyssä testissä kontrollirinnakkaisten pituuden vaihtelukerroin saisi olla enintään 20 %.

1.7.5.6 *Paino*

Testin lopussa voidaan punnita yksittäiset eläimet. Kuivapaino (24 tuntia, 60 °C) on suositeltavampi kuin märkäpaino (eläimet kuivataan pinnalta). Hyvin tehdyssä testissä kontrollirinnakkaisten painon vaihtelukerroin saisi olla enintään 20 %.

Näistä havainnoista saadaan tietoja seuraaviin tilastollisiin analyyseihin:

- kertyvä kuolleisuus
- terveiden toukkien lukumäärä testin lopussa
- aika kuoriutumisvaiheen alkuun ja loppuun (ts. kun 90 % kuoriutunut kussakin rinnakkaisnäytteessä)
- kunakin päivänä kuoriutuneiden toukkien lukumäärä
- elossa olevien eläinten pituus (ja paino) testin lopussa
- epämuodostuneiden tai epätavalliselta näyttävien toukkien lukumäärä
- epätavallisesti käyttäytyvien toukkien lukumäärä.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Suosittelaaan, että sekä testin suunnittelussa että analysoinnissa on mukana tilastotieteilijä, koska menetelmä mahdollistaa huomattavan vaihtelun kokeen suunnittelussa. Esim. testiastioiden lukumäärä, testipitoisuuksien lukumäärä, hedelmöityneiden munien lukumäärä testin alussa ja mitattava muuttuja voivat vaihdella. Koska testi voidaan suunnitella monella tavalla, tässä ei anneta erityisohjeita tilastomenetelmistä.

Jos on tarkoitus arvioida LOEC/NOEC, on variaatiot analysoitava kussakin rinnakkaisten joukossa varianssianalyysillä (ANOVA) tai kontingenssitaulukkomenetelmillä. Jos halutaan tehdä yhteisvertailu yksittäisten pitoisuuksien ja kontrollien välillä, Dunnettin menetelmästä voi olla hyötyä (12)(13). Muitakin hyviä esimerkkejä on saatavilla (14)(15). ANOVAa tai muita menetelmiä käyttämällä saatujen vaikutusten suuruus (ts. testin suorituskyky) olisi laskettava ja ilmoitettava. On huomattava, etteivät kaikki kohdassa 1.7.5.6 luetellut havainnot sovellu ANOVA-analyysiin. Esimerkiksi kertyvä kuolleisuus ja testin lopussa elossa olevien toukkien määrät voitaisiin analysoida probittimenetelmillä.

Jos on tarkoitus arvioida LC/EC_x, olisi sovitettava sopiva(t) käyrä(t), kuten logistinen käyrä, kyseessä oleviin mittaus tietoihin käyttäen jotakin tilastomenetelmää, kuten pienimmän neliösumman menetelmää tai epälineaarista pienimmän neliösumman menetelmää. Käyrissä on käytettävä sellaisia muuttujia, että haluttu LC/EC_x ja sen vakiopoikkeama voidaan estimoida suoraan. Se helpottaa suuresti luottamusrajojen laskemista LC/EC_x:lle. Sovitusmenetelmän olisi oltava sellainen, sen avulla voitaisiin arvioida sovituksen onnistumisen (tai sen puutteen) merkitsevyys. Ellei ole painavia syitä muunsuuruisten luottamusvälien käyttöön, olisi ilmoitettava kaksipuolinen 95 prosentin luottamusväli. Käyrien sovittamiseen voidaan käyttää graafisia menetelmiä. Regressioanalyysi soveltuu kaikkiin kohdassa 1.7.5.6 mainittuihin havaintoihin.

2.2 TULOSTEN TULKINTA

Tulosten tulkinnaassa on oltava varovainen, jos testiliuoksista mitatut myrkyllisen aineen pitoisuudet ovat lähellä määrittymen etelmän havaitsemisrajaa. Myös aineen liukoisuustuloa suuremmilla pitoisuuksilla saatujen tulosten tulkinnaassa on oltava varovainen.

2.3 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.3.1 Testiaine

- fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä
- kemialliset tunnistetiedot, mukaan luettuna puhtaus, ja testiaineen kvantituintiin käytettävä analyttinen menetelmä (tarvittaessa).

2.3.2 Testissä käytettävät kalalajit

- tieteellinen nimi, kanta, siitoskalojen lukumäärä (ts. kuinka monta naarasta käytettiin testissä käytettyjen munien tuottamiseen), hedelmöityneiden munien toimittaja ja keräysmenetelmä sekä munien myöhempi käsittely.

2.3.3

Koekolosuhteet:

- käytetty testimenetelmätyyppi (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, aika hedelmöitymisestä testin alkuun, testiastian lisättyjen emokalojen määrä)
- valoisa aika (valoisat aikajaksot)
- testin suunnittelu (esim. testiastioiden ja rinnakkaisten näytteiden lukumäärä, alkioiden määrä kussakin rinnakkaisastiassa)
- varastoliuosten valmistusmenetelmä ja nesteen vaihtojen väli (liuotusapuaine ja sen pitoisuus on ilmoitettava, jos sellaista käytetään)
- nimelliset testipitoisuudet, mitatut arvot, niiden keskiarvot ja keskihajonnat testiastioissa, niiden laskemiseen käytetty menetelmä sekä näyttö siitä, että mittaukset on tehty liuoksessa olevasta testiaineesta, mikäli testiaine on vesiliukoinen testipitoisuuksia pienemmissä pitoisuuksissa
- laimennukseen käytetyn veden ominaisuudet: pH, kovuus, lämpötila, liuenteen hapen pitoisuus, jäännösklooripitoisuudet (jos ne on mitattu), orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä, suspensiossa olevat kiinteät aineet, testiväliaineen suolapitoisuus (jos se on mitattu) ja muut mahdolliset mittaukset
- testiastioissa olevan veden laatu: pH, kovuus, lämpötila ja liuenteen hapen pitoisuus.

2.3.4

Tulokset:

- mahdollisista alustavista kokeista saadut testiaineen stabiilisuutta koskevat tulokset
- näyttö siitä, että kontrollit täyttivät yleiset testilajin elinkyvyn hyväksyttävyyttä koskevat vaatimukset (liitteet 2 ja 3)
- alkio- ja toukkavaiheen sekä yleistä kuolleisuutta/elinkykyä koskevat tulokset
- päivien lukumäärä kuoriutumiseen ja kuoriutuneiden toukkien lukumäärä
- pituus (ja paino)
- mahdollisten epämuodostumien ilmaantuvuus ja kuvaus
- mahdollisten käyttäytymismuutosten ilmaantuvuus ja kuvaus
- tulosten tilastollinen analyysi ja käsittely
- ANOVAlla analysoiduille testeille LOEC (pienin havaittavan vaikutuksen aiheuttava pitoisuus) arvolla $p = 0,05$ ja NOEC (pitoisuus, joka ei aiheuta havaittavaa vaikutusta) kullekin arvioidulle vasteelle sekä käytettyjen tilastomenetelmien kuvaus ja ilmoitus havaitun vaikutuksen suuruudesta
- regressiotekniikoilla arvioiduille testeille LC/EC_x ja luottamusvälit sekä sen laskemiseen käytetyn sovitussmallin kuvaaja
- selitys mahdollisiin poikkeamiin tästä testimenetelmästä.

LÄHDELUETTELO

- (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, pp 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 pp.
- (3) Brauhn J.L. and Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p.54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- (4) Brungs W.A. and Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- (5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. **10**, 121-173.
- (6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, **4**, pp 328-330.
- (7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, **6**, pp 61-71.
- (8) Birge J.W., Black J.A. and Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry **4**, pp 807-821.
- (9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.
- (10) Kirchen R.V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- (11) Kirchen R.V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- (12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.
- (15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, **16**, pp 321-334.
- (16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, pp 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 pp.
- (25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar and D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp 1-58.

TAULUKKO 1 A: KALALAJIT, JOITA SUOSITELLAAN KÄYTETTÄVÄKSI TESTISSÄ

MAKEAN VEDEN KALAT
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Kirjolohi (9)(16)
<i>Danio rerio</i> Seeprakala (7)(17)(18)
<i>Cyprinus carpio</i> Karppi (8)(19)
<i>Oryzias latipes</i> Medaka (20)(21)
<i>Pimephales promelas</i> Paksupäämutu (8)(22)

TAULUKKO 1 B: ESIMERKKEJÄ MUISTA HYVIN DOKUMENTOIDUISTA LAJEISTA, JOITA ON MYÖS KÄYTETTY

MAKEAN VEDEN KALAT	SUOLAISEN VEDEN KALAT
<i>Carassius auratus</i> Kultakala (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside (23)(24)(25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Isoaurinkoahven (8)	<i>Clupea harengus</i> Silli (24)(25)
	<i>Gadus morhua</i> Turska (24)(25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Loistohammaskarppi (23)(24)(25)

LIITE 1
OHJEITA SEEPRAKALAN (*Brachydanio rerio*) ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHEEN
POIKASILLA TEHTÄVÄN MYRKYLLISYYSTESTIN SUORITTAMISEKSI

JOHDANTO

Seepprakala on peräisin Intian Coromandel-rannikolta, jossa se asuu voimakkaasti virtaavissa joissa. Se on yleinen karpinsukuinen akvaariokala, ja ohjeita sen hoidosta ja kasvatuksesta annetaan trooppisia kaloja koskevilla kirjoissa. Seeprakalan biologiaa ja käyttöä kalatutkimuksessa on selostettu viitteessä Laale (1).

Seeprakala on harvoin pitempi kuin 45 mm. Ruumis on lieriömäinen, ja siinä on 7– 9 tummansinistä vaakasuoraa hopeanhohtavaa raitaa. Raidat päättyvät pyrstö- ja peräeviin. Selkä on oliivinvihreä. Koiraat ovat naaraita hoikempia. Naarailta on voimakkaampi hopeanväri kuin koirailta ja niiden vatsa on isompi, erityisesti ennen mätimunien laskua.

Aikuiset kalat sietävät suuria lämpötilan, pH:n ja veden kovuuden vaihteluita. Jotta kalat olisivat terveitä ja tuottaisivat hyvälaatuisia munia, niille on kuitenkin tarjottava hyvät elinolot.

Parittelun yhteydessä koiras jahtaa ja puskee naarasta, ja mätimunat hedelmöittyvät, kun naaras laskee munat. Munat ovat läpikuultavia ja liukkaita ja vajoavat pohjaan. Aikuiset kalat voivat syödä niitä. Valo vaikuttaa paritteluun. Jos aamuvalo on riittävä, seepprakala parittelee yleensä aamunkoiton jälkeisinä tunteina.

Naaras voi tuottaa useita satoja munia viikon välein.

EMOKALAT, LISÄÄNTYMINEN JA VARHAISET KEHITYSVAIHEET

Valitaan sopiva määrä terveitä kaloja ja pidetään niitä sopivanlaatuksessa vedessä (esim. liite 4) vähintään 2 viikkoa ennen aiottua parittelua. Kalaryhmän pitäisi antaa paritella vähintään kerran ennen kuin tuotetaan testiä varten tarkoitettu munaerä. Kalojen määrä tänä aikana saisi olla enintään 1 gramma kalaa litrassa. Kalojen määrä voi olla suurempi, jos vesi vaihdetaan säännöllisesti tai käytetään puhdistusjärjestelmää. Kasvatustankkien lämpötilan olisi oltava 25 ± 2 °C. Kaloille pitäisi antaa vaihtelevaa ravintoa, jossa voi olla esimerkiksi sopivaa kaupallista kuivarehua, eläviä vasta kuoriutuneita *Artemia*-vesikirppuja, surviaissääskiä, *Daphnia*-vesikirppuja ja ankyrimatoja (*Enchytraeids*).

Seuraavassa selostetaan kaksi menetelmää, joilla on saatu käytännössä riittävä määrä terveitä, hedelmöityneitä munia testiä varten:

- i. Kahdeksan naarasta ja 16 koirasta pannaan tankkiin, jossa on 50 litraa laimennusvettä ja joka on suojattu suoralta auringonvalolta. Tankin annetaan olla mahdollisimman häiriöttä vähintään 48 tuntia. Testiä edeltävänä päivänä iltapäivällä akvaarion pohjalle asetetaan parittelutarjotin, jossa on 5–7 cm korkea kehys (pleksilasia tai muuta sopivaa materiaalia), 2–5 mm:n isoreikäinen verkko yläosassa ja 10-30 µm:n hieno verkko pohjassa. Kehyksen isoreikäiseen verkkoon kiinnitetään useita auki kierretystä nailonnarusta tehtyjä "parittelupuita". Kun kalat ovat olleet pimeässä 12 tuntia, sytytetään heikko valo, joka käynnistää parittelun. Kahdesta neljään tuntia parittelun jälkeen tarjotin otetaan pois ja munat kerätään. Tarjotin estää kaloja syömästä munia, ja samalla munat on helppo kerätä siitä. Kalaryhmän pitäisi antaa paritella vähintään kerran ennen kuin tuotetaan testiä varten tarkoitettu munaerä.

- ii. Viidestä kymmeneen koiras- ja naaraskalaa kasvatetaan yksittäin vähintään 2 viikkoa ennen aiottua parittelua. 5–10 päivän kuluttua naaraiden vatsat ovat isot ja genitaalinytysty näkyviä. Koiraskaloilla ei ole kyseisiä nystyjä. Parittelu tapahtuu parittelutankeissa, joissa on verkosta tehty valepohja (kuten edellä). Tankki täytetään laimennusvedellä niin, että vettä on verkon päällä 5–10 cm. Yksi naaras ja kaksi koirasta pannaan tankkiin päivää ennen aiottua parittelua. Veden lämpötilaa nostetaan vähitellen yhden asteen korkeammalle kuin totuttelulämpötila. Valo sammutetaan ja tankki jätetään mahdollisimman häiriöttä. Aamulla sytytään heikko valo, joka käynnistää parittelun. Kahdesta neljään tuntia parittelun jälkeen kalat otetaan pois ja munat kerätään. Jos tarvitaan enemmän munia kuin yhdeltä naaraalta saadaan, käytetään useampia parittelutankkeja. Kirjaamalla yksittäisten naaraiden jälkeläistentuotto ennen testiä (munien määrä ja laatu) voidaan valita parhaimmat naaraat poikasten tuottoon.

Munat olisi siirrettävä testiastioihin ohuilla lasiputkilla (sisähalkaisija vähintään 4 mm), joissa on imututti. Munien kanssa tulevan veden määrän pitäisi olla mahdollisimman pieni. Munat ovat vettä raskaampia ja putoavat putkesta. Munat (ja toukat) eivät saisi joutua kosketuksiin ilman kanssa. Munista pitäisi ottaa näytteitä ja tutkia niitä mikroskoopissa sen varmistamiseksi, ettei ensimmäisissä kehitysvaiheissa esiinny epänormaaleja ilmiöitä. Munia ei saa desinfioida.

Munien kuolleisuus on suurin ensimmäisten 24 tunnin aikana hedelmöityksestä. Kuolleisuus on tänä aikana usein 5–40 prosenttia. Munat hajoavat hedelmöitymisen epäonnistumisen tai kehityshäiriöiden takia. Munien laatu näyttää riippuvan naaraista, koska jotkut naaraat tuottavat jatkuvasti hyvälaatuisia munia ja toiset eivät koskaan. Myös kehitymis- ja kuoriutumisenopeus vaihtelevat munaerien välillä. Jos munien hedelmöitys on onnistunut, munat ja ruskuaispussivaiheen toukat (eloonjäämisprosentti yli 90) pysyvät hyvin elossa. Munat kuoriutuvat 25 °C:n lämpötilassa 3 – 5 päivää hedelmöityksen jälkeen, ja ruskuaispussi absorboituu noin 13 päivää hedelmöityksen jälkeen.

Hisaoka ja Battle (2) ovat kuvanneet hyvin sikiökehityksen. Koska munat ja toukat (kuoriutumisen jälkeen) ovat läpinäkyviä, kalojen kehitystä voidaan seurata ja epämuodostumia havainnoida. Noin 4 tuntia parittelun jälkeen hedelmöitymättömät munat voidaan erottaa hedelmöityneistä (3). Tätä tutkimusta varten munat ja toukat pannaan pieniin astioihin ja niitä tarkastellaan mikroskoopissa.

Liitteessä 2 kuvataan varhaisiin kehitysvaiheisiin sovellettavat testiolosuhteet. Optimiarvo pH:lle on 7,8 ja laimennusveden kovuudelle 250 mg CaCO₃/l.

LASKUTOIMITUKSET JA TILASTOLLINEN KÄSITTELY

Suosittelaa, että tulosten käsittelyssä on kaksi vaihetta. Ensin käsitellään tilastollisesti kuolleisuutta, epänormaalia kehittymistä ja kuoriutumisaikaa koskevat tulostiedot. Sitten arvioidaan tilastollisesti ruumiin pituus niillä pitoisuuksilla, joilla ei havaittu haitallisia vaikutuksia edellä mainituissa muuttujissa. Tällaista menettelyä suositellaan, koska myrky saattaa tappaa selektiivisesti pieniä kaloja, viivästyttää kuoriutumista ja aiheuttaa vakavia epämuodostumia, mikä johtaa vääristyneisiin pituuden mittauksiin. Lisäksi tällä tavoin menetelemällä saadaan suunnilleen sama määrä kaloja käsittelyä kohti, mikä varmistaa testin validiteetin.

LC₅₀- JA EC₅₀-MÄÄRITYKSET

Eloonjääneiden munien ja toukkien määrä lasketaan prosentteina ja korjataan kontrollien kuolleisuuden suhteen Abbottin kaavalla (4):

$$P=100-\left(\frac{C-P'}{C}\cdot x100\right)$$

jossa

P = korjattu eloonjäämisprosentti
P' = testipitoisuudessa havaittu eloonjäämisprosentti
C = kontrollien eloonjäämisprosentti

Jos mahdollista, LC₅₀ määritetään sopivalla menetelmällä testin lopussa.

Jos EC₅₀-tilastoihin halutaan sisällyttää epämuotoisuudet, ohjeita on viitteessä Stephan (5).

LOEC:N JA NOEC:N ESTIMOINTI

Muna- ja ruskuaispussitestin tarkoitus on verrata kontrolleja ja nollasta poikkeavia pitoisuuksia, ts. määrittää LOEC. Sen vuoksi olisi käytettävä yhteisvertailumenetelmiä (6)(7)(8)(9)(10).

LÄHDELUETTELO

- (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**, pp 311.
- (3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, **2**, pp 173-181.
- (4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1-333.
- (5) Stephan C.E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp 69-81.
- (6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc., **50**, pp 1096-1121.
- (7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, **20**, 482-491.
- (8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, **27**, pp. 103-117.
- (9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics **28**, pp 519-531.
- (10) Sokal R.R. and Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

LIITE 2

TESTIOLOSUHTEET, TESTIN KESTO JA ELOONJÄÄMISKRITEERIT SUOSITELLUILLE LAJEILLE

LAJI	LÄMPÖ- TILA (°)	SUOLA- PITOISUUS (0/00)	VALOISA AIKA (tuntia)	KEHITYSVAIHEIDEN KESTO (päivää)		TYYPILLINEN TESTIN KESTO	KONTROLLIEN ELOONJÄÄMISPROSENTTI (VÄHINTÄÄN)	
				Alkio	Ruskuais- pussi		Kuoriutumis- prosentti	Kuoriutumisen jälkeen
MAKEAN VEDEN KALA								
<i>Brachydanio rerio</i> Seeprakala	25 ± 1	–	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 5 vrk kuoriutumisen jälkeen (8– 10 vrk)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Kirjolohi	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	–	0 ^(a)	30 – 35	25 – 30	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 20 vrk kuoriutumisen jälkeen (50–55 vrk)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Karppi	21 – 25	–	12 – 16	5	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (8– 9 vrk)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Medaka	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	–	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 5 vrk kuoriutumisen jälkeen 13– 16 vrk)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Paksupäämutu	25 ± 2	–	16	4 – 5	5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (8– 9 vrk)	60	70

⁽¹⁾ Alkioille

⁽²⁾ Toukille

^(a) Alkiot ja toukat pidetään pimeässä viikon ajan kuoriutumisen jälkeen paitsi silloin, kun niitä tarkastellaan. Sen jälkeen heikko valaistus testin loppuun asti.

LIITE 3

TESTIOLOSUHTEET, TESTIN KESTO JA ELOONJÄÄMISKRITEERIT MUILLE HYVIN DOKUMENTOIDUILLE LAJEILLE

LAJI	LÄMPÖ-TILA (°C)	SUOLA-PITOISUUS (0/00)	VALOISA AIKA (tuntia)	KEHITYSVAIHEIDEN KESTO (vrk)		TYYPILLINEN ALKIO- JA RUSKUAISPUSSIVAIHETESTIN KESTO	KONTROLLIEN ELOONJÄÄMISPROSENTTI	
				ALKIO-VAIHE	RUSKUAIS-PUSSIVAIHE		Kuoritusprosentti	Kuoriutumisen jälkeen
MAKEAN VEDEN KALAT								
<i>Carassius auratus</i> Kultakala	24 ± 1	–	–	3 – 4	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (7 vrk)	–	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Isoaurinkoahven	21 ± 1	–	16	3	> 4	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 4 vrk kuoriutumisen jälkeen (7 vrk)	–	75
SUOLAISEN VEDEN KALAT								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside	22 – 25	15 – 22	12	1.5	10	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 5 vrk kuoriutumisen jälkeen (6–7 vrk)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Silli	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 3 vrk kuoriutumisen jälkeen (23–27 vrk)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Turska	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 3 vrk kuoriutumisen jälkeen (18 vrk)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Loistohammaskarppi	25 ± 1	15 – 30	12	–	–	Mahdollisimman pian hedelmöityksen jälkeen (varhainen gastrulavaihe) – 4/7 vrk kuoriutumisen jälkeen (28 vrk)	> 75	80

LIITE 4

JOITAKIN HYVÄKSYTTÄVÄN LAIMENNUSVEDEN KEMIAALLISIA OMINAISUUKSIA

AINE	PITOISUUS
Kiinteät aineet	< 20 mg/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaismäärä	< 2 mg/l
Ammoniakki (ionisoitumaton)	< 1 µg/l
Jäännöskloori	< 10 µg/l
Orgaanista fosforia sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä	< 50 ng/l
Orgaanista klooria sisältävien torjunta-aineiden kokonaismäärä ja polyklooratut bifenyylit	< 50 ng/l
Orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen kloorin kokonaismäärä	< 25 ng/l

C 16 MEHILÄISET – SUUN KAUPPA TAPAHTUNEEN ALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä välittömän myrkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 213 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä myrkyllisyystesti on laboratoriumenetelmä, jonka tarkoituksena on arvioida kasvinsuojeluaineiden ja muiden kemikaalien välitöntä myrkyllisyyttä täysikasvuisille työmehiläisille oraalisen eli suun kautta tapahtuneen altistuksen jälkeen.

Arvioitaessa kemikaalien myrkyllisiä ominaisuuksia voidaan vaatia välittömän myrkyllisyyden määrittämistä mehiläisillä oraalisen altistuksen jälkeen esimerkiksi silloin, kun mehiläisten altistuminen tietyille kemikaalille on todennäköistä. Välittömän myrkyllisyyden testi tehdään mehiläisille myrkyllisten torjunta-aineiden ja muiden kemikaalien aineelle ominaisen myrkyllisyyden määrittämiseksi. Testituloksien avulla määritellään lisäarvioinnin tarve. Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti ohjelmissa, joissa torjunta-aineista mehiläisille aiheutuvaa vaaraa arvioidaan vaiheittain, jolloin laboratorioissa tehtävien myrkyllisyystestien jälkeen edetään puoliksi kenttäolosuhteissa tehtäviin kokeisiin ja kenttäkokeisiin (1). Torjunta-aineita voidaan testata sekä tehoaineina että valmisteina.

Mehiläisten herkkyyden ja testimenetelmän tarkkuuden todentamiseksi olisi käytettävä myrkyllistä standardia.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Välitön myrkyllisyys suun kautta: Haittavaikutukset, jotka ilmenevät enintään 96 tunnin kuluttua siitä, kun testiainetta on annettu yksi annos suun kautta.

Annos: Nautitun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen massana (μg) testieläintä kohti ($\mu\text{g}/\text{mehiläinen}$). Todellista annosta kutakin mehiläistä kohti ei voida laskea, koska mehiläisiä ruokitaan yhtenä ryhmänä, mutta keskimääräinen annos voidaan arvioida (nautitun testiaineen kokonaismäärä / testimehiläisten lukumäärä yhdessä häkissä).

LD₅₀ (puolet tappava annos) suun kautta annosteltuna: Tilastollisesti laskettu yksittäinen annos, joka aiheuttaa kuoleman 50 %:ssa eläimistä suun kautta annosteltuna. LD₅₀ ilmaistaan mikrogrammana testiainetta mehiläistä kohti. Kun on kysymys torjunta-aineesta, testiaine voi olla joko tehoaine tai valmiste, jossa on yksi tai useampia tehoaineita.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se on täysin liikkumaton.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Täysikasvuisia työmehiläisiä (*Apis mellifera*) altistetaan sarjalle sakkaroosiliuokseen liuotetun testiaineen annoksia. Mehiläisille annetaan tämän jälkeen sakkaroosiliuosta, jossa ei ole testiainetta. Kuolleisuus kirjataan päivittäin vähintään 48 tunnin ajan, ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Jos kuolleisuus lisääntyy 24 tunnin ja 48 tunnin välillä, mutta kontrollien kuolleisuus pysyy hyväksytyllä tasolla eli $\leq 10\%$, testiä jatketaan enintään 96 tuntiin saakka. Tulokset analysoidaan ja lasketaan 24 tunnin ja 48 tunnin LD₅₀ sekä 72 tunnin ja 96 tunnin LD₅₀, jos testiä on jatkettu.

1.4 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos:

- keskimääräinen kuolleisuus kaikilla kontrolleilla ei ole suurempi kuin 10 % testin lopussa ja
- myrkyllisen standardin LD₅₀ on määritellyissä rajoissa.

1.5 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.5.1 Mehiläisten kerääminen

Testissä olisi käytettävä samaa rotua olevia täysikasvuisia työmehiläisiä. Niiden pitäisi olla saman ikäisiä, samalla tavalla ruokittuja jne. Testimehiläisten olisi oltava asianmukaisesti ruokittuja ja hyväkuntoisia, niissä ei saisi olla tauteja ja ne olisi otettava emollisista pesistä. Yhdyskuntien fysiologinen tila ja aiempi historia pitäisi tuntea. Mehiläiset olisi kerättävä sen päivän aamuna, jolloin ne käytetään, tai edellisenä iltana ja pidettävä testiolosuhteissa seuraavaan päivään. Sikiöttömiltä kakuilta kerätyt mehiläiset ovat sopivia. Keräämistä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä olisi vältettävä, koska mehiläisten fysiologia on erilainen näinä aikoina. Jos testit on tehtävä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä, mehiläisten voi antaa kuoriutua lämpökaapissa ja niitä voi kasvattaa viikon verran "mesileivällä" (kakusta kerätyllä siitepölyllä) ja sakkaroosiliuoksella. Kemiallisilla aineilla kuten antibiooteilla ja varroapunkkilääkkeillä käsiteltyjä mehiläisiä ei saisi käyttää myrkyllisyystesteihin neljään viikkoon viimeisen käsittelyn lopusta.

1.5.2 Häkit ja ruokinta

Häkkien on oltava helposti puhdistettavia ja niissä on oltava hyvä ilmanvaihto. Kaikkia sopivia materiaaleja voi käyttää, kuten ruostumatonta terästä, metalliverkkoa tai muovia, tai häkit voivat olla kertakäyttöisiä puuhäkkejä. Kymmenen mehiläistä häkkiä kohti on sopivin määrä. Testihäkkien on oltava kooltaan riittävän tilavia mehiläismäärälle.

Mehiläisiä olisi pidettävä pimeässä koehuoneessa lämpötilassa 25 ± 2 °C. Suhteellinen kosteus, jonka pitäisi olla normaalisti 50-70 %, olisi rekisteröitävä koko testin ajan. Käsittelytoimenpiteet ja havainnot voidaan suorittaa (päivän)valossa. Ravintona käytetään sakkaroosiliuosta, jonka pitoisuus on 500 g/l (50 % w/v). Testiannosten antamisen jälkeen ravintoa on annettava *ad libitum*. Ruokintajärjestelmän olisi oltava sellainen, että ravinnonotto voidaan rekisteröidä jokaista häkkiä kohti (ks. kohta 1.6.3.1). Ravinnon annosteluun voidaan käyttää lasiputkea, joka on n. 50 mm pitkä ja 10 mm paksu ja jonka pää kapenee niin, että halkaisija on noin 2 mm.

1.5.3 Mehiläisten valmistelu

Kerätyt mehiläiset jaetaan satunnaisesti testihäkkeihin, jotka sijoitetaan satunnaisesti koehuoneeseen.

Mehiläisiä voidaan pitää ilman ravintoa enintään 2 tuntia ennen testin alkua. Suositellaan, että mehiläisiä pidetään ilman ravintoa ennen käsittelyä, jotta niiden suolen sisältö olisi samanlainen testin alkaessa. Kuolevat mehiläiset on hylättävä, ja niiden tilalle on otettava terveitä mehiläisiä ennen testin aloittamista.

1.5.4 Annosten valmistus

Jos testiaine on vesiliukoinen, se voidaan liuottaa suoraan 50-prosenttiseen sakkaroosiliuokseen. Tekniset valmisteet ja huonosti vesiliukoiset aineet voidaan liuottaa esimerkiksi sellaisen orgaanisen liuottimen tai emulgointi- tai dispergointiaineen avulla, jonka myrkyllisyys mehiläisille on vähäinen (esim. asetoni, dimetyyliformamidi, dimetyylisulfoksidi). Liuotinapuaineen pitoisuus riippuu testiaineen liukoisuudesta, ja sen pitäisi olla sama kaikille testattaville pitoisuuksille. Yhden prosentin pitoisuus on yleensä hyväksyttävä, eikä sitä saisi ylittää.

On myös valmistettava asianmukaiset kontrolliliuokset. Jos testiaineen liuottamiseen on käytetty liuotinta tai dispergointiainetta, pitäisi käyttää kahta erillistä kontrolliaineiden ryhmää: toinen olisi vesiliuos ja toinen sakkaroosiliuos, jossa on liuotinta / kantaja-ainetta siinä pitoisuudessa kuin sitä käytetään annosteluliuksissa.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 Testi- ja kontrolliryhmät

Testiannosten ja rinnakkaismääritysten määrän on täytettävä tilastolliset vaatimukset LD₅₀:n määrittämiseksi 95 %:n luottamusvälein. Tavallisesti vaaditaan viisi annosta, joiden pitoisuudet ovat geometrisessa sarjassa, jonka kerroin on enintään 2,2, ja jotka kattavat LD₅₀:n määrittämiseksi tarvittavan pitoisuusalueen. Laimennustekijä ja annosteltavien pitoisuuksien lukumäärä on kuitenkin määriteltävä myrkyllisyyskäyrän (kuolleisuus annoksen funktiona) kulmakertoimen mukaan, ja tulosten analysointiin valittu tilastollinen menetelmä on myös otettava huomioon. Alustavilla testeillä on määriteltävä sopivat annostelupitoisuudet.

Sama testipitoisuusannos olisi annettava vähintään kolmelle rinnakkaiselle testiryhmälle, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Testisarjan lisäksi olisi oltava vähintään kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Käytetyille liuottimille tai kantaja-aineille (ks. kohta 1.5.4) on oltava myös kontrollierät.

1.6.2 Myrkyllinen standardi

Testisarjassa on oltava myös myrkyllinen standardi. Siitä on oltava vähintään kolme annosta, jotka kattavat odotetun LD₅₀-arvon. Kutakin testiannosta varten on oltava vähintään kolme rinnakkaishäkkiä, joista kussakin kymmenen mehiläistä. Suositeltava myrkyllinen standardi on dimetooatti, jonka 24 tunnin LD₅₀-arvon on raportoitu olevan alueella 0,10-0,35 µg tehoainetta / mehiläinen (2). Muutkin myrkylliset standardit ovat hyväksyttäviä, jos toimitetaan riittävästi tietoja odotetun annos-vastesuhteen todentamiseksi (esim. parationi).

1.6.3 Altistus

1.6.3.1 Antotapa

Kullekin mehiläisten testiryhmälle on annettava 100–200 µl 50-prosenttista sakkaroosin vesiliuosta, joka sisältää testiainetta sopivassa pitoisuudessa. Aineille, jotka ovat niukkaliukoisia, joiden myrkyllisyys on vähäinen tai joiden pitoisuus valmisteessa on pieni, tarvitaan suurempi nestetilavuus, koska on käytettävä aineiden suurempia osuuksia sakkaroosiliuoksessa. Ryhmä kohti kulunutta käsitellyn ravinnon määrää on seurattava. Kun ravinto on nautittu (tavallisesti 3–4 tunnin kuluessa), ruokintalaite on poistettava häkistä ja sen tilalle on pantava pelkästään sakkaroosiliuosta. Sitä annetaan sitten *ad libitum*. Joitakin aineita mehiläiset eivät ehkä syö, kun aineiden pitoisuus on suuri. Enintään 6 tunnin kuluttua nautimatta jäänyt käsitelty ravinto otetaan pois ja korvataan sakkaroosiliuoksella. Nautitun käsitellyn ravinnon määrä on arvioitava (esim. mittaamalla jäljelle jääneen ravinnon tilavuus / paino).

1.6.3.2 Testin kesto

Testin kestoksi suositellaan 48 tuntia sen jälkeen kun testiliuos on korvattu sakkaroosiliuoksella. Jos kuolleisuus nousee edelleen yli 10 prosentilla ensimmäisten 24 tunnin jälkeen, koetta on jatkettava enintään 96 tuntiin saakka edellyttäen, ettei kontrollien kuolleisuus ole suurempi kuin 10 %.

1.6.4 Havainnot

Kuolleisuus kirjataan 4 tunnin kuluttua testin alusta ja sen jälkeen 24 tunnin ja 48 tunnin kuluttua (ts. annoksen antamisesta). Jos on tarpeen jatkaa havainnointia, havainnot on tehtävä 24 tunnin välein enintään 96 tuntiin saakka.

Ryhmää kohti kuluneen ravinnon määrä olisi arvioitava. Vertaamalla käsitellyn ja käsittelemättömän ravinnon nauttimisnopeutta 6 tunnin kuluessa voidaan saada käsitys käsitellyn ravinnon maittavuudesta.

Kaikki epänormaali käyttäytyminen testauksen aikana on kirjattava.

1.6.5 **Raja-annostesti**

Joissakin tapauksissa (esim. kun testiaineen myrkyllisyys oletetaan alhaiseksi) voidaan tehdä raja-arvotesti, jolloin käytetään 100 µg tehoainetta mehiläistä kohti sen osoittamiseksi, että LD₅₀ on kyseistä arvoa suurempi. Raja-annostestissä olisi käytettävä samaa menettelyä kuin varsinaisessa testissä, ts. siinä on oltava kolme rinnakkaistestiryhmää annosta kohti, tarvittavat kontrollit, myrkyllinen standardi, ja nautitun käsitellyn ravinnon määrä on arvioitava. Jos esiintyy kuolleisuutta, on tehtävä täydellinen tutkimus. Jos havaitaan subletaaleja vaikutuksia (ks. kohta 1.6.4), ne on kirjattava.

2. **MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN**

2.1 **MÄÄRITYSTULOKSET**

Määrittystulokset on esitettävä taulukoituna, ja esityksestä on käytävä ilmi kussakin testiryhmässä sekä kontrolliryhmässä ja myrkyllistä standardia saaneessa ryhmässä käytettyjen mehiläisten lukumäärä, kuolleisuus kunakin havainnointihetkenä ja niiden mehiläisten lukumäärä, joissa havaitaan haittavaikutuksia. Kuolleisuustulokset on analysoitava sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi, liukuva keskiarvo, binomiaalinen todennäköisyys) (3)(4). Annos-vastekuvaajat tehdään kutakin suositeltua havainnointiajankohtaa kohti, ja kuvaajien kulmakertoimet ja puolet tappava annos (LD₅₀) lasketaan 95 prosentin luottamusvälillä. Kontrollikuolleisuudesta johtuvat korjaukset voitaisiin tehdä Abbottin korjauksella (4)(5). Jos käsiteltyä ravintoa ei ole nautittu kokonaan, olisi määritettävä nautitun testiaineen annos ryhmää kohti. LD₅₀ olisi ilmaistava mikrogrammoina testiainetta mehiläistä kohti.

2.2 **TESTISELOSTE**

Testiselosteessa on oltava seuraavat tiedot:

2.2.1 **Testiaine:**

- fysikaalinen olomuoto ja asian kannalta merkitsevät fysikokemialliset ominaisuudet (esim. stabiilisuus vedessä, höyrynpaine)
- kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava ja puhtaus (ts. torjunta-aineille tunnistetiedot ja tehoaine(id)en pitoisuus).

2.2.2 **Testilaji:**

- tieteellinen nimi, rotu, ikä suunnilleen (viikkoa), keräysmenetelmä, keräyspäivä
- testimehiläisten keräykseen käytettyjä pesiä koskevat tiedot, mukaan lukien esim. mehiläisten terveydentila, mahdolliset täysikasvuisten taudit, mahdolliset esikäsitelyt

2.2.3 **Testiolosuhteet:**

- koetilojen lämpötila ja suhteellinen kosteus
- häkkien tyyppi, koko ja materiaali
- varasto- ja testiliuosten valmistusmenetelmät (jos on käytetty liuotinta, sen nimi ja pitoisuus on mainittava)
- testin suunnittelu, esim. testipitoisuudet ja niiden määrä, kontrollien lukumäärä sekä kutakin testipitoisuutta ja kontrollia kohti rinnakkaisten häkkien määrä ja mehiläisten määrä häkkiä kohti
- testin päivämäärä.

Tulokset:

- mahdolliset alustavan annosalueutkimuksen tulokset
- käsittelemättömät tulokset: kuolleisuus kullakin testipitoisuudella ja kullakin havainnointitihetkellä
- annos-vastekuvaajat testin lopussa
- testiaineen ja myrkyllisen standardin LD₅₀-arvot 95 prosentin luottamusvälein kullakin suositellulla havainnointitihetkellä
- LD₅₀-arvon määrittämiseen käytetyt tilastomenetelmät
- kontrollien kuolleisuus
- muut havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset ja mehiläisissä mahdollisesti havaitut epänormaalit vasteet
- mahdolliset poikkeamat tässä kuvatuista testimenettelyistä ja kaikki mahdollisesti tärkeät tiedot.

LÄHDELUETTELO

- 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.

C.17 MEHILÄISET – KOSKETUSALTISTUKSEN JÄLKEEN ILMENEVÄN VÄLITTÖMÄN MYRKYLLISYYDEN TESTI

1. MENETELMÄ

Tämä välittömän myrkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testausohjeesta N:o 214 (1998).

1.1 JOHDANTO

Tämä myrkyllisyystesti on laboratoriomenetelmä, jonka tarkoituksena on arvioida kasvinsuojeluaineiden ja muiden kemikaalien välitöntä myrkyllisyyttä täysikasvuisille työmehiläisille kosketusaltistuksen jälkeen.

Arvioitaessa kemikaalien myrkyllisiä ominaisuuksia voidaan vaatia välittömän myrkyllisyyden määrittämistä mehiläisillä kosketusaltistuksen jälkeen esimerkiksi silloin, kun mehiläisten altistuminen tietylle kemikaalille on todennäköistä. Kosketusaltistuksen jälkeen ilmenevän välittömän myrkyllisyyden testin tarkoituksena on määrittää mehiläisille myrkyllisten torjunta-aineiden ja muiden kemikaalien aineelle ominainen myrkyllisyys. Testituloksien avulla määritellään lisäarvioinnin tarve. Tätä menetelmää voidaan käyttää erityisesti ohjelmissa, joissa torjunta-aineista mehiläisille aiheutuvaa vaaraa arvioidaan vaiheittain, jolloin laboratoriossa tehtävien myrkyllisyystestien jälkeen edetään puoliksi kenttäolosuhteissa tehtäviin kokeisiin ja kenttäkokeisiin (1). Torjunta-aineita voidaan testata sekä tehoaineina että valmisteina.

Mehiläisten herkkyyden ja testimenetelmän tarkkuuden todentamiseksi olisi käytettävä myrkyllistä standardia.

1.2 MÄÄRITELMÄT

Kosketusaltistuksen jälkeen ilmenevä välitön myrkyllisyys: Haittavaikutukset, jotka ilmenevät enintään 96 tunnin kuluttua siitä, kun testiainetta on aplikoitu paikallisesti yksi annos.

Annos: Aplikoidun testiaineen määrä. Annos ilmaistaan testiaineen massana (μg) testieläintä kohti ($\mu\text{g}/\text{mehiläinen}$).

LD₅₀ (puolet tappava annos) ihon kautta annosteltuna: Tilastollisesti laskettu yksittäinen annos, joka aiheuttaa kuoleman 50 %:ssa eläimistä ihon kautta annosteltuna. LD₅₀ ilmaistaan mikrogrammana testiainetta mehiläistä kohti. Kun on kysymys torjunta-aineesta, testiaine voi olla joko tehoaine tai valmiste, jossa on yksi tai useampia tehoaineita.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se on täysin liikkumaton.

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Täysikasvuisia työmehiläisiä (*Apis mellifera*) altistetaan sopivaan kantaja-aineeseen liuotetun testiaineen annoksille siten, että ainetta aplikoidaan suoraan rintakehälle (tippoina). Testin kesto on 48 h. Jos kuolleisuus kasvaa 24 tunnin ja 48 tunnin välillä kontrollien kuolleisuuden pysyessä hyväksyttävällä tasolla, ts. $\leq 10\%$, testiä pitäisi jatkaa enintään 96 tuntiin saakka. Kuolleisuus kirjataan päivittäin, ja sitä verrataan kontrolliarvoihin. Tuloksista lasketaan LD₅₀ 24 tunnin ja 48 tunnin kuluttua sekä 72 tunnin ja 96 tunnin kuluttua, jos testiä on jatkettu.

1.4 TESTIN LUOTETTAVUUS

Testi on luotettava, jos:

- keskimääräinen kuolleisuus kaikilla kontrolleilla ei ole suurempi kuin 10 % testin lopussa ja
- myrkyllisen standardin LD₅₀ on määritellyissä rajoissa.

1.5 TESTIN KUVAUS

1.5.1 Mehiläisten kerääminen

Testiin pitäisi käyttää nuoria täysikasvuisia työmehiläisiä, ts. sellaisia, jotka ovat saman ikäisiä, samalla tavoin ruokittuja, saman rotuisia jne. Testimehiläisten olisi oltava asianmukaisesti ruokittuja ja hyväkuntoisia, niissä ei saisi olla tauteja ja ne olisi kerättävä emollisista pesistä, joiden fysiologinen tila ja aiempi historia tunnetaan. Mehiläiset olisi kerättävä sen päivän aamuna, jolloin ne käytetään, tai edellisenä iltana ja pidettävä testiolosuhteissa seuraavaan päivään. Sikiöttömiltä kakuilta kerätyt mehiläiset ovat sopivia. Keräämistä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä olisi vältettävä, koska mehiläisten fysiologia on erilainen näinä aikoina. Jos testit on tehtävä aikaisin keväällä tai myöhään syksyllä, mehiläisten voi antaa kuoriutua lämpökaapissa ja niitä voi kasvattaa viikon verran "mesileivällä" (kakusta kerätyllä siitepölyllä) ja sakkaroosiliuoksella. Kemiallisilla aineilla kuten antibiooteilla ja varroapunkkilääkkeillä käsiteltyjä mehiläisiä ei saisi käyttää myrkyllisyystesteihin neljään viikkoon viimeisen käsittelyn lopusta.

1.5.2 Häkit ja ruokinta

Häkkien on oltava helposti puhdistettavia ja niissä on oltava hyvä ilmanvaihto. Kaikkia sopivia materiaaleja voi käyttää, kuten ruostumatonta terästä, metalliverkkoa tai muovia, tai häkit voivat olla kertakäyttöisiä puuhäkkejä. Testihäkkien on oltava kooltaan riittävän tilavia mehiläismäärälle. Kymmenen mehiläistä häkkiä kohti on sopivin määrä.

Mehiläisiä olisi pidettävä pimeässä koehuoneessa lämpötilassa 25 ± 2 °C. Suhteellinen kosteus, jonka pitäisi olla normaalisti 50-70 %, olisi rekisteröitävä koko testin ajan. Käsittelytoimenpiteet ja havainnot voidaan suorittaa (päivän) valossa. Ravintona käytetään sakkaroosiliuosta, jonka pitoisuus on 500 g/l (50 % w/v), ja sitä annetaan *ad libitum* testin ajan annostelulaitteen avulla, joka voi olla lasiputki (n. 50 mm pitkä ja 10 mm paksu ja jonka pää kapenee niin, että halkaisija on noin 2 mm).

1.5.3 Mehiläisten valmistelu

Mehiläiset voidaan keräyksen jälkeen anestesoida hiilidioksidilla tai typpikaasulla, jotta testiaine voidaan aplikoida. Anestesia-ainetta on käytettävä mahdollisimman pieni määrä ja mahdollisimman lyhyen aikaa. Kuolevat mehiläiset on hylättävä, ja niiden tilalle on otettava terveitä mehiläisiä ennen testin aloittamista.

1.5.4 Annosten valmistelu

Testiaine aplikoidaan kantaja-aineeseen, ts. orgaaniseen liuottimeen tai veteen tehtynä liuoksena, jossa on vettymistä edistävää ainetta. Orgaanisista liuottimista suositeltavin on asetoni, mutta muitakin orgaanisia liuottimia, joiden myrkyllisyys mehiläisille on vähäinen, voidaan käyttää (esim. dimetyyliformamidia tai dimetyylisulfoksidia). Orgaanisiin kantaja-aineisiin liukenemattomien veteen dispergoitujen valmisteiden ja erittäin polaaristen orgaanisten kemikaalien aplikointi voi olla helpompaa, jos niiden liuokset tehdään laimeaan kaupalliseen vettymistä edistävään aineeseen (esim. Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween).

Testissä olisi käytettävä asianmukaisia kontrolliliuoksia, ts. jos testiaineen liuottamiseen on käytetty liuotinta tai dispergointiainetta, pitäisi käyttää kahta erillistä kontrolliryhmää: sellaista, joka on käsitelty vedellä ja sellaista, joka on käsitelty liuottimella tai dispergointiaineella.

1.6 TESTIN SUORITUS

1.6.1 Testi- ja kontrolliryhmät

Testiannosten ja rinnakkaismääritysten määrän on täytettävä tilastolliset vaatimukset LD₅₀:n määrittämiseksi 95 %:n luottamuvälein. Tavallisesti vaaditaan viisi annosta, joiden pitoisuudet ovat geometrisessa sarjassa, jonka kerroin on enintään 2,2, ja jotka kattavat LD₅₀:n määrittämiseksi tarvittavan pitoisuusalueen. Annosteltavien pitoisuuksien lukumäärä on kuitenkin määriteltävä myrkyllisyyskäyrän (kuolleisuus annoksen funktiona) kulmakertoimen mukaan, ja tulosten analysointiin valittu tilastollinen menetelmä on myös otettava huomioon. Alustavilla testeillä on määriteltävä sopivat annostelupitoisuudet.

Sama testipitoisuusannos olisi annettava vähintään kolmelle rinnakkaiselle testiryhmälle, joista kussakin on kymmenen mehiläistä.

Testisarjan lisäksi olisi oltava vähintään kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä. Jos käytetään orgaanista liuotinta tai vettymistä edistävää ainetta, on testissä oltava myös orgaanista liuotinta tai vettymistä edistävää ainetta varten kolme kontrollierää, joista kussakin on kymmenen mehiläistä.

1.6.2 Myrkyllinen standardi

Testisarjassa on oltava myös myrkyllinen standardi. Siitä on oltava vähintään kolme annosta, jotka kattavat odotetun LD₅₀-arvon. Kutakin testiannosta varten on oltava vähintään kolme rinnakkaishäkkiä, joista kussakin kymmenen mehiläistä. Suositeltava myrkyllinen standardi on dimetooatti, jonka 24 tunnin LD₅₀-arvo on alueella 0,10–0,30 µg tehoainetta / mehiläinen (2). Muutkin myrkylliset standardit ovat hyväksyttäviä, jos toimitetaan riittävästi tietoja odotetun annos-vastesuhteen todentamiseksi (esim. parationi).

1.6.3 Altistus

1.6.3.1 Antotapa

Anestesoidut mehiläiset käsitellään yksitellen. Mehiläiset jaetaan satunnaistetusti eri testiannos- ja kontrolliryhmiin. Liuosta, joka sisältää 1 mikrolitran testiainetta sopivassa pitoisuudessa, aplikoidaan mikroaplikaattorilla kunkin mehiläisen rintakehän selkäpuolelle. Muita tilauksia voi käyttää, jos se on perusteltua. Mehiläiset jaetaan aplikaation jälkeen testihäkkeihin ja niille annetaan sakkaroosiliuosta.

1.6.3.2 Testin kesto

Testin keston olisi oltava mieluiten 48 tuntia. Jos kuolleisuus nousee edelleen yli 10 prosentilla 24 tunnin ja 48 tunnin välillä, testiä on jatkettava, kuitenkin enintään 96 tuntiin saakka, edellyttäen, ettei kontrollien kuolleisuus ole suurempi kuin 10 %.

1.6.4 Havainnot

Kuolleisuus kirjataan 4 tunnin kuluttua annostelusta ja 24 tunnin sekä 48 tunnin kuluttua. Jos on tarpeen jatkaa havainnointia, havaintoja on tehtävä 24 tunnin väliajoin enintään 96 tuntiin saakka, mikäli kontrollikuolleisuus ei ylitä 10 prosenttia.

Kaikki epänormaali käyttäytyminen testin aikana on kirjattava.

1.6.5 Raja-annostesti

Joissakin tapauksissa (esim. kun testiaineen myrkyllisyys oletetaan alhaiseksi) voidaan tehdä raja-arvotesti, jolloin käytetään 100 µg tehoainetta mehiläistä kohti sen osoittamiseksi, että LD₅₀ on kyseistä arvoa suurempi. Raja-annostestissä olisi käytettävä samaa menettelyä kuin varsinaisessa testissä, ts. siinä on oltava kolme rinnakkaisestiryhmää annosta kohti, tarvittavat kontrollit ja myrkyllinen standardi. Jos esiintyy kuolleisuutta, on tehtävä täydellinen tutkimus. Jos havaitaan subleataleja vaikutuksia (ks. kohta 1.6.4), ne on kirjattava.

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 MÄÄRITYSTULOKSET

Määrittystulokset on esitettävä taulukoituna, ja esityksestä on käytävä ilmi kussakin testiryhmässä sekä kontrolliryhmässä ja myrkyllistä standardia saaneessa ryhmässä käytettyjen mehiläisten lukumäärä, kuolleisuus kunakin havainnointihetkenä ja niiden mehiläisten lukumäärä, joissa havaitaan haittavaikutuksia. Kuolleisuustulokset on analysoitava sopivilla tilastomenetelmillä (esim. probittianalyysi, liukuva keskiarvo, binomiaalinen todennäköisyys) (3)(4). Annos-vastekuvaajat tehdään kutakin suositeltua havainnointijakohtaa (ts. 24, 48 ja tarvittaessa 72 ja 96 tuntia) kohti, ja kuvaajien kulmakertoimet ja puolet tappava annos (LD₅₀) lasketaan 95 prosentin luottamuvälillä. Kontrollikuolleisuudesta johtuvat korjaukset voitaisiin tehdä Abbottin korjauksella (4)(5). LD₅₀ olisi ilmaistava mikrogrammoina testiainetta mehiläistä kohti.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on oltava seuraavat tiedot:

2.2.1 Testiaine:

- fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet (esim. stabiilisuus vedessä, höyrynpaine)
- kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien rakennekaava ja puhtaus (ts. torjunta-aineille tunnistetiedot ja tehoaine(id) en pitoisuus).

2.2.2 Testilajit:

- tieteellinen nimi, rotu, ikä suunnilleen (viikkoa), keräysmenetelmä, keräyspäivä
- testimehiläisten keräykseen käytettyjä pesiä koskevat tiedot, mukaan lukien esim. mehiläisten terveydentila, mahdolliset täysikasvuisten taudit, mahdolliset esikäsitteilyt.

2.2.3 Testiolosuhteet:

- koetilojen lämpötila ja suhteellinen kosteus
- häkkien tyyppi, koko ja materiaali
- testiaineen antotapa, esim. käytetty kantaja-aine, aplikoidun testiliuoksen tilavuus, käytetty anestesia-aine
- testin suunnittelu, esim. testiannokset ja niiden lukumäärä, kontrollien lukumäärä sekä kutakin testiannosta ja kontrollia kohti rinnakkaisten häkkien määrä ja mehiläisten määrä häkkiä kohti
- testin päivämäärä.

2.2.4 Tulokset:

- mahdolliset raja-annostutkimuksen tulokset;
- käsittelemättömät tulokset: kuolleisuus kullakin testipitoisuudella ja kullakin havainnointihetkellä
- annos-vastekuvaajat testin lopussa
- testiaineen ja kontrollin LD₅₀-arvot 95 % prosentin luottamuvälein kullakin havainnointihetkellä
- LD₅₀-arvon määrittämiseen käytetyt tilastomenetelmät
- kontrollien kuolleisuus
- muut havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset ja mehiläisten mahdolliset epänormaalit vasteet
- mahdolliset poikkeamat tässä kuvatuista testimenettelyistä ja kaikki mahdollisesti tärkeät tiedot.

3.

VIITTEET

- 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.

C.18. ADSORPTIO/DESORPTIO ERÄTASAPAINOMENETELMÄÄ KÄYTTÄEN

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD TG 106:sta, maa-aineksen adsorptio/desorptio-ominaisuuksien määrittämiseksi erätasapainomenetelmää käyttäen (2000).

1.1 JOHDANTO

Menetelmässä otetaan huomioon "ring" -testi sekä maa-aineksen valitsemista koskeva seminaari (1)(2)(3)(4) adsorptiotestin kehittämiseksi samoin kuin kansallisella tasolla käytettävät ohjeet (5)(6)(7)(8)(9)(10)(11).

Adsorptio- ja desorptiotutkimuksista saadaan hyödyllisiä tietoja kemikaalien kulkeutumisesta ja niiden jakautumisesta biosfääriin maa-, vesi- ja ilmakerrokseen (12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21). Tietoja voidaan käyttää esimerkiksi sen ennustamiseksi tai arvioimiseksi, miten kemikaalit hajoavat (22)(23), muuntuvat tai joutuvat eliöihin (24), uuttuvat maalajien läpi (16)(18)(19)(21)(25)(26)(27)(28), haihtuvat maa-aineksesta (21)(29)(30) tai huuhtoutuvat maan pintakerroksista luonnonvesiin (18)(31)(32). Adsorptiotietoja voidaan käyttää vertailu- ja mallintamistarkoituksiin (19)(33)(34)(35).

Kemikaalin jakautuminen maa-ainekseen ja vesifaasiin on monimutkainen prosessi, joka riippuu lukuisista eri tekijöistä: aineen kemiallisesta luonteesta (12)(36)(37)(38)(39)(40), maa-aineksen ominaisuuksista (4)(12)(13)(14)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48)(49) sekä ilmastollisista tekijöistä kuten sateista, lämpötilasta, auringosta ja tuulista. Näin ollen kemikaalin maa-aineksessa tapahtuvaan adsorptioprosessiin liittyviä moninaisia ilmiöitä ja mekanismeja ei voida täysin määritellä yksinkertaistetulla laboratoriomallilla, kuten tässä esitetyllä menetelmällä. Vaikka tällä menetelmällä ei ole mahdollista kattaa kaikkia ympäristön kannalta mahdollisia tapauksia, se antaa kuitenkin riittävästi tietoa kemikaalin adsorboitumisesta ympäristön kannalta merkityksellisellä tavalla.

Katso myös yleinen johdanto.

1.2 SOVELTAMISALA

Menetelmän tarkoituksena on arvioida, miten kemikaalit adsorboituvat maa-ainekseen tai desorboituvat siitä. Tavoitteena on saada sorptioarvo, jota voidaan käyttää ennustamaan jakautumista erilaisissa ympäristöolosuhteissa; tätä varten määritetään tasapainotilan adsorptiokertoimet kemikaalille erilaisissa maa-aineksissa maa-aineksen ominaisuuksien (esimerkiksi orgaanisen hiilen pitoisuus, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH) funktiona. On käytettävä erilaisia maalajeja, jotta tietyn aineen ja luonnossa esiintyvien maa-ainesten väliset vuorovaikutukset voidaan kattaa mahdollisimman laajasti.

Tässä menetelmässä adsorptio edustaa kemikaalin sitoutumista maa-ainesten pintakerrokseen; siinä ei erotella erilaisia adsorptioprosesseja (fysikaalinen ja kemiallinen adsorptio) eikä esim. pintakatalysoitua hajoamista, massa-adsorptiota tai kemiallista reaktiota. Adsorptiota, joka tapahtuu maa-aineksesta syntyviin kolloidipartikkeleihin (halkaisija < 0,2 µm), ei ole otettu huomioon.

Tärkeimpinä adsorptiokäyttäytymiseen vaikuttavina maa-ainekseen liittyvinä muuttujina pidetään orgaanisen hiilen pitoisuutta (3)(4)(12)(13)(14)(41)(43)(44)(45)(46)(47)(48); savipitoisuutta ja maaperän rakennetta (3)(4)(41)(42)(43)(44)(45)(46)(47)(48) sekä ionisoituvien yhdisteiden pH:ta (3)(4)(42). Muut maa-ainekseen liittyvät muuttujat, joilla saattaa olla vaikutusta tietyn aineen asorptioon/desorptioon ovat efektiivinen kationinvaihtokyky (ECEC), amorfisen raudan ja alumiinioksidien pitoisuus, erityisesti tulivuorialueiden ja trooppisten maa-ainesten (4) tapauksessa, samoin kuin ominaispinta-ala (49) ovat tärkeitä.

Testillä on tarkoitus arvioida kemikaalin adsorboitumista erityyppisiin maalajeihin, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH vaihtelevat eri tavoin. Testi käsittää kolme tasoa:

Taso 1: Alustava tutkimus, jolloin määritetään:

- maa-aines/liuos -suhde
- adsorptiotasapainotilan saavuttamiseksi tarvittava aika ja adsorboituneen testiaineen määrä tasapainotilassa
- testiaineen adsorboituminen koeastioiden pintoihin sekä testiaineen stabiilius testijakson aikana.

Taso 2: Seulontatesti: adsorptiokinetiikka tutkitaan viidessä erilaisessa maalajissa yhdellä pitoisuudella ja määritetään jakautumiskertoimet K_d ja K_{oc} .

Taso 3: Freundlichin adsorptioisotermien määrittäminen, jotta voidaan määrittää pitoisuuden vaikutus maa-ainekseen tapahtuvan adsorptioon laajuuteen.

Desorptiokinetiikka ja Freundlichin desorptioisotermit (liite 1).

1.3

MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Symboli	Määritelmä	Yksiköt
A_{t_i}	adsorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i	%
A_{eq}	adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa	%
$m_s^{ads}(t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa ajanhetkellä t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa aikavälillä Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa adsorptiotasapainossa	μg
m_0	testiaineen massa koeputkessa, adsorptiotestin alussa	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	testiaineen massa mitattuna määräosassa (v_a^A) ajanhetkellä t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	aineen massa liuoksessa adsorptiotasapainotilassa	μg
m_{soil}	maa-ainesfaasin määrä, maa-aineksen kuiva-aineena ilmaistuna	g
C_{st}	aineen varastoliuoksen massakonsentraatio	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	aineen massakonsentraatio vesifaasissa analyysin suorituksen ajanhetkellä t_i	$\mu\text{g cm}^{-3}$

$C_s^{ads}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneen aineen konsentraatio adsorptiotasapainotilassa	$\mu g g^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	aineen massakonsentraatio vesifaasissa adsorptiotasapainotilassa	$\mu g cm^{-3}$
V_0	adsorptiotestin aikana maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin alkutilavuus	cm^3
v_a^A	määräosan tilavuus, jossa testiaine mitataan	cm^3
K_d	jakautumiskerroin adsorptiolle	$cm^3 g^{-1}$
K_{oc}	orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin	$cm^3 g^{-1}$
K_{om}	orgaanisen aineksen suhteen normalisoitu jakautumiskerroin	$cm^3 g^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlichin adsorptiokerroin	$\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1}$
$1/n$	Freundlichin eksponentti	
D_{t_i}	desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorboitumisprosentti aikavälillä Δt_i	%
K_{des}	näennäinen desorptiokerroin	$cm^3 g^{-1}$
K_F^{des}	Freundlichin desorptiokerroin	$\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa ajanhetkellä t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa aikavälillä Δt_i	μg
$m_m^{des}(eq)$	analyttisesti määritetyn aineen massa vesifaasissa desorptiotasapainotilassa	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	desorboituneen testiaineen kokonaismassa desorptiotasapainotilassa	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen aineen massa aikavälin Δt_i jälkeen	μg
m_{aq}^A	epätäydellisestä tilavuustäydennyksestä johtuen adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen aineen massa	μg
$C_s^{des}(eq)$	maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa	$\mu g g^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa desorptiotasapainotilassa	$\mu g cm^{-3}$
V_T	maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus sarjamenetelmällä suoritettavan desorptiokinetiikkakokeen aikana	cm^3
V_R	adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuudella 0,01 M $CaCl_2$ -liuosta	cm^3
v_a^D	koeputkesta (i) analyysitarkoituksiin otetun määröosan tilavuus sarjamenetelmällä suoritettavan desorptiokinetiikkakokeen aikana	cm^3
V_T^i	koeputkesta (i) testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus desorptiokinetiikkakokeessa (rinnakkaismenetelmä)	cm^3

V_r^F	koeputkesta testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus desorptiotasapainotilassa	cm^3
MB	massatase	%
m_E	maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä kahdessa vaiheessa uutetun testiaineen kokonaismassa	μg
V_{rec}	adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen talteen otetun supernatantin tilavuus	cm^3
P_{ow}	oktanol-vesijakautumiskerroin	
pKa	hajoamisvakio	
S_w	vesiliukoisuus	g l^{-1}

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Tunnetut tilavuudet testiaineliuoksia, merkitsemättöminä tai radioaktiivisesti merkittyinä, tunnettuina pitoisuuksina 0,01 M CaCl_2 :ssa lisätään kuivapainoltaan tunnettuihin maa-ainenäytteisiin, jotka on esitasapainotettu 0,01 M CaCl_2 :ssa. Seosta ravistellaan riittävästi. Maa-ainesususpensiot sentrifugoidaan, suodatetaan haluttaessa ja vesifaasi analysoidaan. Maa-ainenäytteeseen adsorboituneen testiaineen määrä lasketaan liuoksessa alussa olleen testiaineen määrän ja kokeen lopussa jäljellä olevan määrän välisenä erotuksena (epäsuora menetelmä).

Vaihtoehtoisesti adsorboituneen testiaineen määrä voidaan määrittää myös suoraan maa-aineanalyysin avulla (suora menetelmä). Tätä menettelytapaa, johon kuuluu asteittainen maa-aineksen uutto sopivalla liuottimella, suositellaan silloin, kun aineen liuoskonsentraatioeroja ei voida täsmällisesti määrittää. Esimerkkejä tällaisista tapauksista ovat testiaineen adsorboituminen koeastioiden pintaan, testiaineen epästabiilius kokeen aikana, heikko adsorptio, mikä aiheuttaa vain pienen konsentraatiomuutoksen liuoksessa sekä voimakas adsorptio, mikä saa aikaan alhaisen konsentraation, jota ei voida täsmällisesti määrittää. Jos käytetään radioaktiivisesti merkittyä ainetta, maa-aineksen uutto voidaan välttää suorittamalla maa-ainefaasin analyysi polttoa ja nestetuikelaskentaa käyttäen. Nestetuikelaskenta on kuitenkin epäspesifinen tekniikka, jolla ei voida erottaa lähtöaineita ja muunnostuotteita; siksi sitä olisi käytettävä ainoastaan silloin, kun testikemikaali on stabiili koko tutkimuksen keston ajan.

1.5 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Kemiallisten reagenssien on oltava analyysilaatua. Suositellaan merkitsemättömien, koostumukseltaan tunnettujen ja mieluiten puhtaudeltaan vähintään 95-prosenttisten testiaineiden käyttöä tai koostumukseltaan radioisotooppipuhtaudeltaan tunnettujen radioaktiivisesti merkittyjen testiaineiden käyttöä. Jos merkkiaineiden puoliintumisaajat ovat lyhyitä, on tehtävä hajoamiskorjauksia.

Testiaineesta on oltava seuraavat tiedot ennen adsorptio-desorptiotestin suorittamista:

- vesiliukoisuus (A.6.)
- höyrynpaine (A.4.) ja/tai Henryn lain vakio
- abiottinen hajoaminen: hydrolyysi pH:n funktiona (C.7.)
- jakautumiskerroin (A.8.)
- biologinen hajoavuus (C.4.) tai aerobinen ja anaerobinen muuntuminen maa-aineksessa
- ionisoituvien aineiden pKa
- suora fotolyysi vedessä (eli UV-Vis-absorptiospektri vedessä, kvanttisaanto) ja ftohajoaminen maa-aineksessa.

1.6 TESTIN SOVELTUVUUS

Testi soveltuu kemiallisille aineille, joille on olemassa analyysimenetelmää voidaan soveltaa riittäväällä tarkkuudella. Tärkeä muuttuja, joka voi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen, erityisesti epäsuoraa menetelmää käytettäessä, on testiaineen stabiilius testin aikana. Siksi edellytyksenä on tarkistaa stabiilius alustavassa tutkimuksessa; jos testin aikana havaitaan muuttumista, suositellaan, että varsinainen tutkimus suoritetaan analysoimalla sekä maa-aines- että vesifaasi.

Tätä testiä suoritettaessa ongelmia saattavat aiheuttaa testiaineet, joiden vesiliukoisuus on alhainen ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), tai paljon varauksia sisältävät aineet. Vaikeudet johtuvat siitä, että konsentraatiota vesifaasissa ei voida tällöin mitata analyttisesti riittäväällä tarkkuudella. Näissä tapauksissa tarvitaan lisävaiheita. Ohjeita näiden ongelmien ratkaisemiseksi annetaan tätä menetelmää koskevilla kappaleilla.

Kun testataan haihtuvia aineita, on huolehdittava siitä, ettei käsittelyn aikana tapahdu häviöitä.

1.7 MENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 Laitteet ja kemialliset reagenssit

Standardi laboratoriolaitteisto, erityisesti seuraavat:

- a) koeputket tai astiat kokeiden suorittamiseksi. On tärkeää, että nämä koeputket tai astiat
 - sopivat suoraan sentrifugiin aineiden käsittelystä ja siirtämisestä johtuvien virheiden minimoimiseksi
 - ovat inertistä materiaalista, mikä minimoi testiaineen adsorboitumisen niiden pinnalla
- b) ravistelulaite: kääntelevä ravistelijä tai vastaava laitteisto; ravistelulaitteen on pidettävä maa-aines suspensionä sekoituksen aikana
- c) sentrifugi: mieluiten suurinopeuksinen, esimerkiksi keskipakovoima $> 3000 \text{ g}$, lämpötilaltaan säädettävä, pysty erottelemaan halkaisijaltaan yli $0,2 \mu\text{m}$ olevat partikkelit vesiliuoksesta. Säiliöt on pidettävä suljettuina ravistelun ja sentrifugoinnin aikana haihtuvuus- ja vesihäviöiden välttämiseksi. Korkeihin kohdistuvan adsorboitumisen minimoimiseksi on käytettävä deaktivoituja korkeja, kuten teflonpäällysteisiä kierrekorkeja.
- d) valinnainen: suodatuslaite; huokoisuudeltaan $0,2 \mu\text{m}$:n steriilit kertakäyttösuodattimet. Suodatinmateriaalin valintaan on kiinnitettävä erityistä huomiota, jotta testiaine ei tartu siihen; orgaanista suodatinmateriaalia ei suositella niukkaliukoisille testiaineille.
- e) analyysivälineet, jotka soveltuvat testikemikaalin konsentraation mittaamiseen
- f) laboratoriuuni, joka voidaan pitää lämpötilassa $103 \text{ }^\circ\text{C} - 110 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.7.2 Maa-ainesten luonnehdinta ja valinta

Maa-aineksista on määritettävä kolme ominaisuutta, joiden katsotaan pääasiassa vaikuttavan adsorptiokykyyn. Nämä ovat orgaaninen hiili, savipitoisuus ja maaperän rakenne sekä pH. Kuten jo mainittiin (katso soveltamisala), muutkin maa-aineksen fysikaalis-kemialliset ominaisuudet voivat vaikuttaa tietyn aineen adsorptioon ja desorptioon, ja ne täytyy ottaa huomioon kyseisissä tapauksissa.

Maa-aineksen luonnehdinnassa käytettävät menetelmät ovat hyvin tärkeitä, ja niillä voi olla merkittävä vaikutus tuloksiin. Siksi suositellaan, että maa-aineksen pH mitataan 0,01 M CaCl₂-liuoksessa (liuos, jota käytetään adsorptio/desorptiotestissä) ISO-menetelmän 10390-1 mukaisesti). Myös muita tärkeitä maa-aineksen ominaisuuksia suositellaan määritettäväksi standardimenetelmien mukaisesti (ISO Handbook of soil analysis). Tällöin sorptiotietojen analysointi voi perustua yleisesti standardoituihin maa-ainesta koskeviin muuttujiin. Joitakin käytössä olevien maa-aineksen analysointia ja luonnehdintaa koskevien standardimenetelmien ohjeita löytyy lähteistä 50-52. Maa-aineksen testimenetelmien kalibrointiin suositellaan vertailumaa-ainesten käyttöä.

Ohjeita maa-ainesten valitsemiseksi adsorptio/desorptiokokeisiin annetaan taulukossa 1. Seitsemän valittua maa-ainesta kattaa lauhkeilla maantieteellisillä alueilla esiintyvät maalajit. Ionisoituvien testiaineiden ollessa kyseessä valittujen maa-ainesten olisi katettava laaja pH-alue, jotta aineen adsorboituminen ionisoituneessa ja ionisoitumattomassa muodossa voidaan arvioida. Ohjeita siitä, kuinka montaa erilaista maa-ainesta käytetään testin eri vaiheissa, annetaan 1.9 kohdassa "Testin suorittaminen".

Jos muita maalajeja pidetään edellä mainittuja soveltuvampina, niistä on määritettävä samat muuttujat ja niillä on oltava erilaisia ominaisuuksia samalla tavoin kuin taulukossa 1 on esitetty, vaikka ne eivät täyttäisikään täsmälleen perusteita.

Taulukko 1: Ohjeet maa-ainenäytteiden valitsemiseksi adsorptio-desorptiokokeisiin

Maalaji	pH-alue (0,01 M CaCl ₂ :ssa)	Orgaanisen hiilen pitoisuus (%)	Savipitoisuus (%)	Maaperän rakenne*
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 - 80	savi
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 - 40	hiuesavi
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 - 25	hiesusavi
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 - 30	savikko
5	< 4,0 - 6,0 [§]	< 0,5 - 1,5 [‡]	< 10 - 15 [§]	savinen hiekka
6	> 7,0	< 0,5 - 1,0 [‡]	40 - 65	hiuesavi/ savi
7	< 4,5	> 10	< 10	hiekka/ savinen hiekka

* FAO- ja US-järjestelmän mukaisesti (85).

§ Vastaavien muuttuja-arvojen olisi mieluiten oltava annetulla alueella. Jos sopivan maa-ainemateriaalin löytämisessä kuitenkin ilmenee vaikeuksia, annettujen vähimmäisarvojen alapuolelle jäävät arvot hyväksytään.

‡ Maa-ainekset, joiden orgaanisen hiilen pitoisuus on alle 0,3 %, voivat häiritä orgaanisen aineen pitoisuuden ja adsorption välistä korrelaatiota. Siksi suositellaan käytettäväksi maa-aineksia, joiden orgaanisen hiilen vähimmäispitoisuus on 0,3 %.

1.7.3 Maa-ainenäytteiden kerääminen ja säilytys

1.7.3.1 Kerääminen

Mitään erityistä näytteenottotekniikkaa tai -välineitä ei suositella; näytteenottotekniikka määräytyy tutkimuksen tarkoituksen mukaisesti (53)(54)(55)(56)(57)(58).

Seuraavat seikat on otettava huomioon:

- yksityiskohtaiset tiedot kenttäalueen sijainnista, kasvillisuudesta ja aiemmasta käytöstä (torjunta-aine- ja/tai lannoitekäsitteilyt, biologiset lisäykset) tai tahattomasta kontaminaatiosta ovat välttämättömät. Maa-ainesten näytteenotossa olisi noudatettava näytteenottoaikan kuvausta koskevia ISO-standardin 10381-6 suosituksia,

- b) näytteenottoaikka on määriteltävä UTM:n (Universal Transversal Mercator -projektio/European Horizontal Datum) mukaisesti tai maantieteellisten koordinaattien mukaisesti; näin tietyn maa-aineksen uudelleen kerääminen myöhemmin on mahdollista tai tästä voi olla apua määriteltäessä maa-aineksiä eri maissa käytettyjen erilaisten luokitusjärjestelmien mukaisesti. Lisäksi A-kerroksesta olisi kerättävä ainoastaan enintään 20 cm:n syvyydeltä. Erityisesti maalajista nro 7 on otettava näyte O_h -kerroksesta, jos sitä esiintyy maa-aineksen osana.

Maa-ainesnäytteet on kuljetettava sellaisissa säiliöissä ja lämpöolosuhteissa, jotka takaavat, etteivät alkuperäiset maa-aineksen ominaisuudet muutu merkittävästi.

1.7.3.2 Säilytys

Käytetään mieluiten tuoreita kentältä otettuja maa-aineksiä. Ainoastaan silloin, kun tämä ei ole mahdollista, maa-aines säilytetään huoneenlämpötilassa ja pidetään ilmakeivana. Mitään takarajaa säilytykselle ei suositella, mutta maa-ainekset, joita on säilytetty yli kolme vuotta, on analysoitava uudelleen ennen käyttöä niiden orgaanisen hiilen pitoisuuden, pH:n ja kationinvaihtokyvyn (CEC) osalta.

1.7.3.3 Maa-ainesnäytteiden käsittely ja valmistelu testiä varten

Maa-ainekset ilmakeivataan huoneenlämpötilassa (mieluiten lämpötilassa 20-25 °C). Kokonaisuuden pilkkominen on suoritettava mahdollisimman varovasti, jotta maaperän alkuperäinen rakenne muuttuisi mahdollisimman vähän. Maa-ainekset seulotaan partikkelikokoon ≤ 2 mm; seulonnessa noudatetaan maa-ainesten näytteenottoa koskevia ISO-standardin suosituksia (ISO 10381-6). Huolellista homogenointia suositellaan sen vuoksi, että se parantaa tulosten uusittavuutta. Kunkin maa-aineksen kosteuspitoisuus määritetään kolmesta määräosasta kuumentamalla lämpötilassa 105 °C, kunnes painonmuutos ei ole merkittävä (noin 12 h). Kaikissa laskelmissa maa-aineksen massalla tarkoitetaan uunikuivaa massaa eli maa-aineksen kosteuspitoisuuskorjattua painoa.

1.7.4 Testiaineen valmistus maa-ainekseen lisättäväksi

Testiaine liuotetaan tislattuun tai deionisoituun veteen valmistettuun 0,01 M $CaCl_2$ -liuokseen; $CaCl_2$ -liuosta käytetään vesipitoisena liuotinfasina parantamaan sentrifugointia ja minimoimaan kationinvaihtoa. Varastoliuoksen konsentraation on mieluiten oltava suuruusluokaltaan tuhatkertainen käytetyn analyysimenetelmän herkkyteen verrattuna. Tällöin tällä menetelmällä saadaan tarkkoja mittauksia; lisäksi varastoliuoksen konsentraation on oltava testiaineen vesiliukoisuusrajaa pienempi.

Varastoliuos valmistetaan mieluiten juuri ennen sen lisäämistä maa-ainesnäytteisiin, ja se säilytetään suljettuna pimeässä 4 °C:n lämpötilassa. Säilytysaika riippuu testiaineen stabiiliudesta ja sen konsentraatiosta liuoksessa.

Ainoastaan niukkaliukoisille aineille ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) saatetaan tarvita soveltuvaa liuottavaa ainetta silloin, kun testiaineen liuottaminen on vaikeaa. Tämän liuottavan aineen on sekoitettava veteen (esim. metanoli tai asetonitrili); sen konsentraatio ei saa ylittää yhtä prosenttia varastoliuoksen kokonaistilavuudesta ja sitä saa olla enintään tämän verran testiaineliuoksessa, joka joutuu kosketuksiin maa-aineksen kanssa (mieluiten alle 0,1 %). Se ei myöskään saa olla pinta-aktiivinen aine eikä se saa osallistua solvataatioreaktioihin testikemikaalin kanssa. Liuottavan aineen käytöstä on määrättävä ja sen käyttö on perusteltava tuloksia raportoidessa.

Toisena vaihtoehtona on lisätä niukkaliukoinen testiaine koejärjestelmään siten, että testiaine liuotetaan orgaaniseen liuottimeen, ja määräraosa tästä lisätään järjestelmään, jossa on maa-ainesta ja tislattuun tai deionisoituun veteen valmistettua 0,01 M CaCl₂-liuosta. Orgaanisen liuottimen pitoisuus vesifaasissa on pidettävä mahdollisimman alhaisena, tavallisesti alle 0,1 prosenttia. Testiaineen lisäys orgaanisessa liuoksessa voi vaikuttaa virheellisesti tilavuusmäärän toistettavuuteen. Näin ollen lisävirhe on mahdollinen, kun testiaineen ja lisäliuottimen konsentraatiot eivät ole samat kaikissa testeissä.

1.8 EDELLYTYKSET ADSORPTIO-DESORPTIOTESTIN SUORITTAMISELLE

1.8.1 Analyysimenetelmä

Tärkeimmät tekijät, jotka voivat vaikuttaa sorptiomittausten tarkkuuteen, ovat sekä liuos- että adsorptiofaasien analyyseissä käytettävän analyyttisen menetelmän tarkkuus, testiaineen stabiilius ja puhtaus, sorptiotasapainotilan saavuttamisaste, liuoskonsentraatiomuutoksen suuruus, maa-aines/liuos -suhde sekä muutokset maa-aineksen rakenteessa tasapainoprosessin aikana (35)(59-62). Liitteessä 2 esitetään joitakin esimerkkejä tarkkuutta koskevista kysymyksistä.

Käytetyn analyysimenetelmän luotettavuus on tarkistettava sillä konsentraatioalueella, joka todennäköisesti esiintyy testin aikana. Kokeen suorittaja voi vapaasti kehittää soveltuvan menetelmän, jonka tarkkuus, täsmällisyys, uusittavuus, herkkyys ja saanto ovat tarkoituksenmukaisia. Ohjeita tällaisen testin suorittamiseksi saadaan jäljempänä esitettävästä kokeesta.

Sopivaa määrää 0,01 M CaCl₂-liuosta, esimerkiksi 100 cm³, ravistellaan 4 tunnin ajan yhdessä maa-ainemäärän kanssa, esimerkiksi 20 g, jonka adsorptiokyky on hyvä, eli jonka orgaanisen hiilen pitoisuus ja savipitoisuus on korkea; nämä painot ja tilavuudet voivat vaihdella analyysitarpeiden mukaisesti. Sopivana lähtökohtana voidaan pitää maa-aines/liuos -suhdetta 1 : 5. Seos sentrifugoidaan ja vesifaasi voidaan suodattaa. Vesifaasiin lisätään tietty tilavuusmäärä testiaineen varastoliuosta, jotta saadaan nimellinen konsentraatio sille konsentraatioalueelle, joka todennäköisesti esiintyy testin aikana. Tämä tilavuusmäärä ei saa ylittää 10 prosenttia vesifaasin lopputilavuudesta - tällöin se muuttaa esitasapainotusliuoksen ominaisuuksia mahdollisimman vähän. Liuos analysoidaan.

Testaukseen on sisällytettävä yksi nollakoe, jossa on vain maa-aines ja CaCl₂-liuos (ilman testiainetta), jotta voidaan tarkistaa, johtuuko analyysimenetelmästä artefaktoja ja maa-aineksestä matriisivaikutuksia.

Analyysimenetelmät, joita voidaan käyttää sorptiomittauksiin, käsittävät kaasu-nestekromatografian (GLC), korkean suorituskyvyn nestekromatografian (HPLC), spektrofotometrian (esimerkiksi GC-massaspektrometria, HPLC-massaspektrometria) ja nestetuikelaskennan (vain radioaktiivisesti aineille). Käytetystä analyysimenetelmästä riippumatta pidetään sopivana, että saannot ovat 90 -110 prosenttia nimellisarvosta. Jotta kromatografisen erotuksen jälkeen voidaan tulos detektoida ja arvioida, analyyttisen menetelmän herkkyys olisi oltava suuruusluokaltaan nimelliskonsentraatiota vähintään kaksi kertaluokkaa pienempi.

Adsorptiotutkimuksiin käytettävän analyysimenetelmän ominaisuudet ja herkkyys ovat tärkeitä tekijöitä määriteltäessä koeolosuhteita ja testin koko suorituskykyä. Tässä menetelmässä noudatetaan yleisiä koekäytäntöjä ja annetaan suosituksia ja ohjeita vaihtoehtoisille ratkaisuille, jos analyysimenetelmä tai laboratoriomahdollisuudet asettavat rajoituksia.

1.8.2 Optimaalisten maa-aines/liuos -suhteiden valinta

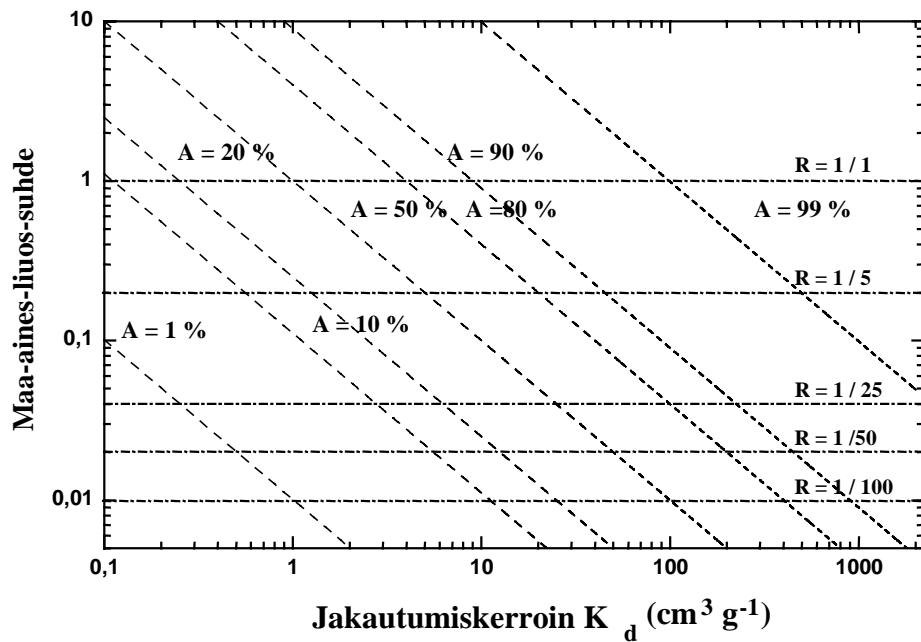
Sopivien maa-aines/liuos -suhteiden valinta sorptiotutkimuksiin riippuu jakautumiskertoimesta K_d ja halutusta suhteellisesta adsorboitumisasteesta. Aineen konsentraationmuutos liuoksessa taas vaikuttaa adsorptioyhtälön perustuvan mittauksen tilastolliseen tarkkuuteen ja on osoitus analyttisen menetelmän herkkyydestä. Siksi käytännössä on hyödyllistä valita muutama kiinteä suhde, joilla adsorboitumisprosentti on yli 20 prosenttia ja mieluiten > 50 prosenttia (62); samalla on huolehdittava siitä, että testiaineen konsentraatio vesifaasissa on riittävän korkea tarkan mittauksen mahdollistamiseksi. Tämä on erityisen tärkeää silloin, kun adsorboitumisprosentit ovat suuria.

Sopiva lähestymistapa soveltuvien maa-aines/vesi -suhteiden valitsemiseksi perustuu joko alustavissa tutkimuksissa tai hyväksytyin arviointitekniikoin (liite 3) arvioitun K_d -arvoon. Soveltuvan suhteen valinta voidaan tehdä sitten K_d :n funktiona esitetyn maa-aines/liuos -suhdediagrammin pohjalta määrätyille adsorboitumisprosentteille (kuva 1). Esityksessä oletetaan, että adsorptioyhtälö on lineaarinen¹. Sopiva suhde saadaan järjestämällä K_d :n yhtälö (4) yhtälön (1) muotoon:

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

tai sen logaritmiseen muotoon olettaen että $R = m_{\text{soil}}/V_0$ ja $A_{\text{eq}}\%/100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$:

$$\log R = - \log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1-A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (2)$$



Kuva 1 Maa-aines-liuos-suhteiden ja K_d :n välinen yhteys testiaineen erilaisilla adsorboitumisprosentteilla

¹ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

Kuvassa 1 esitetään tarvittavat maa-aines/liuos -suhteet K_d :n funktiona eri adsorboitumisasteille. Esimerkiksi maa-aines/liuos -suhteen ollessa 1 : 5 ja K_d :n ollessa 20 adsorboituminen on 80 prosentin luokkaa. Jotta saavutettaisiin 50 prosentin adsorboituminen samalla K_d -arvolla, on käytettävä suhdetta 1 : 25. Tällainen lähestymistapa sopivan maa-aines/liuos -suhteiden valitsemisessa antaa tutkijalle joustavuutta.

Vaikeammin käsiteltäviä tapauksia ovat ne, joissa kemikaali on voimakkaasti tai hyvin heikosti adsorboitunut. Silloin kun adsorboituminen on heikkoa, suositellaan maa-aines/liuos -suhteeksi 1 : 1, vaikkakin eräille hyvin orgaanisille maalajeille saatetaan tarvita pienempiä suhteita lietteen saamiseksi. Pienten liuoskonsentraatiomuutosten mittaamiseksi käytettävien analyysimenetelmien kanssa on oltava huolellinen; muutoin adsorptiomittaukset ovat epätarkkoja. Toisaalta K_d -jakautumiskertoimien ollessa hyvin suuria saatetaan maa-aines/liuos -suhteissa mennä jopa suhteisiin 1 : 100, jotta liukseen jäisi merkittävä määrä kemikaalia. Huolellisuutta on kuitenkin noudatettava hyvän sekoituksen varmistamiseksi ja systeemin tasapainottumiseen on jätettävä riittävästi aikaa. Vaihtoehtoisena lähestymistapana on ennustaa K_d -arvo arviointitekniikkoja käyttäen, esimerkiksi P_{ow} -arvoihin (liite 3) perustuvaa tekniikkaa käyttäen. Tämä voi olla hyödyllistä erityisesti heikosti adsorboituville/polaarisille kemikaaleille, joiden $P_{ow} < 20$, ja lipofiilisille tai helposti sorboituville kemikaaleille, joiden $P_{ow} > 10^4$.

1.9 TESTIN SUORITTAMINEN

1.9.1 Koelosuhteet

Kaikki kokeet suoritetaan huoneenlämpötilassa ja vakiolämpötilassa 20 - 25 °C, jos mahdollista.

Sentrifugoinnilla olisi voitava erottaa liuksesta yli 0,2 µm:n kokoiset partikkelit. Tätä pidetään kiintoainepartikkelin ja kolloidipartikkelin raja-arvona. Ohjeita sentrifugointiolosuhteiden määrittämiseksi annetaan liitteessä 4.

Jos sentrifugoinnilla ei voida poistaa yli 0,2 µm:n kokoisia partikkeleita, voidaan käyttää sentrifugoinnin ja yli 0,2 µm:n suodattimilla suoritettavan suodatuksen yhdistelmää. Näiden suodattimien on oltava sopivaa inerttiä materiaalia, jotta niiden pinnalle takertumisesta aiheutuvat testiaineen häviöt voitaisiin välttää. Joka tapauksessa on osoitettava, ettei suodatuksen aikana tapahdu testiainehäviöitä.

1.9.2 Taso 1- Alustava tutkimus

Alustavan tutkimuksen tarkoitus on selvitetty jo kohdassa "Soveltamisala". Ohjeita kyseisen tutkimuksen toteuttamiseksi annetaan jäljempänä esitettävässä kokeessa.

1.9.2.1 Optimaalisten maa-aines/liuos -suhteiden valitseminen

Käytetään kahta maalajia ja kolmea maa-aines/liuos -suhdetta (kuusi koetta). Toisessa maalajissa orgaanisen hiilen pitoisuus on korkea ja savipitoisuus matala, ja toisessa maalajissa orgaanisen hiilen pitoisuus on matala ja savipitoisuus korkea. Suositellaan seuraavia suhteita:

-50 g maa-ainesta ja 50 cm³ testiaineen vesiliuosta (suhde 1/1)

-10 g maa-ainesta ja 50 cm³ testiaineen vesiliuosta (suhde 1/5)

-2 g maa-ainesta ja 50 cm³ testiaineen vesiliuosta (suhde 1/25).

Vähimmäismäärä maa-ainesta, jolla koe voidaan suorittaa, riippuu laboratoriomahdollisuuksista ja käytettyjen analyysimenetelmien suorituskyvystä. Käytettäväksi suositellaan kuitenkin vähintään 1 grammaa ja mieluiten 2 grammaa maa-ainesta luotettavien testitulosten saamiseksi.

Yhdelle vertailunäytteelle, jossa on ainoastaan testiainetta 0,01 M CaCl₂-liuoksessa (ei maa-ainesta), suoritetaan täsmälleen samat toimenpiteet kuin testisysteemeille, jotta testiaineen stabiilius CaCl₂-liuoksessa ja sen mahdollinen adsorboituminen koeastioiden pinnalle voidaan tarkistaa.

Nollakokeella, jossa on sama määrä maa-ainesta ja liuoksen kokonaistilavuus 50 cm^3 0,01 M CaCl_2 -liuosta (ilman testiainetta), suoritetaan samat testaustoimenpiteet kutakin maa-ainesta kohden. Tämä toimii taustavertailuna analyysin aikana häiritsevien aineiden tai kontaminoituneiden maa-ainesten havaitsemiseksi.

Kaikki kokeet, vertailu- ja nollakokeet mukaan lukien, suoritetaan vähintään rinnakkaisnäytteillä. Tutkimusta varten valmistettavien näytteiden kokonaismäärä voidaan laskea käytettävän menetelmän mukaisesti.

Alustava tutkimus ja varsinainen tutkimus tehdään yleisesti ottaen samoilla menetelmillä. Poikkeuksista mainitaan tarvittaessa.

Ilmakuivatut maa-ainenäytteet saatetaan tasapainoon ravistelemalla niitä vähintään 45 cm^3 :n kanssa 0,01 M CaCl_2 -liuosta yön yli (12 h) ennen koepäivää. Myöhemmin lisätään tietty tilavuusmäärä testiaineen varastoliuosta, jotta lopputilavuudeksi saadaan 50 cm^3 . Tämän lisättävän varastoliuoksen tilavuus ei saa ylittää 10 prosenttia vesifaasin lopputilavuudesta (50 cm^3), jotta esitasapainotusliuoksen ominaisuudet muuttuisivat mahdollisimman vähän, ja sen olisi mieluiten oltava sellainen, että maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiaineen alkukonsentraatio C_0 on suuruusluokaltaan vähintään satakertainen analyysimenetelmän herkkyteen verrattuna; tällainen konsentraatio takaa tarkkojen mittausten suorittamisen myös silloin, kun adsorptio on voimakas ($> 90 \%$) ja sen, että adsorptioisotermit voidaan myöhemmin määrittää. Suositellaan myös, jos mahdollista, ettei aineen alkukonsentraatio (C_0) ylittäisi puolta siitä, mikä on sen liukoisuusraja.

Jäljempänä esitetään esimerkki siitä, kuinka varastoliuoksen konsentraatio (C_{st}) lasketaan. Oletetaan, että toteamisraja on $0,01 \mu\text{g cm}^{-3}$ ja adsorptio 90 prosenttia; tällöin maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiaineen alkukonsentraation olisi mieluiten oltava $1 \mu\text{g cm}^{-3}$ (suuruusluokaltaan satakertainen toteamisrajaan verrattuna). Oletetaan, että varastoliuosta lisätään suositeltu enimmäismäärä eli 5 cm^3 45 cm^3 :iin 0,01 M CaCl_2 -tasapainoliuosta (= varastoliuos 10 % vesifaasin 50 cm^3 :n kokonaistilavuudesta), jolloin varastoliuoksen konsentraation on oltava $10 \mu\text{g cm}^{-3}$; tämä on suuruusluokaltaan tuhatkertainen analyysimenetelmän toteamisrajaan verrattuna.

Vesifaasin pH on mitattava ennen ja jälkeen maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutumista, koska tällä on tärkeä merkitys koko adsorptioprosessissa, erityisesti ionisoituvien aineiden ollessa kyseessä.

Seosta ravistellaan, kunnes adsorptiotasapainotila on saavutettu. Aika tasapainotilan saavuttamiseksi maa-aineksissa vaihtelee suuresti kemikaalin ja maa-aineksen mukaisesti; 24 tunnin jakso on yleensä riittävä (77). Alustavassa tutkimuksessa näytteitä voidaan kerätä järjestyksessä 48 tunnin sekoitusjakson aikana (esimerkiksi 4, 8, 24, 48 tunnin kohdalla). Analyysijat on kuitenkin sovitettava joustavasti laboratorion työaikataluun.

Testiaineen vesiliuoksen analysoimiseksi on kaksi vaihtoehtoa: a) rinnakkaismenetelmä ja b) sarjamenetelmä. On korostettava sitä, että vaikka rinnakkaismenetelmä vie kokeellisesti enemmän aikaa, tulosten matemaattinen käsittely on yksinkertaisempaa (liite 5). Käytettävän menetelmän valitsee kuitenkin kokeen suorittaja, jonka on otettava huomioon käytettävissä olevat mahdollisuudet ja resurssit laboratoriossa.

a) rinnakkaismenetelmä: valmistetaan samalla maa-aines/liuos -suhteella niin monta näytettä, kuin adsorptiokinetiikan tutkimiseksi halutaan näytteenottohetkiä. Sentrifugoinnin ja mahdollisen suodatuksen jälkeen ensimmäisen koeputken vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti ja mitataan esimerkiksi 4 tunnin jälkeen, vastaavasti toiselle koeputkelle 8 tunnin, kolmannelle koeputkelle 24 tunnin jälkeen ja niin edelleen.

b) sarjamenetelmä: kullekin maa-aines/liuos -suhteelle valmistetaan ainoastaan yksi kaksoisnäyte. Tietyin aikavälein seos sentrifugoidaan faasien erottamiseksi. Vesifaasista otetaan pieni määräosa, josta testiaine analysoidaan välittömästi; koe jatkuu sitten alkuperäisellä seoksella. Jos käytetään suodatusta sentrifugoinnin jälkeen, laboratoriossa olisi oltava mahdollisuudet pienten vesipitoisten määräosien suodatuskäsittelyyn. Suositellaan, että otettujen määräosien kokonaismäärä ei ylitä yhtä prosenttia liuoksen kokonaistilavuudesta. Tämä siksi, ettei maa-aines/liuos -suhde muuttuisi merkittävästi ja ettei testin aikana adsorboituvissa olevan liukoisen massan määrä myöskään vähenisi.

Adsorboitumisprosentti A_{t_i} lasketaan kullakin ajanhetkellä (t_i) nimellisen alkukonsentraation pohjalta ja näytteenottohetkellä (t_i) mitattu konsentraatio korjataan nollakoevarvon perusteella. Ajan funktiona esitettäviä A_{t_i} käyriä (kuva 1, liite 5) käytetään tasapainotilan saavuttamisen arvioimiseksi². Lasketaan myös K_d -arvo tasapainotilassa. Tämän K_d -arvon pohjalta valitaan kuvasta 1 sopivat maa-aines/liuos -suhteet siten, että adsorboitumisprosentti on yli 20 prosenttia, mieluiten > 50 prosenttia (61). Kaikki diagrammeissa käytettävät yhtälöt ja periaatteet esitetään kohdassa "Tulokset ja niiden raportointi" sekä liitteessä 5.

1.9.2.2 *Adsorptiotasapainotilan saavuttamisajan määrittäminen ja adsorboituneen testiaineen määrittäminen tasapainotilassa*

Kuten jo mainittiin, ajan funktiona esitettävien A_{t_i} tai C_{aq}^{ads} -käyrien avulla on mahdollista arvioida adsorptiotasapainotilan saavuttamista ja adsorboituneen testiaineen määrää tasapainotilassa. Liitteessä 5 esitetyissä kuvissa 1 ja 2 on esimerkkejä tällaisista käyristä. Tasapainottumisaika on se aika, jonka systeemi tarvitsee tasapainon saavuttamiseen.

Jos jonkin tiettyä maa-ainesta tutkittaessa tasapainotilaa ei saavuteta, vaan konsentraatio nousee jatkuvasti, tämä voi johtua sekoittavista tekijöistä kuten biohajoamisesta tai hitaasta diffuusiosta. Biohajoaminen voidaan osoittaa toistamalla koe steriloitua maa-ainenäytettä käyttäen. Jos tasapainotilaa ei tällöinkään saavuteta, kokeen suorittajan on etsittävä muita ilmiöitä, jotka saattaisivat liittyä kyseisiin tutkimuksiin; tämä voidaan tehdä muuntelemalla koeolosuhteita sopivasti (lämpötila, ravisteluaikat, maa-aines/liuos -suhteet). Kokeen suorittajan päätettävissä on, jatkaako hän testin suoritusta, vaikka tasapainotila saattaa jäädä saavuttamatta.

1.9.2.3 *Adsorptio koeastian pintaan ja testiaineen stabiilius*

Joitakin tietoja testiaineen adsorboitumisesta koeastioiden pintaan samoin kuin sen stabiiliudesta voidaan johtaa vertailunäytteiden analysoinnista. Jos havaitaan konsentraation pienenevän enemmän kuin analyysimenetelmän keskivirhe, kyseessä saattaa olla abioottinen hajoaminen ja/tai adsorptio koeastian pintaan. Nämä ilmiöt voidaan erottaa toisistaan siten, että astian seinämät huuhdellaan huolellisesti tunnetulla määrällä sopivaa liuotinta ja analysoidaan pesuliuos testiaineen osalta. Jos adsorptiota koeastioiden pintaan ei havaita, vähennys osoittaa testiaineen abioottista epästabiiliutta. Jos adsorboitumista havaitaan, koeastiamateriaali on vaihdettava. Tästä kokeesta saatuja tietoja koeastioiden pintaan tapahtuvasta adsorboitumisesta ei voida kuitenkaan ekstrapoloida suoraan maa-aines/liuos -kokeeseen. Maa-aineen läsnäolo vaikuttaa tähän adsorboitumiseen.

Lisätietoja testiaineen stabiiliudesta voidaan johtaa määrittämällä kokonaisuudessaan kokeen aikana. Tämä tarkoittaa sitä, että testiaine määritetään vesifaasista, maa-ainesuutteista ja koeastian seinästä. Lisätyn testikemikaalin massan ja vesifaasissa olevien testikemikaalimassojen ja maa-aineksestä sekä koeastiaseinästä saatujen uutteen summan välinen ero on yhtä kuin hajonnut ja/tai haihtunut ja/tai uuttumaton massa. Massataseen määrittämiseksi adsorptiotasapainotila on saavutettava koejakson aikana.

²Vesifaasissa olevan testiaineen konsentraatiota (C_{aq}^{ads}) ajan funktiona kuvaavia diagrammeja voidaan käyttää myös tasapainotilan saavuttamisen arviointiin (katso kuva 2 liitteessä 5).

Massatase määritetään sekä maa-aineksesta että yhdestä sellaisesta maa-aines/liuos -suhteesta maa-ainesta kohden, josta vähenee yli 20 prosenttia ja mieluiten > 50 prosenttia tasapainotilassa. Kun suhteenmäärityskokeen lopussa on viimeinen näyte vesifaasista määritetty 48 tunnin jälkeen, faasit erotetaan sentrifugoimalla, ja mahdollisesti suodattamalla. Vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti, ja sopivaa uuttoluotinta (uuttokerroin vähintään 95 %) lisätään maa-ainekseen testiaineen uuttamiseksi. Suositellaan vähintään kahta peräkkäistä uutttoa. Testiaine määritetään maa-aines- ja koeastiauutteista ja lasketaan massatase (yhtälö 10, "Tiedot ja raportointi"). Jos se on alle 90 prosenttia, katsotaan, että testiaine on epästabiili testin aikana. Tutkimukset voivat kuitenkin yhä jatkua, kunhan testiaineen epästabiilius otetaan huomioon; tässä tapauksessa varsinaiseen tutkimukseen suositellaan molempien faasien analysointia.

1.9.2.4 Taso 2 - Adsorptiokinetiikka yhdellä testiainekonsentraatiolla

Käytetään viittä maa-ainesta, jotka valitaan taulukosta 1. Näihin viiteen maa-ainekseen olisi hyvä sisällyttää kaikki alustavassa tutkimuksessa käytetyt maa-ainekset tai joitakin niistä. Tällöin tasoa 2 ei tarvitse toistaa alustavassa tutkimuksessa käytetyille maa-aineksille.

Tasapainotilan saavuttamisaika, maa-aines/liuos -suhde, maa-ainenäytteen paino, maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin tilavuus ja testiaineen konsentraatio liuoksessa valitaan alustavan tutkimuksen tulosten perusteella. Analyysi on suoritettava mieluiten noin 2, 4, 6, 8 (mahdollisesti myös 10) ja 24 tunnin kontaktiajan jälkeen; ravisteluaika voidaan ulottaa enintään 48 tuntiin silloin, kun kemikaali tarvitsee pidemmän ajan tasapainotilan saavuttamiseen suhteenmääritystulosten perusteella. Analyysi-aikoihin voidaan kuitenkin suhtautua joustavasti.

Jokainen koe (yksi maa-aines ja yksi liuos) suoritetaan vähintään rinnakkaisnäytteillä tulosten varianssin arvioimiseksi. Jokaisessa kokeessa suoritetaan yksi nollakoe. Siinä käytetään maa-ainesta ja 0,01 M CaCl₂-liuosta ilman testiainetta, ja painon ja tilavuuden on oltava samat kuin varsinaisessa kokeessa. Vertailunäytteelle, jossa on ainoastaan testiainetta 0,01 M CaCl₂-liuoksessa (ilman maa-ainesta), suoritetaan sama testimenettely, jotta voitaisiin varautua yllättäviin tilanteisiin.

Adsorboitumisprosentti lasketaan kullakin ajanhetkellä A_{t_1} ja/tai aikavälillä $A_{\Delta t_1}$ (tarpeen mukaan) ja esitetään ajan funktiona. Lasketaan myös jakautumiskerroin K_d tasapainotilassa samoin kuin orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin K_{oc} (ei-polaarisille orgaanisille kemikaaleille).

Adsorptiokinetiikkatestin tulokset

Lineaarinen K_d -arvo on yleensä tarkka kuvaamaan sorptiokäyttäytymistä maa-aineksessa (35)(78) ja se kuvaa kemikaalien luontaista kulkeutumista maaperässä. Esimerkiksi kemikaaleja, joiden $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, pidetään yleensä helposti kulkeutuvina. MacCall *et al.* (16) ovat kehittäneet K_{oc} -arvoihin perustuvan kulkeutuvuusluokituskaavion. Lisäksi käytetään K_{oc} :n ja DT-50³:n väliseen suhteeseen (32)(79) perustuvia uuttumisluokituskaavioita.

Virheanalyysitutkimusten mukaan (61) alle $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ olevia K_d -arvoja ei myöskään voida arvioida tarkasti vesifaasikonsentraation pienenemisen pohjalta, ei edes silloin, kun käytetään soveltuvinta (tarkkuuden kannalta soveltuvinta) maa-aines/liuos -suhdetta, eli 1:1. Tällaisessa tapauksessa suositellaan molempien faasien, sekä maa-aineksen että liuoksen, analysointia.

³ DT-50: aika, jolloin 50 % testiaineesta on hajonnut.

Edellä esitettyjen huomautusten pohjalta suositellaan, että kemikaalin adsorptiokäyttäytymistä ja mahdollista kulkeutumista maaperässä koskevaa tutkimusta jatketaan määrittämällä Freundlichin adsorptioisotermit näille systeemeille. K_d :n tarkka määrittäminen kyseisille systeemeille on mahdollista tässä testimenetelmässä esitettävän koejärjestelyn avulla. Täsmällinen määrittäminen on mahdollinen, jos K_d kerrottuna maa-aines/liuos -suhteella antaa tulokseksi arvon $> 0,3$ silloin, kun mittaukset perustuvat vesifaasikonsentraation pienenemiseen (epäsuora menetelmä), tai arvon $> 0,1$ silloin, kun molemmat faasit analysoidaan (suora menetelmä) (61).

1.9.2.5 Taso 3 - Adsorptioisotermit ja desorptiokinetiikka/desorptioisotermit

1.9.2.5.1 Adsorptioisotermit

Käytetään viittä testiainekonsentraatiota, jotka kattavat mieluiten kaksi suuruusluokkaa; näitä konsentraatioita valittaessa on otettava huomioon vesiliukoisuus ja syntyvät tasapainokonsentraatit vesiliuksissa. Kullakin maa-aineksella on säilytettävä sama maa-aines/liuos -suhde läpi tutkimuksen. Adsorptiotesti suoritetaan edellä kuvatulla tavalla lukuun ottamatta sitä, että vesifaasi analysoidaan vain kerran ja sillä ajanhetkellä, joka tarvitaan tasapainotilan saavuttamiseen (ja joka määritettiin edellä 2-tason kokeessa). Liuoksen tasapainokonsentraatit määritetään ja adsorboitunut määrä lasketaan testiaineen vähentymisestä liuoksesta tai suoraa menetelmää käyttäen. Adsorboitunut massa maa-aineksen massayksikköä kohden esitetään testiaineen tasapainokonsentraation funktiona (katso "Tulokset ja niiden raportointi").

Adsorptioisotermikokeen tulokset

Tähän mennessä esitetyistä matemaattisista adsorptiomalleista Freundlichin isotermi on se, jota useimmin käytetään adsorptioprosessien kuvaamiseen. Yksityiskohtaisempia tietoja adsorptiomallien tulkinnasta ja merkityksestä esitetään lähteissä (41)(45)(80)(81)(82).

Huomautus: Eri aineiden K_F -arvojen (Freundlichin adsorptiokertoimien) vertailu on mahdollista ainoastaan silloin, kun nämä K_F -arvot ilmaistaan samoina yksikköinä (83).

1.9.2.5.2 Desorptiokinetiikka

Tämän kokeen tarkoituksena on tutkia, adsorboituuko kemikaali maa-ainekseen reversiibelisti vai irreversiibelisti. Tämä tieto on tärkeä, koska desorptioprosessilla on tärkeä merkitys myös kemikaalin käyttäytymisessä maaperässä kenttäolosuhteissa. Desorptiotiedot ovat lisäksi käyttökelpoisia syöttötietoja uuttumista kuvaavassa tietokonehallintamisessa ja liuenneita aineita sisältävien valumien simuloinnissa. Jos halutaan tehdä desorptiotutkimus, suositellaan, että jäljempänä kuvattava tutkimus suoritetaan jokaiselle systeemille, jolle edellisessä adsorptiokinetiikkakokeessa on ollut mahdollista määrittää tarkka K_d -arvo.

Kuten adsorptiokinetiikkatutkimuksessakin, desorptiokinetiikkakokeessa on käytettävissä kaksi vaihtoehtoa: a) rinnakkaismenetelmä ja b) sarjamenetelmä. Käytettävän menetelmän valitsee kokeen suorittaja, jonka on otettava huomioon käytettävissä olevat mahdollisuudet ja resurssit laboratoriossa.

a) rinnakkaismenetelmä: jokaiselle maa-ainekselle, joka valitaan desorptiotutkimukseen, valmistetaan näytteet samalla maa-aines/liuos -suhteella ja niin monta näytettä kuin desorptiokinetiikan tutkimiseksi halutaan näytteenottohetkiä. Mieluiten käytetään samoja aikavälejä kuin adsorptiokinetiikkakokeessa; kokonaisaikaa voidaan kuitenkin tarvittaessa pidentää systeemin desorptiotasapainotilan saavuttamiseksi. Jokaisessa kokeessa (yksi maa-aines, yksi liuos) suoritetaan yksi nollakoe. Siinä on maa-ainesta ja 0,01 M CaCl₂-liuosta ilman testiainetta, ja painon ja tilavuuden on oltava samat kuin varsinaisessa kokeessa. Vertailunäytteenä suoritetaan testiaineelle 0,01 M CaCl₂-liuoksessa (ilman maa-ainesta) sama testimenettely. Kaikkia maa-aines-liuos-seoksia ravistellaan, kunnes adsorptiotasapainotila on saavutettu (mikä määritettiin 2-tason kokeessa). Tämän jälkeen faasit erotetaan sentrifugoimalla ja vesifaasit poistetaan mahdollisimman tarkasti. Poistettu liuostilavuus korvataan samalla tilavuudella 0,01 M CaCl₂-liuosta, joka ei sisällä testiainetta, ja uusia seoksia ravistellaan uudelleen. Ensimmäisen koeputken vesifaasi otetaan talteen mahdollisimman tarkasti ja mitataan esimerkiksi 2 tunnin jälkeen, toisen koeputken vesifaasi 4 tunnin, kolmannen koeputken 6 tunnin jälkeen ja niin edelleen, kunnes desorptiotasapainotila on saavutettu.

b) sarjamenetelmä: adsorptiokinetiikkakokeen jälkeen seos sentrifugoidaan ja vesifaasi poistetaan mahdollisimman tarkasti. Poistettu liuostilavuus korvataan yhtä suurella tilavuudella 0,01 M CaCl₂-liuosta, joka ei sisällä testiainetta. Uutta seosta ravistellaan, kunnes desorptiotasapainotila on saavutettu. Tämän ajanjakson aikana seosta sentrifugoidaan tietyin aikavälein faasien erottamiseksi. Testiaine määritetään pienestä määräosasta vesifaasia välittömästi; tämän jälkeen koe jatkuu alkuperäisellä seoksella. Kunkin yksittäisen määräosan tilavuuden on oltava alle yhden prosentin kokonaistilavuudesta. Seokseen lisätään sama määrä tuoretta 0,01 M CaCl₂-liuosta maa-aines/liuos-suhteen säilyttämiseksi, ja ravistelu jatkuu seuraavan aikavälin ajan.

Desorboitusprosentti lasketaan kullakin ajanhetkellä (D_{t_1}) ja/tai aikavälillä ($D_{\Delta t_1}$) (tutkimuksen tarpeiden mukaisesti) ja se esitetään ajan funktiona. Lasketaan myös tasapainotilan desorptiokerroin K_{des} . Kaikki käytettävät yhtälöt esitetään kohdassa "Tulokset ja niiden raportointi" sekä liitteessä 5.

Desorptiokinetiikkakokeen tulokset

Yleisten ajan funktiona esitettävien desorboitusprosentti- D_{t_1} ja adsorboitusprosentti- A_{t_1} diagrammien avulla on mahdollista arvioida adsorptioprosessin reversiibeliyttä. Vaikka desorptiotasapainotilan saavuttamiseen menisikin jopa kaksinkertainen aika adsorptiotasapainotilan saavuttamiseen verrattuna ja kokonaisdesorptio olisi yli 75 prosenttia adsorboituneesta määrästä, adsorptiota pidetään reversiibelinä.

1.9.2.5.3 Desorptioisotermit

Freundlichin desorptioisotermit määritetään maa-aineksista, joita on käytetty adsorptioisotermikokeessa. Desorptiotesti suoritetaan kohdassa "Desorptiokinetiikka" kuvatulla tavalla lukuun ottamatta sitä, että vesifaasi analysoidaan vain kerran, desorptiotasapainotilassa. Lasketaan desorboituneen testiaineen määrä. Maa-ainekseen desorptiotasapainotilassa adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus esitetään liuoksessa olevan testiaineen tasapainokonsentraation funktiona (katso "Tulokset ja niiden raportointi" sekä liite 5).

2. TULOKSET JA NIIDEN RAPORTOINTI

Analyysitiedot esitetään taulukkomuodossa (katso liite 6). Niissä esitetään yksittäiset mittaukset ja lasketut keskiarvot sekä adsorptioisotermien graafiset kuvaajat. Laskutoimitukset tehdään jäljempänä kuvatulla tavalla.

Testin tarkoituksia varten sovitaan, että 1 cm³ vesiliuosta painaa 1g. Näin maa-aines/liuos -suhde voidaan ilmaista yksikköinä w/w tai w/vol samalla numerolla.

ADSORPTIO

Adsorptio (A_{t_i}) määritellään maa-ainekseen adsorboituneen aineen prosenttiosuutena testin alussa lisätystä aineen määrästä. Jos testiaine on stabiili eikä adsorboitu merkittävästi astiaseinämiin, A_{t_i} lasketaan kullakin ajanhetkellä t_i seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (3)$$

jossa:

A_{t_i} = adsorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i (%)

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa (μg) ajanhetkellä t_i

m_0 = testiaineen massa koeputkessa testin alussa (μg).

Yksityiskohtaiset tiedot siitä, kuinka adsorboitumisprosentti A_{t_i} lasketaan rinnakkais- ja sarjamenetelmälle, annetaan liitteessä 5.

Jakautumiskerroin K_d on maa-ainesfaasissa olevan aineen pitoisuuden ja vesiliuoksessa olevan aineen massakonsentraation välinen suhde koeolosuhteissa adsorptiotasapainotilassa.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (4)$$

jossa:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen pitoisuus adsorptiotasapainotilassa ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = vesifaasissa olevan aineen massakonsentraatio adsorptiotasapainotilassa ($\mu\text{g cm}^{-3}$). Tämä konsentraatio määritetään analyytisesti nollakokeiden antamat arvot huomioon ottaen

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

m_{soil} = maa-ainesfaasin määrä, maa-aineksen kuiva-aineena ilmaistuna (g)

V_0 = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin alkutilavuus (cm^3).

A_{eq} :n ja K_d :n välinen suhde saadaan yhtälöstä

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

jossa:

A_{eq} = adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa, %.

Orgaanisen hiilen suhteen normalisoitu adsorptiokerroin K_{oc} liittyy jakautumiskertoimen K_d maa-ainesnäytteen orgaanisen hiilen pitoisuuteen:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (\text{cm}^3 \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

jossa:

$\%OC$ = maa-ainesnäytteessä olevan orgaanisen hiilen prosenttiosuus (g g^{-1}).

K_{oc} -kerroin edustaa yksittäistä arvoa, joka kuvaa pääasiassa ei-polaaristen orgaanisten kemikaalien jakautumista maa-aineksessa tai sedimentissä olevaan orgaaniseen hiileen ja veteen. Näiden kemikaalien adsorboituminen korreloi sorboivan kiintoaineen orgaanisten aineiden pitoisuuden kanssa (7); näin ollen K_{oc} -arvot riippuvat humusjakeiden erityisominaisuuksista, joiden sorptiokyvyt vaihtelevat huomattavasti - tämä johtuu eroista aluperässä, syntytavassa ja niin edelleen.

2.1.1 Adsorptioisotermit

Freundlichin adsorptioisotermien yhtälö liittyy adsorboituneen testiaineen määrän tasapainotilassa liuoksessa olevan testiaineen konsentraatioon (yhtälö 8).

Mittaustuloksia käsitellään kuten kohdassa "Adsorptio". Kullekin koeputkelle lasketaan adsorptiotestin jälkeen maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen pitoisuus ($C_s^{ads}(eq)$), ilmaistu muualla muodossa x/m). Oletetaan, että tasapainotila on saavutettu ja että $C_s^{ads}(eq)$ kuvaa tasapainoarvoa:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (7)$$

Yhtälö (8) on Freundlichin adsorptioyhtälö:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (8)$$

tai lineaarisessa muodossa:

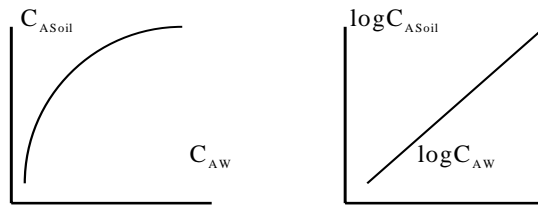
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

jossa:

K_F^{ads} = Freundlichin adsorptiokerroin; sen yksikkö on $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ainoastaan silloin, kun $1/n = 1$; kaikissa muissa tapauksissa kulmakerroin $1/n$ esiintyy K_F^{ads} :n laatua osoittavassa yksikössä ($\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$);

n = regressiovakio; $1/n$ vaihtelee yleensä välillä 0,7 - 1,0, mikä osoittaa, että sorptiotiedot ovat usein hieman epälineaarisia.

Piirretään yhtälöt (8) ja (9) ja lasketaan K_F^{ads} ja $1/n$ -arvot regressioanalyysillä yhtälöä 9 käyttäen. Lasketaan myös logaritmiyhtälön korrelaatiokerroin r^2 . Esimerkit tällaisista käyristä esitetään kuvassa 2.



Kuva 2. Freundlichin adsorptiokäyrä, normaali ja linearisoitu

2.1.2 Massatase

Massatase (MB) on se aineen prosenttiosuus testin alussa lisätystä aineen nimellismäärästä, joka voidaan ottaa analyttisesti talteen adsorptiotestin jälkeen.

Tulokset käsitellään eri tavalla, kun liuotin sekoittuu täysin veteen. Veteen sekoittuvan liuottimen tapauksessa tulokset voidaan käsitellä kuten kohdassa "Desorptio" liuotinuuton avulla talteen saadun aineen määrän määrittämiseksi. Jos liuotin sekoittuu veteen niukasti, on talteenotettu määrä mitattava.

Massatase MB adsorptiolle lasketaan seuraavasti: oletetaan, että tekijä (m_E) vastaa maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä orgaanisella liuottimella uutettujen testikemikaalimassojen summaa:

$$MB = \frac{(V_{\text{rec}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (10)$$

jossa:

MB = massatase (%)

m_E = kahdessa vaiheessa maa-aineksesta ja koeastiaseinämistä uutetun testiaineen kokonaismassa (μg)

C_0 = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa ($\mu\text{g cm}^{-3}$)

V_{rec} = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen talteen otetun supernatantin tilavuus (cm^{-3}).

Desorptio (D) määritellään desorboituneen testiaineen prosenttiosuutena aiemmin adsorboituneen aineen määrästä koeolosuhteissa:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (11)$$

jossa:

D_{t_i} = desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i (%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = maa-aineksesta desorboituneen testiaineen massa (μg) ajanhetkellä t_i

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg).

Yksityiskohtaiset tiedot siitä, kuinka lasketaan desorboitumisprosentti D_{t_i} rinnakkais- ja sarjamenetelmälle, annetaan liitteessä 5.

Näennäinen desorptiokerroin (K_{des}) on koeolosuhteissa maa-ainesfaasiin jääneen aineen pitoisuuden suhde desorboituneen aineen massakonsentraatioon vesiliuoksessa silloin, kun desorptiotasapainotila on saavutettu:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \cdot \frac{V_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

jossa:

K_{des} = desorptiokerroin ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$)

$m_{aq}^{des}(eq)$ = maa-aineksesta desorboituneen testiaineen kokonaismassa desorptiotasapainotilassa (μg)

V_T = maa-aineksen kanssa desorptiokinetiikkatestin aikana kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (cm^3).

Ohjeet $m_{aq}^{des}(eq)$:n laskemiseksi annetaan liitteessä 5 kohdassa "Desorptio".

Huomautus

Jos edeltävä adsorptiotesti suoritettiin rinnakkaismenetelmää käyttäen, niin yhtälössä (12) esiintyvä tilavuus V_T oletetaan yhtä suureksi kuin V_0 .

Desorptioisotermit

Freundlichin desorptioisotermien yhtälö yhdistää maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuuden liuoksessa olevan testiaineen konsentraatioon desorptiotasapainotilassa (yhtälö 16).

Kullekin koeputkelle lasketaan maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen aineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa seuraavasti:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) määritellään seuraavasti:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(\text{eq}) \cdot \frac{V_0}{V_{\text{F}}} - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad (\mu\text{g}) \quad (14)$$

jossa:

$C_{\text{s}}^{\text{des}}$ (eq) = maa-ainekseen adsorboituneeksi jääneen testiaineen pitoisuus desorptiotasapainotilassa ($\mu\text{g g}^{-1}$)

$m_{\text{m}}^{\text{des}}$ (eq) = vesifaasista desorptiotasapainotilassa analyttisesti määritetyn aineen massa (μg)

m_{aq}^{A} = epätäydellisestä tilavuustäydennyksestä johtuen adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{F}^{F} = koeputkesta testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus, desorptiotasapainotilassa (cm^3)

V_{R} = koeputkesta adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuudella 0,01 M CaCl_2 -liuosta (cm^3)

Yhtälö (16) on Freundlichin desorptioyhtälö:

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

tai lineaarisessa muodossa:

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

jossa:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = Freundlichin desorptiokerroin

n = regressiovakio

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}$ (eq) = vesifaasissa olevan aineen massakonsentraatio desorptiotasapainotilassa ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Yhtälöt (16) ja (17) voidaan piirtää ja $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ ja $1/n$ -arvot lasketaan regressioanalyysin avulla yhtälöä 17 käyttäen.

Huomautus:

Jos Freundlichin adsorptio- tai desorptioeksponentti $1/n$ on yhtä kuin 1, Freundlichin adsorption tai desorption sitoutumisvakio ($K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ ja $K_{\text{F}}^{\text{des}}$) on yhtä suuri kuin adsorptio- tai desorptiotasapainovakiot (vastaavasti K_{d} ja K_{des}), jolloin C_{s} vs C_{aq} -käyrät ovat lineaariset. Jos eksponentit ovat erisuuria kuin 1, C_{s} vs C_{aq} -käyrät eivät ole lineaarisia ja adsorptio- ja desorptiovakiot vaihtelevat isotermien eri kohdissa.

TESTIRAPORTTI

Testiraportissa on esitettävä seuraavat tiedot:

- Käytettyjen maa-ainesnäytteiden täydelliset tunnistetiedot, johon sisältyy:
 - maantieteellinen sijainti (leveysasteet, pituusasteet)
 - näytteenottopäivämäärä
 - käyttömuoto (esimerkiksi maatalousmaa, metsä)
 - näytteenottosyvyys
 - hiekka-, liete- ja savipitoisuus
 - pH-arvot (0,01 M CaCl₂:ssa)
 - orgaanisen hiilen pitoisuus
 - orgaanisen aineksen pitoisuus
 - typpipitoisuus
 - C/N -suhde
 - kationinvaihtokyky (mmol/kg)
 - kaikki maa-ainesnäytteiden keräämiseen ja säilyttämiseen liittyvät tiedot
 - soveltuvin osin kaikki testiaineen adsorptio-desorptiotulkinnan kannalta merkitykselliset tiedot
 - kunkin muuttujan määrittämiseksi käytettyjen menetelmien kirjallisuusviitteet
- testiainetta koskevat tiedot soveltuvin osin
- koelämpötilat
- sentrifugointiolosuhteet
- analyysimenetelmä testiaineen analysoimiseksi
- perustelut kaikelle liuottavien aineiden käytölle testiaineen varastoliuosten valmistuksessa
- selvitykset laskelmissa tehdyistä korjauksista
- tiedot taulukkomuodossa (liite 6) ja graafiset esitykset
- kaikki tiedot ja havainnot, jotka helpottavat testitulosten tulkintaa.

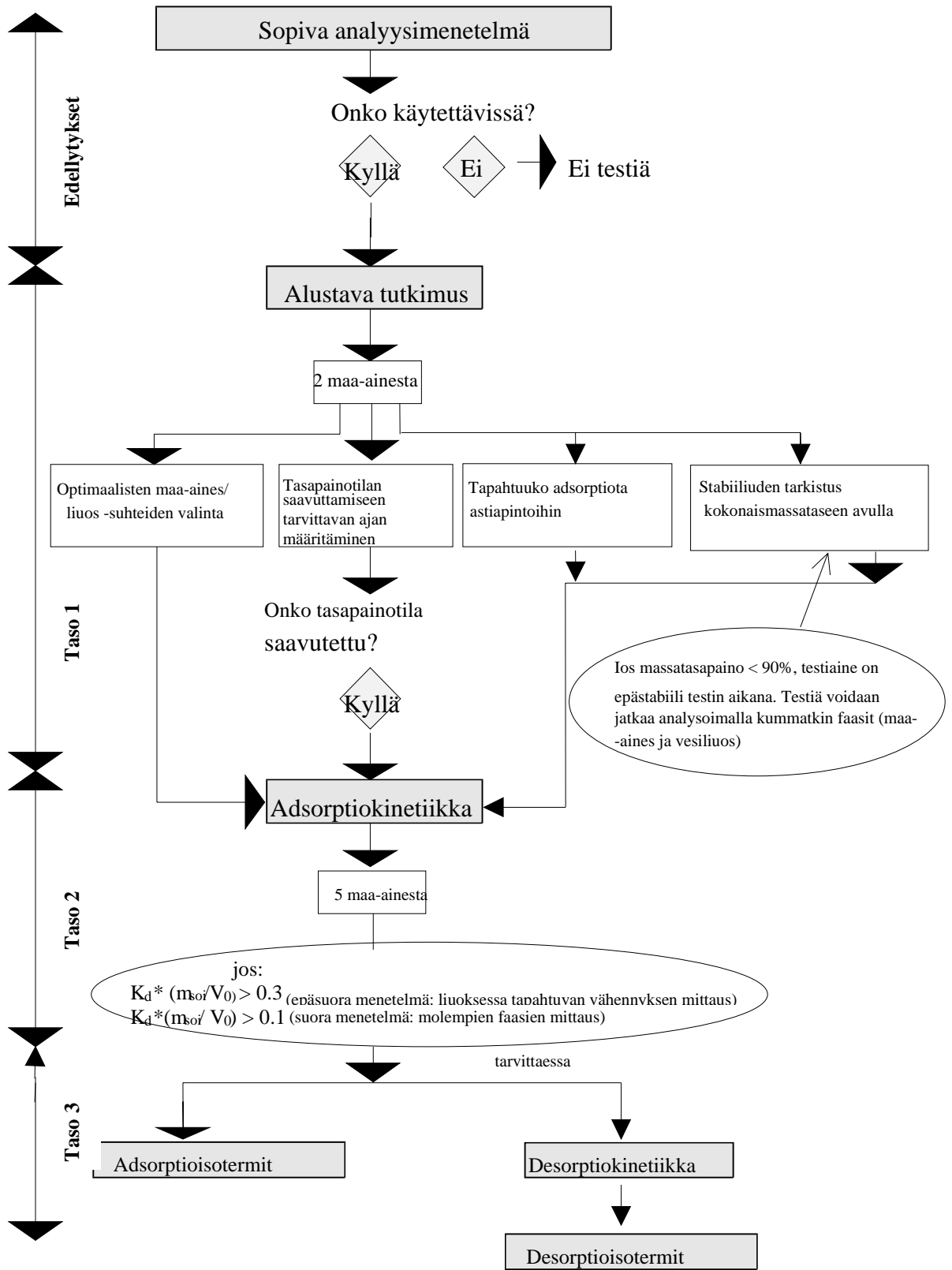
1. Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02 045, Part II.
2. Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02 045, Part I.
3. Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.
4. OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).
5. US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.
6. US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.
7. ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.
8. Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.
9. Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
10. Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.
11. BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.
12. Calvet R., (1989), "Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils", in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).
13. Calvet R., (1980) "Adsorption-Desorption Phenomena" in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.
14. Hasset J.J., and Banwart W.L., (1989), "The sorption of nonpolar organics by soils and sediments" in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.
15. van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), "An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media". Soil Sci. Soc. Am. Proc., Vol. 38(1), 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.

21. Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), "Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils". Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.
22. Furninge 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), pp. 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, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
32. Gustafson D.I., (1989), "Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability". J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), 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), "Sorpton estimates for modeling", in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp.80-101,
36. Lambert S.M., (1967), "Functional relationship between sorption in soil and chemical structure". J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.
37. Hance R.J., (1969), "An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils". J. Agri. Food Chem., 17, 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, pp. 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.
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.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.
70. Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), "A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds". *Science*, Vol. 206, 831-832.

71. Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981), "Sorption of *p*-Naphthol: 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 - réactivité. *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, pp. 29-36.
78. Koskinen W.C., and Harper S.S., (1990), "The retention processes: mechanisms" in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
79. Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), "Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses", in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
80. Giles C.H., (1970), "Interpretation and use of sorption isotherms" in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, 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).

LIITE 1
Testikaavio



LIITE 2

ANALYYSIMENETELMÄN TARKKUUDEN JA KONSENTRAATIOMUUTOKSEN VAIKUTUS
 ADSORPTIOTULOSTEN TARKKUUTEEN

Seuraavasta taulukosta (84) käy ilmi, että silloin kun alkuperäisen massan ($m_0 = 110 \mu\text{g}$) ja liuoksessa olevan testiaineen tasapainomassan ($m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}$) välinen ero on hyvin pieni, 5 prosentin virhe tasapainokonsentraation mittaustuloksissa johtaa 50 prosentin virheeseen maa-ainekseen adsorboituneen aineen pitoisuuslaskelmissa ($m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$) ja 52,4 prosentin virheeseen K_d -laskelmissa.

Maa-aineksen määrä $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$
 Liuoksen tilavuus $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	R_{\ddagger}	K_d^*	R_{\ddagger}
	(μg)	($\mu\text{g cm}^{-3}$)		(μg)	($\mu\text{g g}^{-1}$)			
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	KUN A = 9 %							
	100	1,000	todell. arvo	10	1,00	todell. arvo	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 %
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	KUN A = 55 %							
	50,0	0,500	todell. arvo	60,0	6,00	todell. arvo	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 %
$m_0 = 110 \mu\text{g or}$ $C_0 = 1.100 \mu\text{g / cm}^3$	KUN A = 99 %							
	1,100	0,011	todell. arvo	108,9	10,89	todell. arvo	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 %

$$* m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), \quad C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}, \quad K_d = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = maa-ainesfaasissa olevan testiaineen massa tasapainotilassa, μg

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = vesifaasissa olevan testiainen massa tasapainotilassa, μg

$C_s^{ads}(eq)$ = testiaineen pitoisuus maa-ainesfaasissa tasapainotilassa, $\mu g g^{-1}$

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa tasapainotilassa, $\mu g cm^{-3}$

R = analyttinen virhe $m_{aq}^{ads}(eq)$:n määrittämisessä

R^{\dagger} = analyttisestä virheestä R johtuva laskettu virhe.

LIITE 3

K_d:N ARVIOINTITEKNIIKAT

1. Arviointitekniikoiden avulla on mahdollista ennustaa K_d-arvoja, jotka perustuvat korrelaatioon esimerkiksi P_{ow} -arvojen kanssa (12)(39)(63-68), vesiliukoisuustietojen kanssa (12)(19)(21)(39)(68-73) tai käänteisfaasi- HPLC:sta johdettujen polaarisuustietojen kanssa (74-76). Taulukoissa 1 ja 2 esitetyt K_{oc} tai K_{om} -arvot on laskettu näistä yhtälöistä ja K_d sitten epäsuorasti yhtälöistä:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \quad (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Tämä korrelaatiokäsite perustuu kahteen oletukseen: 1) aineen adsorboitumiseen vaikuttaa pääasiassa juuri maa-aineksen orgaaninen aines; ja 2) kyseeseen tulevat vuorovaikutukset ovat pääasiassa polaarittomia. Täten näitä korrelaatioita ei voida soveltaa polaarisiin aineisiin tai soveltaminen voidaan ulottaa vain tiettyyn rajaan asti, ja niitä ei voida soveltaa silloin, kun orgaanisen aineksen pitoisuus maa-aineksessa on hyvin pieni (12). Vaikka tyydyttäviä P_{ow}:n ja adsorption (19) välisiä korrelaatioita onkin löydetty, samaa ei voida sanoa vesiliukoisuuden ja adsorboitumisasteen (19)(21) välisistä yhteyksistä; tutkimustulokset ovat toistaiseksi hyvin ristiriitaisia.

3. Joitakin esimerkkejä adsorptiokertoimen ja oktanoli-vesi -jakautumiskertoimen välisistä korrelaatioista samoin kuin suhteesta vesiliukoisuuteen esitetään taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1. Esimerkkejä adsorptiojakautumiskertoimen ja oktanoli-vesi -jakautumiskertoimen välisistä korrelaatioista; lisäesimerkkejä lähteistä (12) (68).

Aineet	Korrelaatiot	Tekijät
Substituoidut ureat	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Klooratut aromaattit	$\log K_{oc} = -0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Erilaiset torjunta-aineet	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Aromaattiset hiilivedyt	$\log K_{oc} = -2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles ja Mantoura (1987) (67)

Taulukko 2. Esimerkkejä adsorptiojakautumiskertoimen ja vesiliukoisuuden välisistä korrelaatioista; katso lisäesimerkkejä lähteistä (68) (69).

Yhdisteet	Korrelaatiot	Tekijät
Erilaiset torjunta-aineet	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Alifaattiset, aromaattiset klooratut aineet	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α-naftoli	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Sykliset, alifaattiset aromaattiset aineet	$\log K_{oc} = -1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 (\text{mp}-25)$	Karickhoff (1981) (72)
Erilaiset yhdisteet	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

LIITE 4

SENTRIFUGOINTIOLOSUHTEIDEN LASKEMINEN

1. Sentrifugointiaika saadaan seuraavasta kaavasta olettaen, että partikkelit ovat pallomaisia:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln(R_b/R_t) \quad (1)$$

Yksinkertaisuuden vuoksi kaikki muuttujat esitetään muina kuin SI-yksikköinä (g, cm).

jossa:

ω	=	pyörimisnopeus (= 2π rpm/60), rad s ⁻¹
rpm	=	kierrosta minuutissa
η	=	liuoksen viskositeetti, g s ⁻¹ cm ⁻¹
r_p	=	partikkelin säde, cm
ρ_s	=	maa-aineksen tiheys, g cm ⁻³
ρ_{aq}	=	liuoksen tiheys, g cm ⁻³
R_t	=	etäisyys sentrifugipyörijän keskikohdasta sentrifugiputkessa olevan liuoksen yläpintaan, cm
R_b	=	etäisyys sentrifugipyörijän keskikohdasta sentrifugiputken pohjaan, cm
$R_b - R_t$	=	maa-aines/liuos -seoksen pituusmitta sentrifugiputkessa, cm.

Käytännössä lasketut ajat yleensä kaksinkertaistetaan täydellisen erottumisen varmistamiseksi.

2. Yhtälöä (1) voidaan edelleen yksinkertaistaa, jos oletetaan, että liuoksen viskositeetti (η) ja tiheys (ρ_{aq}) on yhtä suuri kuin veden viskositeetti ja tiheys lämpötilassa 25 °C; tällöin $\eta = 8,95 \times 10^{-3}$ g s⁻¹cm⁻¹ ja $\rho_{aq} = 1,0$ g cm⁻³.

Tämän jälkeen sentrifugointiaika saadaan yhtälöstä (2):

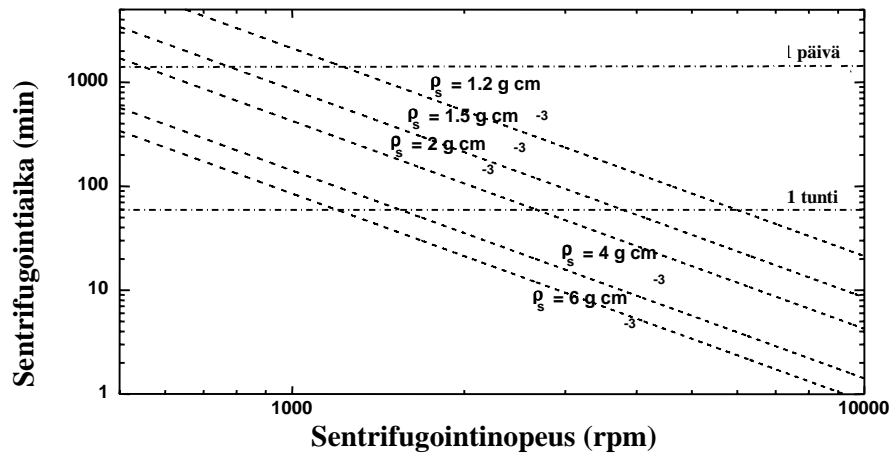
$$t = \frac{3,7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

3. Yhtälöstä (2) käy ilmi, että sentrifugointiolosuhteiden eli ajan (t) ja nopeuden (rpm) määrittäminen perustuu kahteen tärkeään muuttujaan, jotta määrätynkokoiset partikkelit saadaan erotetuksi (tässä tapauksessa säde on 0,1 μ m): 1) maa-aineksen tiheys ja 2) seoksen pituus sentrifugiputkessa ($R_b - R_t$), eli väli, jolla esiintyy maa-ainepartikkeleita liuoksen yläreunasta koeputken pohjaan; tällöin on selvää, että kun putkessa olevan seoksen tilavuus on sama, seoksen pituus koeputkessa riippuu koeputken säteen neliöstä.

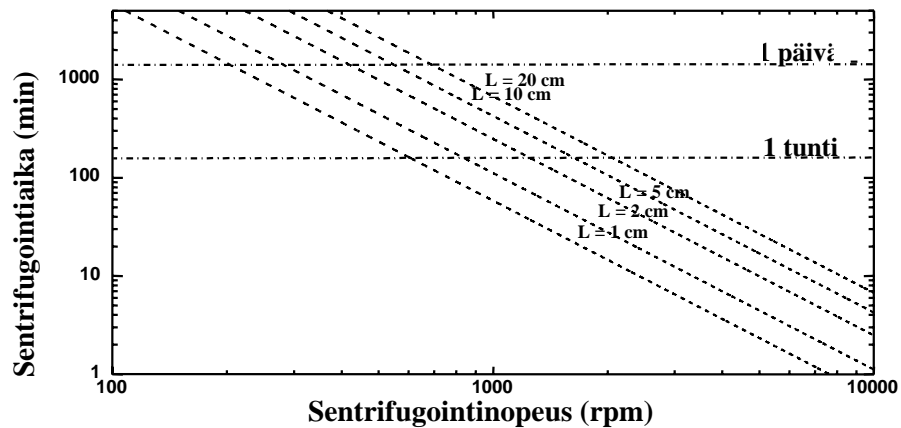
4. Kuvassa 1 esitetään, kuinka sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetty sentrifugointiaika (t) vaihtelee eri maa-ainestiheyksillä (ρ_s) (kuva 1a) ja silloin, kun seoksen pituus sentrifugiputkissa on erilainen (kuva 2a). Kuvassa 1a näkyy selvästi maa-aineksen tiheyden vaikutus; esimerkiksi klassisella 3 000 rpm:n sentrifugoinnilla sentrifugointiaika on noin 240 minuuttia, kun maa-aineksen tiheys on 1,2 g/cm³ ja vain 50 minuuttia, kun tiheys on 2,0 g/cm³. Vastaavasti kuvasta 1b näkyy, kuinka klassisella 3 000 rpm:n sentrifugoinnilla sentrifugointiaika on noin 50 minuuttia, kun seoksen pituus on 10 cm ja vain 7 minuuttia, kun pituus on 1 cm. Sentrifugointituloksen kannalta on edullisinta, jos putkessa olevan seoksen pituus on mahdollisimman pieni, ja käsittely taas on helpointa, jos putkessa olevan seoksen pituus on suuri; tässä on löydettävä paras kompromissi.

5. Lisäksi silloin, kun määritellään koeolosuhteita maa-aines/liuos -faasien erottelemiseksi, on tärkeää ottaa huomioon mahdollinen kolmannen "pseudofaasin" eli kolloidien olemassaolo. Näillä partikkeleilla, joiden koko on alle $0,2 \mu\text{m}$, voi olla merkittävä vaikutus aineen koko adsorptiomekanismiin maa-ainessuspensiossa. Kun sentrifugointi suoritetaan edellä kuvatulla tavalla, jäävät kolloidit vesifaasiin ja joutuvat analyysiin yhdessä vesifaasin kanssa. Tällöin tiedot niiden vaikutuksista jäävät saamatta.

Jos suorittavalla laboratorilla on ultrasentrifugointi- tai ultrasuodatusmahdollisuus, aineen adsorptiota/desorptiota maa-aineksessa voidaan tutkia syvemmin, mukaan lukien tiedot aineen adsorboitumisesta kolloideihin. Tällöin olisi käytettävä ultrasentrifugointinopeutta $60\,000 \text{ rpm/min}$ tai ultrasuodatusta suodatinhuokoisuudella $100\,000$ Daltonia, jotta nämä kolme faasia voidaan erottaa: maa-aines, kolloidit, liuos. Testimenetelmää on myös muunneltava tämän mukaisesti, jotta kaikista kolmesta faasista voitaisiin suorittaa aineen analysointi.



Kuva 1a. Sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetyn sentrifugointiajan (t) vaihtelu eri maa-ainestheyksille (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ja $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$, kun $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

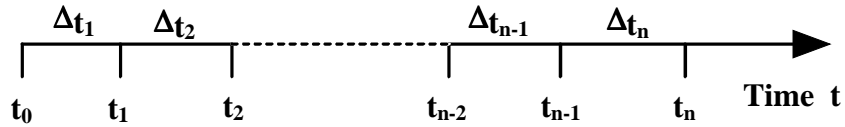


Kuva 1b. Sentrifugointinopeuden (rpm) funktiona esitetyn sentrifugointiajan (t) vaihtelu silloin, kun sentrifugiputkessa olevan seoksen pituus on erilainen ($R_b - R_t = L$; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ kun $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ja $\rho_s = 20 \text{ g cm}^{-3}$.

LIITE 5

ADSORPTION A (%) JA DESORPTION D (%) LASKEMINEN

Menettelyn aikakaavio on:



Kaikkissa laskelmissa oletetaan, että testiaine on stabiili eikä adsorboidu merkittävästi astiaseinämiin.

ADSORPTION A (A %)

a) Rinnakkaismenetelmä

Adsorboitumisprosentti lasketaan kullekin koeputkelle (i) kullakin ajanhetkellä (t_i) seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} \quad (\%) \quad (1)^4$$

Tämän yhtälön tekijät voidaan puolestaan laskea seuraavasti:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

joissa:

A_{t_i} = adsorboitumisprosentti (%) ajanhetkellä t_i

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = testiaineen massa maa-aineksessa ajanhetkellä t_i , kun analyysi suoritetaan (μg)

m_0 = testiaineen massa koeputkessa testin alussa (μg)

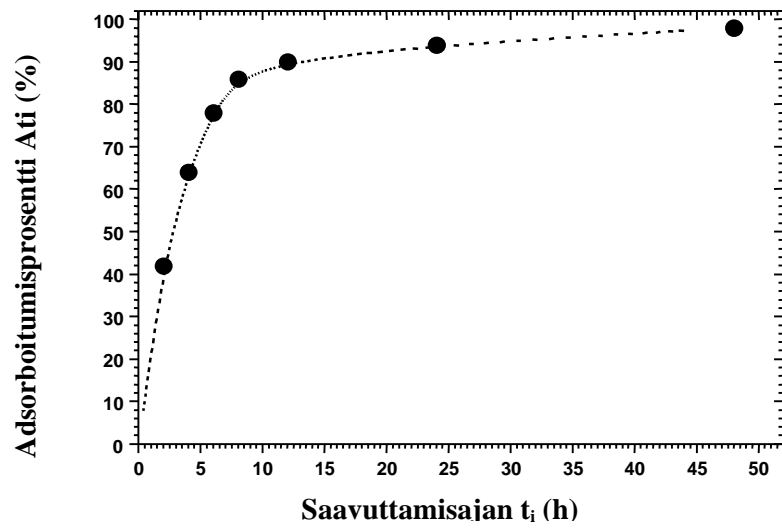
C_0 = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen massakonsentraatio alussa ($\mu\text{g cm}^{-3}$)

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ = aineen massakonsentraatio vesifaasissa ajanhetkellä t_i , kun analyysi suoritetaan ($\mu\text{g cm}^{-3}$); tämä konsentraatio määritetään analyytisesti ottaen huomioon nollakokeista saadut arvot

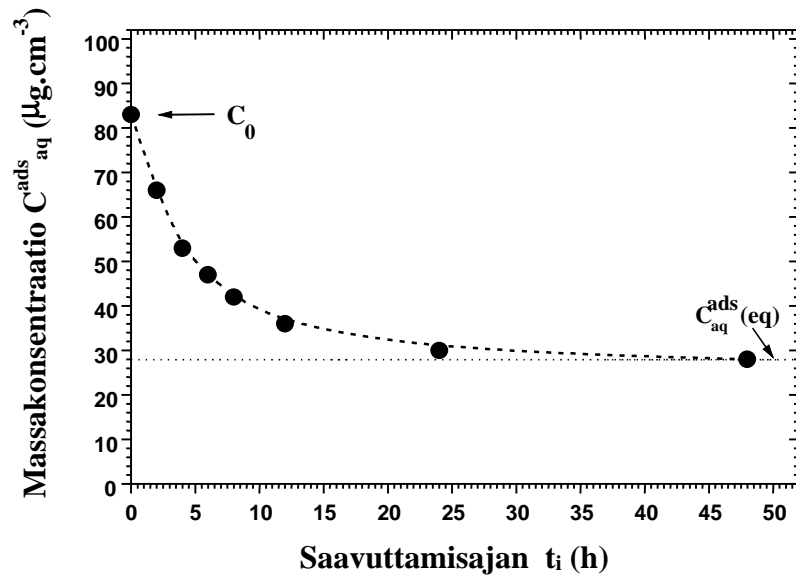
V_0 = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan testiliuoksen alkutilavuus (cm^3).

Adsorboitumisprosenttien arvot A_{t_i} tai $C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i)$ esitetään ajan funktiona ja määritetään aika, joka kuluu sorptiotasapainotilan saavuttamiseen. Esimerkkejä tällaisista käyristä esitetään kuvassa 1 ja kuvassa 2.

⁴Näitä yhtälöitä voidaan soveltaa sekä suoriin että epäsuoriin menetelmiin. Kaikkia muita yhtälöitä voidaan soveltaa ainoastaan epäsuoraan menetelmään.



Kuva 1. Adsorptiotasapainokäyrä



Kuva 2. Testiaineen massakonsentraatio vesifaasissa (C_{aq}) ajan funktiona

b) Sarjamenetelmä

Seuraavissa yhtälöissä otetaan huomioon, että adsorptiokoe suoritetaan mittaamalla testiaine vesifaasin pienistä määraosista ja määrätyn aikavälein.

- Kullakin aikavälillä maa-ainekseen adsorboituneen aineen määrä lasketaan seuraavasti:

- ensimmäisellä aikavälillä $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

- toisella aikavälillä $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

- kolmannella aikavälillä $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

- n:nnellä aikavälillä $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

- Adsorboitumisprosentti kullakin aikavälillä, $A_{\Delta t_i}$, lasketaan seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (8)^5$$

kun taas adsorboitumisprosentti (A_{t_i}) ajanhetkellä t_i saadaan yhtälöstä:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (9)^5$$

⁵ Näitä yhtälöitä voidaan soveltaa sekä suoriin että epäsuoriin menetelmiin. Kaikkia muita yhtälöitä voidaan soveltaa ainoastaan epäsuoraan menetelmään.

Adsorptioarvot A_{t_1} tai $A_{\Delta t_1}$ (tutkimuksen tarpeiden mukaisesti) esitetään ajan funktiona ja määritetään aika, joka kuluu sorptiotasapainotilan saavuttamiseen.

- Ajanhetkellä, jolloin tasapainotila on saavutettu t_{eq} :

- maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa on:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^5$$

- liuoksessa olevan testiaineen massa on:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^5$$

- ja adsorboitumisprosentti tasapainotilassa on:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)^5$$

Edellä käytetyt muuttujat määritellään seuraavasti:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = maa-ainekseen eri aikaväleillä $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$, adsorboituneen aineen massa (μg)

$m_m^{ads}(t_1), m_m^{ads}(t_2), \dots, m_m^{ads}(t_n)$ = määräosassa v_a^A mitatun aineen massa ajanhetkellä t_1, t_2, \dots, t_n (μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = liuoksessa olevan aineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

v_a^A = määräosan tilavuus, josta testiaine mitataan (cm^3)

$A_{\Delta t_1}$ = aikaväliä Δt_1 vastaava adsorboitumisprosentti (%)

A_{eq} = adsorboitumisprosentti adsorptiotasapainotilassa (%).

DESORPTIO D (%)

Ajanhetki t_0 , jolloin desorptiokinetiikkakoe alkaa, on hetki, jolloin talteenotettu testiaine liuos, jonka tilavuus on suurimmillaan kun adsorptiotasapainotila on saavutettu, korvataan yhtä suurella tilavuusmäärällä 0,01 M CaCl₂-liuosta.

a) Rinnakkaismenetelmä

Ajanhetkellä t_i mitataan testiaineen massa koeputkesta i (V_R^i) otetusta vesifaasista ja desorboitunut massa lasketaan seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_R^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Desorptiotasapainotilassa $t_i = t_{eq}$ ja siten $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Aikavälillä (Δt_i) desorboituneen testiaineen massa saadaan yhtälöstä:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Desorboitumisprosentti lasketaan:

- ajanhetkellä t_i yhtälöstä:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (15)$$

- ja aikavälillä (Δt_i) yhtälöstä:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (16)$$

jossa:

D_{t_i} = desorboitumisprosentti ajanhetkellä t_i (%)

$D_{\Delta t_i}$ = aikaväliä Δt_i vastaava desorboitumisprosentti (%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = ajanhetkellä t_i desorboituneen testiaineen massa (μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = aikavälillä Δt_i desorboituneen testiaineen massa (μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = analyttisesti mitatun testiaineen massa ajanhetkellä t_i liuostilavuudessa V_R^i , joka otetaan analyysiä varten (μg)

m_{aq}^A = epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (μg)

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = liuoksessa olevan testiaineen massa adsorptiotasapainotilassa (μg)

V_R = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuusmäärällä 0,01 M CaCl_2 -liuosta (cm^3)

V_T^i = testiaineen mittaamiseksi koeputkesta (i) otetun liuoksen tilavuus, desorptiokinetiikkakokeessa (cm^3).

Desorptioarvot D_{t_i} tai $D_{\Delta t_i}$ (tutkimustarpeiden mukaisesti) esitetään ajan funktiona, ja desorptiotasapainotilan saavuttamiseen kuluva aika määritetään.

b) Sarjamenetelmä

Seuraavissa yhtälöissä otetaan huomioon se, että edeltänyt adsorptiokoe on suoritettu määrittämällä testiaine vesifaasin pienistä määräosista (v_a^A) (sarjamenetelmä 1.9 kohdassa "Testin suorittaminen"). Oletetaan, että: a) adsorptiokinetiikkakokeen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus on korvattu samalla tilavuusmäärällä 0,01 M CaCl_2 -liuosta (V_R) ja b) maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (V_T) säilyy desorptiokinetiikkakokeen aikana vakiona ja se saadaan yhtälöstä:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

Ajanhetkellä t_i :

- Testiaineen massa mitataan pienistä määräosista (v_a^D) ja desorboitunut massa lasketaan seuraavan yhtälön mukaisesti:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D} \right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_T} \right) \quad (19)$$

- Desorptiotasapainotilassa $t_i = t_{eq}$ ja siten $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.
- Desorboitusprosentti D_{t_i} lasketaan seuraavasta yhtälöstä:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (20)$$

Aikavälillä (Δt_i):

- Kullakin aikavälillä desorboituneen aineen määrä lasketaan seuraavasti:

— ensimmäisellä aikavälillä $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{ja} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— toisella aikavälillä $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) \quad \text{ja}$$

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \left[m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) \right] \quad (22)$$

— n:nnellä aikavälillä $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_{\text{a}}^{\text{D}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_{\text{a}}^{\text{D}})}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

$$\text{ja } m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Lopuksi lasketaan desorboitumisprosentti kullakin aikavälillä, $D_{\Delta t_i}$, seuraavaa yhtälöä käyttäen:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (24)$$

kun taas desorboitumisprosentti D_{t_i} ajanhetkellä t_i saadaan yhtälöstä:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \quad (\%) \quad (25)$$

jossa edellä käytetyt muuttujat määritellään seuraavasti:

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{s}}^{\text{des}}(\Delta t_n) \quad = \text{maa-ainekseen aikavälillä } \Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n, \text{ adsorboituneeksi jääneen aineen massa } (\mu\text{g})$$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) \quad = \text{aikavälillä } \Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n \text{ desorboituneen testiaineen massa } (\mu\text{g})$$

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = määräosasta (v_a^D) mitatun aineen massa ajanhetkellä t_1, t_2, \dots, t_n (μg)

V_T = maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus sarjamenetelmällä suoritettuna desorptiokinetiikkakoeen aikana (cm^3)

m_{aq}^A = epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jääneen testiaineen massa (μg)

$$m_{\text{aq}}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = adsorptiotasapainotilan saavuttamisen jälkeen koeputkesta poistetun supernatantin tilavuus, joka korvataan samalla tilavuusmäärällä 0,01 M CaCl_2 -liuosta (cm^3)

v_a^D = sarjamenetelmällä suoritettuna desorptiokinetiikkakoeen aikana koeputkesta (i) analysoitavaksi otetun määräosan tilavuus (cm^3)

$$v_a^D \leq 0.02 \cdot V_T \quad (27)$$

LIITE 6

ADSORPTIO-DESORPTIO MAA-AINEKSISSA: TULOSTEN RAPORTOINTILOMAKE

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):.....%

Lämpötila:.....°C

Analyysimenetelmän soveltuvuus

Punnittu maa-aines	µg	
Maa-aines: kuivapaino	µg	
CaCl ₂ -liuoksen tilavuus	cm ³	
Loppuliuoksen nimelliskonsentraatio	µg cm ⁻³	
Loppuliuoksen konsentraatio	analyttinen µg cm ⁻³	

Käytetyn analyysimenetelmän periaate:

Analyysimenetelmän kalibrointi:

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):.....%

Lämpötila:.....°C

Käytetty analyysimenetelmä:

Epäsuora

Rinnakkais

Sarja

Suora

Adsorptiotesti: testinäytteet

	Symboli	Yksikkö	Tasapainottu- misaika	Tasapainottu- misaika	Tasapainottu- misaika	Tasapainottu- misaika
Koeputki n:o						
Punnittu maa-aines	-	g				
Maa-aines: kuivapaino	m_{soil}	g				
Veden tilavuus punnitussa maa-aineksessa (laskettu)	V_{WS}	cm ³				
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M CaCl ₂ -liuoksen tilavuus		cm ³				
Varastoliuoksen tilavuus		cm ³				
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	V_0	cm ³				
Testiliuoksen alkukonsentraatio	C_0	µg cm ⁻³				
Testiaineen massa testin alussa	m_0	µg				
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen						
Epäsuora menetelmä						
Rinnakkaismenetelmä						
Testiaineen konsentraatio vesifaasissa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm ⁻³				
Sarjamenetelmä						
Testiaineen mitattu massa määräosassa V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg				
Suora menetelmä						
Maa-ainekseen adsorboituneen testiaineen massa	$m_s^{ads}(t_i)$	µg				
Adsorptio laskeminen						
Adsorptio	A_{t_i}	%				
	$A_{\Delta t_i}$	%				
Keskiarvo						
Adsorptioerroin	K_d	cm ³ g ⁻¹				
Keskiarvo						
Adsorptioerroin	K_{oc}	cm ³ g ⁻¹				
Keskiarvo						

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):.....%

Lämpötila:.....°C

Adsorptiotesti: nolla- ja vertailukokeet

	Symboli	Yksikkö	Nollakoe		Nollakoe		Vertailukoe	
Koeputki n:o								
Punnitut maa-ainekset	-	g					0	0
Veden määrä punnitussa maa-aineksessa (laskettu)		cm ³					-	-
Lisätyn 0,01 M CaCl ₂ -liuoksen tilavuus		cm ³						
Lisätyn testiaineen varastoliuoksen tilavuus		cm ³	0	0				
Vesifaasin kokonaistilavuus (laskettu)		cm ³					-	-
Vesifaasissa olevan testiaineen alkukonsentraatio		µg cm ⁻³						
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen								
Konsentraatio vesifaasissa		µg cm ⁻³						

Huomautus: sarakkeita voidaan tarvittaessa lisätä

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C 12 h):.....%

Lämpötila:.....°C

Massatase

	Symboli	Yksikkö				
Koeputki n:o						
Punnittu maa-aines	-	g				
Maa-aines: kuivapaino	$m_{s_{oil}}$	g				
Punnitussa maa-aineksessa olevan veden tilavuus (laskettu)	V_{WS}	ml				
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M CaCl ₂ -liuoksen määrä		ml				
Varastoliuoksen tilavuus		cm ³				
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	V_0	cm ³				
Testiliuoksen alkukonsentraatio	C_0	µg cm ⁻³				
Tasapainottumisaika	-	h				
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen						
Testiainekonsentraatio vesifaasissa adsorptiotasapainotilassa nollakokeen korjaus huomioituna	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm ⁻³				
Tasapainottumisaika	t_{eq}	h				
1. laimennus liuotinta käyttäen						
Poistetun vesifaasin tilavuus	V_{rec}	cm ³				
Lisätyn liuottimen tilavuus	ΔV	cm ³				
1. uutto liuotinta käyttäen						
Analysaattorisignaali - liuotin	S_{E1}	eril.				
Testiaineen konsentraatio liuottimessa	C_{E1}	µg cm ⁻³				
Maa-aineksestä ja astiaseinämistä uutetun aineen massa	m_{E1}	µg				
2. laimennus liuotinta käyttäen						
Poistetun liuottimen tilavuus	ΔV_s	cm ³				
Lisätyn liuottimen tilavuus	$\Delta V'$	cm ³				
2. uutto liuotinta käyttäen						
Analysaattorisignaali- liuotinfaasi	S_{E2}	eril.				
Testiaineen konsentraatio liuottimessa	C_{E2}	µg cm ⁻³				
Maa-aineksestä ja astiaseinämistä uutetun aineen massa	m_{E2}	µg				
Kahdessa vaiheessa uutetun testiaineen kokonaismassa	m_E					
Massatase	MB	%				

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):.....%

Lämpötila:.....°C

Adsorptioisotermit

	Symboli	Yksikkö								
Koeputki n:o										
Punnittu maa-aines	-	g								
Maa-aines: kuivapaino	E	g								
Veden tilavuus punnitussa maa-aineksessa (laskettu)	V_{WS}	cm ³								
Maa-aineksen tasapainottamiseksi käytetyn 0,01 M CaCl ₂ -liuoksen tilavuus		cm ³								
Lisätyn varastoliuoksen tilavuus		cm ³								
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus (laskettu)	V_0	cm ³								
Liuoskonsentraatio	C_0	µg cm ⁻³								
Tasapainottumisaika	-	h								
Ravistelun ja sentrifugoinnin jälkeen										
Aineen konsentraatio vesifaasissa nollakokeen huomioon otettuna	$C_{aq}^{ads} (eq)$	µg cm ⁻³								
Lämpötila		°C								
Maa-ainesyksikköä kohden adsorboitunut massa	$C_s^{ads} (eq)$	µg g ⁻¹								

Regressioanalyysi:

K_F^{ads} -arvo:

1/n -arvo:

regressiokerroin r^2 :

Testattu aine:

Testattu maa-aines:

Maa-aineksen kuiva-ainepitoisuus (105 °C, 12 h):.....%

Lämpötila:.....°C

Käytetty analyysimenetelmä: Epäsuora Rinnakkais Sarja

Desorptiotesti

	Symboli	Yksiköt	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli	Aikaväli
Adsorptiovaiheesta saatavan koeputken n:o						
Maa-ainekseen adsorboituneen aineen massa adsorptiotasapainotilassa	$m_s^{ads}(eq)$	μg				
Poistetun vesifaasin tilavuus, korvataan 0,01 M CaCl ₂ :lla	V_R	cm^3				
Maa-aineksen kanssa kosketuksiin joutuvan vesifaasin kokonaistilavuus	RM V_0 SM V_T	cm^3				
Epätäydellisen tilavuustäydennyksen vuoksi adsorptiotasapainotilan ulkopuolelle jäävän testiaineen massa	m_{aq}^A	μg				
Desorptiokinetiikka						
Ajanhetkellä t_i mitatun maa-aineksestä desorboituneen aineen massa	$m_m^{des}(t_i)$	μg				
Koeputkesta (i) testiaineen mittaamiseksi otetun liuoksen tilavuus	RM v_r^i	cm^3				
	SM v_a^D	cm^3				
Ajanhetkellä t_i maa-aineksestä desorboituneen aineen massa (laskettu)	$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
Aikavälillä Δt_i maa-aineksestä desorboituneen aineen massa (laskettu)	$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				
Desorboitusprosentti						
Desorptio ajanhetkellä t_i	D_{t_i}	%				
Desorptio aikavälillä Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Näennäinen desorptiokerroin	K_{des}					

RM: Rinnakkaismenetelmä
SM: Sarjamenetelmä

C 19 MAA-AINEKSIIN JA VIEMÄRILLETTEeseen SOVELLETTAVAN ADSORPTIOKERTOIMEN (K_{oc}) MÄÄRITYS KORKEAN SUORITUSKYVYN NESTEKROMATOGRAFIALLA (HPLC)

1. MENETELMÄ

Tämä menetelmä on toisinto OECD:n testimenetelmästä TG 121 (2000).

1.1 JOHDANTO

Aineiden sorptiokäyttäytymistä maa-aineksiin ja viemäriletteeseen voidaan kuvata muuttujilla, jotka voidaan määrittää kokeellisesti testimenetelmällä C 18. Tärkeä muuttuja on adsorptiokerroin, joka on määritelmän mukaan aineen maa-aineksessa tai viemäriletteessä olevan konsentraation ja adsorptiotasapainossa vesifaasissa olevan konsentraation suhde. Maa-aineksen orgaanisen hiilen pitoisuuden suhteen normalisoitua adsorptiokerrointa K_{oc} voidaan käyttää osoittamaan kemiallisen aineen sitoutumiskykyä maa-aineksen tai viemäriletteen orgaaniseen ainekseen, jolloin eri kemikaaleja voidaan verrata. Tämä muuttuja voidaan arvioida vesiliukoisuuden ja n-oktanoli-vesijakautumiskertoimen suhteen tehtyjen korrelaatioiden avulla (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

Tässä testiohjeessa kuvatussa menetelmässä käytetään HPLC:tä adsorptiokertoimen K_{oc} määrittämiseksi maa-aineksessa ja viemäriletteessä (8). Estimaatit ovat luotettavampia kuin QSAR-laskelmista saadut (9). Estimointimenetelmänä tämä menetelmä ei kuitenkaan voi täysin korvata testimenetelmässä C 18 kuvattua erätasapainomenetelmää. Estimoitua K_{oc}-arvoa voidaan kuitenkin käyttää valittaessa testimuuttujia testimenetelmän C 18 mukaan tehtäviin adsorptio-desorptiokokeisiin laskemalla K_d (jakautumiskerroin) tai K_f (Freundlichin adsorptiokerroin) yhtälöstä 3 (jakso 1.2).

1.2 MÄÄRITELMÄT

K_d : Jakautumiskerroin: liuennun testiaineen tasapainokonsentraatioiden C suhde kaksifaasijärjestelmässä, joka koostuu sorbentista (maa-aines tai viemärilette) ja vesifaasista. Arvo on paljas luku, jos konsentraatiot on ilmaistu molemmassa faasissa painoyksiköissä. Jos vesifaasin konsentraatio ilmaistaan painoyksikköinä tilavuusyksikköä kohti, laatu on ml·g⁻¹. K_d voi vaihdella sorbentin ominaisuuksien mukaan, ja se voi olla konsentraatiosta riippuvainen.

$$K_d = \frac{C_{soil} \text{ tai } C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

jossa:

C_{soil} = testiaineen tasapainokonsentraatio maa-aineksessa (μg · g⁻¹)
C_{sludge} = testiaineen tasapainokonsentraatio viemäriletteessä (μg · g⁻¹)
C_{aq} = testiaineen tasapainokonsentraatio vesifaasissa (μg · g⁻¹, μg · ml⁻¹).

K_f : Freundlichin adsorptiokerroin: testiaineen konsentraatio maa-aineksessa tai viemärlietteessä (x/m), kun tasapainokonsentraatio vesifaasissa (C_{aq}) on yksi; laatu on $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ sorbenttia. Arvo voi vaihdella sorbentin ominaisuuksien mukaan.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

jossa:

x/m = sorbentin määrään m (g) adsorboituneen testiaineen määrä x (μg) tasapainotilassa

$1/n$ = Freundlichin adsorptioisotermikuvaajan kulmakerroin

C_{aq} = testiaineen tasapainokonsentraatio vesifaasissa ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)

$$\text{Kun } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc} : Sorbentin orgaanisen hiilen pitoisuuden (f_{oc}) suhteen normalisoitu aineen jakautumiskerroin (K_d) tai ainetta koskeva Freundlichin adsorptiokerroin (K_f). Erityisesti ionisoitumattomille kemikaaleille se osoittaa suunnilleen aineen ja sorbentin välisen adsorption määrän, ja sen avulla voidaan verrata eri kemikaaleja. K_d :n ja K_f :n laaduista riippuen K_{oc} voi olla laaduton tai sen laatu voi olla $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ tai $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ orgaanista ainetta.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \text{ (laaduton tai } \text{ml} \cdot \text{g}^{-1}\text{) tai } \frac{K_f}{f_{oc}} \text{ (}\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{)} \quad (3)$$

K_{oc} :n ja K_d :n suhde ei ole aina lineaarinen, ja siten K_{oc} -arvot voivat vaihdella maa-ainesten välillä, mutta vaihtelun määrä on paljon pienempi kuin K_d - tai K_f -arvojen vaihtelu.

Adsorptiokerroin (K_{oc}) johdetaan kapasiteettikertoimesta (k') käyttämällä kuvaajaa, jossa $\log k'$ esitetään $\log K_{oc}$:n funktiona valikoiduille vertailuyhdisteille.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

jossa:

t_R : testiaineen ja vertailuaineen HPLC-retentioaika (minuuttia)

t_0 : HPLC:n kuollut aika (minuuttia) (ks. jakso 1.8.2).

P_{ow} : Oktanoli-vesijakautumiskerroin: n-oktanoliin liukenevan ja veteen liukenevan aineen konsentraatioiden suhde, joka on laaduton suure.

$$P_{ow} = \frac{C_{ok \text{ tan oli}}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

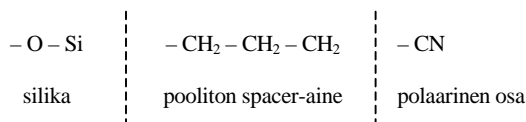
1.3 VERTAILUAINEET

Aineen rakennekaava, puhtaus ja hajoamisvakio (tarvittaessa) olisi tiedettävä ennen kuin menetelmää käytetään. Veteen ja orgaanisiin liuottimiin liukenemista, oktanoli-vesijakautumiskerrointa ja hydrolyysiominaisuuksia koskevat tiedot ovat hyödyllisiä.

Jotta mitatut HPLC-retentiotulokset voidaan korreloida aineen adsorptiokertoimen K_{oc} kanssa, on laadittava kalibroitikuvaaja, jossa $\log K_{oc}$ esitetään $\log k'$:n funktiona. Kuvaajassa on oltava vähintään kuusi referenssipistettä, joista vähintään yhden on oltava testiaineen odotetun arvon yläpuolella ja yhden sen alapuolella. Menetelmän tarkkuus paranee huomattavasti, jos vertailuaineet ovat rakenteeltaan testiaineen kaltaisia. Jos tällaisia tietoja ei ole saatavilla, käyttäjän on valittava sopivat kalibroitaineet. Siinä tapauksessa olisi valittava rakenteellisesti heterogeenisiä aineita. Käyttökelpoisia aineita ja K_{oc} -arvoja esitetään viemäriletteelle liitteen taulukossa 1 ja maa-aineksille taulukossa 3. Jos valitaan muita kalibroitaineita, ne on perusteltava.

1.4 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

HPLC tehdään analyttisillä pylväillä, jotka on pakattu kaupallisesti saatavilla lipofiilisiä ja polaarisia osia sisältävillä syanopropyylipohjaisilla kiinteillä faaseilla. Stationaarifaasina käytetään suhteellisen polaarista silikamatriisipohjaista ainetta:



Testimenetelmän periaate on samankaltainen kuin testimenetelmän A 8 (jakautumiskerroin, HPLC-menetelmä) periaate. Kun testiaine kulkee pylvään läpi liikkuvan faasin mukana, se reagoi stationaarifaasin kanssa. Koska testiaine jakautuu liikkuvaan ja stationaariseen faasiin, sen kulku hidastuu. Koska stationaarifaasissa on sekä polaarisia että poolittomia paikkoja, sekä molekyylin polaariset että poolittomat ryhmät voivat reagoida samalla tavalla kuin maa-aineksen tai viemäriletteen sisältämän orgaanisen aineksen kanssa. Tämän ansiosta voidaan määrittää pylvääseen liittyvän retentioajan ja orgaaniseen aineeseen tapahtuvan imeytymisen adsorptiokertoimen välinen suhde.

pH:lla on huomattava vaikutus sorptiokäyttäytymiseen erityisesti polaarilla aineilla. Maanviljelysmaa-aineksissa tai viemäri-vesien käsittelylaitosten tankeissa pH vaihtelee tavallisesti välillä 5.5–7.5. Ionisoituville aineille olisi tehtävä kaksi testiä sekä ionisoituneessa että ionittomassa muodossa sopivissa puskuriliuoksissa, mutta vain silloin, kun vähintään 10 % testiaineesta dissosioituu välillä pH 5.5–7.5.

Koska arviointiin käytetään vain HPLC-ylvästä koskevan retentioajan ja adsorptiokertoimen välistä suhdetta, kvantitatiivista määritysmenetelmää ei tarvita ja vain retentioajan määrittäminen on tarpeen. Jos on käytettävissä sopivia vertailuaineita ja koeolosuhteet ovat vakioituneet, tämä menetelmä on nopea ja tehokas keino arvioida adsorptiokerroin K_{oc} .

HPLC-menetelmä sopii sellaisille kemiallisille aineille (riippumatta siitä, onko niissä erityisiä merkkiaineita tai esim. radioaktiivista leimaa), joille on käytettävissä sopiva detektiomenetelmä (esim. spektrofotometrinen tai radioaktiivisen säteilyn mittalaite) ja jotka pysyvät riittävän stabiileina kokeen aikana. Menetelmä voi olla erityisen hyvä sellaisille aineille, joita on vaikea tutkia muunlaisissa koejärjestelyissä (ts. haihtuvat aineet tai aineet, jotka eivät liukene veteen sellaisessa pitoisuudessa, että se voidaan mitata tarkasti; aineet, joilla on suuri affiniteetti inkubaatiojärjestelmien pintaan). Menetelmää voidaan käyttää seoksille, joiden eluutiovyöhykkeet eivät eroitu toisistaan. Silloin olisi ilmoitettava testiseokseen sisältyvien yhdisteiden $\log K_{oc}$ -arvojen ylä- ja alarajat.

Epäpuhtaudet voivat joskus aiheuttaa ongelmia HPLC-tulosten tulkinnassa, mutta ne eivät juurikaan aiheuta ongelmia, jos testiaine voidaan tunnistaa analyttisesti ja erottaa epäpuhtauksista.

Menetelmä on validoitu liitteessä olevassa taulukossa 1 luetelluille aineille. Sitä sovellettiin myös useille muille kemikaaleille, jotka kuuluivat seuraaviin kemiallisiin luokkiin:

- aromaattiset amiinit (esim. trifluraliini, 4-kloorianiliini, 3,5-dinitroaniiliini, 4-metyylianiiliini, N-metyylianiiliini, 1-naftyyliamiini)
- aromaattiset karboksyylihappoesterit (esim. bentsoehappometyyliesteri, 3,5-dinitrobentsoehappometyyliesteri)
- aromaattiset hiilivedyt (esim. tolueeni, ksyleeni, etyylibentseeni, nitrobentseeni)
- aryylisifenoksi- ja propionihappoesterit (esim. diklofoppi-metyyli, fenoksiapropi-etyyli, fenoksiapropi-P-etyyli)
- bentsimidatsoli- ja imidatsolifungisidit (esim. karbendatsiimi, fuberidatsoli, triatsoksidi)
- karboksyylihappoamidit (esim. 2-klooribentsamidi, N,N-dimetylibentsamidi, 3,5-dinitrobentsamidi, N-metylibentsamidi, 2-nitrobentsamidi, 3-nitrobentsamidi)
- klooratut hiilivedyt (esim. endosulfaani, DDT, heksaklooribentseeni, kvintotseeni, 1,2,3-triklooribentseeni)
- orgaanisia fosforiyhdisteitä sisältävät torjunta-aineet (esim. atsinfossi-metyyli, disulfotoni, fenamifossi, isofenofossi, pyratsofossi, sulprofossi, triatsofossi)
- fenolit (esim. fenoli, 2-nitrofenoli, 4-nitrofenoli, pentakloorifenoli, 2,4,6-trikloorifenoli, 1-naftoli)
- fenyyliurea-johdannaiset (esim. isoproturoni, monolinuroni, pensykuroni)
- väriaineet (esim. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)
- polyaromaattiset hiilivedyt (esim. asenafteni, naftaleeni)
- 1,3,5-triatsiinia sisältävät kasvinsuojeluaineet (esim. prometryyni, propatsiini, simatsiini, terbutryyni)
- triatsolijohdannaiset (esim. tebukonatsoli, triadimefoni, tradimenoli, triapentenoli).

Menetelmä ei sovellu aineille, jotka reagoivat joko eluutin tai stationaarifaasin kanssa. Se ei myöskään sovellu aineille, jotka reagoivat spesifisellä tavalla epäorgaanisten yhdisteiden kanssa (jos esim. muodostuu klusterikomplekseja saven mineraalien kanssa). Menetelmä ei mahdollisesti sovellu myöskään pinta-aktiivisille aineille, epäorgaanisille yhdisteille eikä vahvoille tai melko vahvoille hapoille ja emäksille. Välillä 1.5–5.0 olevia $\log K_{oc}$ -arvoja voidaan määrittää. Ionisoituvat yhdisteet on määritettävä käyttäen puskuroitua liikkuvaa faasia, mutta on varottava, etteivät puskurin sisältämät aineet tai testiaine saostu.

1.6 LAATUVAATIMUKSET

1.6.1 Tarkkuus

Testiaineen adsorptiokerroin voidaan tavallisesti arvioida $\pm 0,5$ logaritmiyksikön tarkkuudella verrattuna erätasapainomenetelmällä määritettyyn arvoon (ks. liitteessä oleva taulukko 1). Suurempaan tarkkuuteen voidaan päästä, jos vertailuaineet ovat rakenteellisesti testiaineen kaltaisia.

1.6.2 Toistettavuus

Määitykset olisi tehtävä vähintään kaksoismäärytyksinä. Yksittäisistä mittauksista lasketut $\log K_{oc}$ -arvot eivät saisi erota toisistaan enemmän kuin 0.25 logaritmiyksikköä.

1.6.3 Uusittavuus

Menetelmää sovellettaessa saadut kokemukset tukevat käsitystä menetelmän validiteetista. Kun HPLC-menetelmää tutkittiin 48 aineella (enimmäkseen torjunta-aineita), joista oli saatavilla luotettavia maa-ainesten K_{oc} :tä koskevia tietoja, saatiin korrelaatiokertoimeksi $R = 0.95$ (10) (11).

Menetelmän parantamiseksi ja validoimiseksi tehtiin laboratorioden välinen vertailukoe, johon osallistui 11 laboratoriota (12). Tulokset esitetään liitteessä olevassa taulukossa 2.

1.7 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.7.1 Adsorptiokertoimen alustava määrittäminen

Oktanoli-vesijakautumiskerrointa P_{ow} (= K_{ow}) ja (jossain määrin) vesiliukoisuutta voidaan käyttää osoittamaan adsorption määrää erityisesti ionisoitumattomille yhdisteille, ja siten sen avulla voidaan alustavasti määrittää kyseeseen tuleva mitta-alue. Useille kemikaaliryhmille on julkaistu useita käyttökelpoisia korrelaatioita (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7).

1.7.2 Laitteet

Menetelmässä tarvitaan nestekromatografi, jossa on pulssittomasti toimiva pumppu ja sopiva detektori. On suositeltavaa käyttää injektioventtiiliä ja injektiosilmukkaa. Pylvään pakkausaineena on käytettävä kaupallista kemiallisesti sidottua silikapohjaista syaanopropyliihartsia. (esim. Hypersil ja Zorbax CN). Samaa ainetta oleva esipylväs voidaan liittää injektiojärjestelmän ja analyttisen pylvään väliin. Eri valmistajien pylväiden erotustehot voivat erota huomattavasti toisistaan. Ohjeellisesti pitäisi pyrkiä seuraavanlaisiin kapasiteettikertoimiin k' : $\log k' > 0.0$, kun $\log K_{oc} = 3.0$ ja $\log k' > -0.4$, kun $\log K_{oc} = 2.0$ käytettäessä metanoli/vesiseosta (55/45 %) liikkuvana faasina.

1.7.3 **Liikkuva faasi**

Useita liikkuvia faaseja on testattu, ja seuraavia kahta suositetaan:

- metanoli/vesi (55/45 % v/v)
- metanoli/0,01 M sitraattipuskuri, pH 6.0 (55/45 % v/v)

Eluutioliuksen valmistukseen on käytettävä HPLC-laatuista metanolia ja tislattua vettä tai sitraattipuskuria. Seoksesta poistetaan kaasut ennen käyttöä. Eluution pitäisi olla isokraattinen. Jos metanoli-vesiseokset eivät sovellu, voidaan kokeilla muita orgaanisen liuottimen ja veden seoksia, esim. etanoli-vesi- tai asetoni-triili-vesiseoksia. Ionisoituville yhdisteille suositetaan puskuriliuksen käyttöä pH:n pitämiseksi vakiona. Suolan saostumista ja pylvään suoritustehon heikentymistä on pyrittävä välttämään. Se voi tapahtua käytettäessä tiettyjä orgaanisia faaseja ja puskuriseoksia.

Mitään sellaisia lisäaineita kuten ioniparireagensseja ei saa käyttää, koska ne voivat vaikuttaa stationaarifaasin sorptio-ominaisuuksiin. Tällaiset stationaarifaasin muutokset voivat olla palautumattomia. Siksi kokeet, joissa käytetään lisäaineita, on ehdottomasti tehtävä eri pylväillä.

1.7.4 **Liuetut aineet**

Testi- ja vertailuaine olisi liuotettava liikkuvaan faasiin.

1.8 TESTIN SUORITUSTEHO

1.8.1 **Testiolosuhteet**

Lämpötila olisi rekisteröitävä mittausten aikana. Suositellaan, että käytetään termostoitua pylvästä, jotta voidaan varmistaa vakio-olosuhteet kalibrointimittausten ja alustavien ajojen sekä testiaineen määritysten aikana.

1.8.2 **Kuollut aika t_0**

Kuollut aika t_0 voidaan määrittää kahdella eri menetelmällä (ks. myös jakso 1.2).

1.8.2.1 *Kuolleen ajan t_0 määrittäminen homologisen sarjan avulla*

Tämän menetelmän on osoitettu antavan luotettavia ja vakioituja t_0 -arvoja. Menetelmä selostetaan yksityiskohtaisesti testimenetelmässä A.8: Partitiokerroin (n-oktanoli/vesi), HPLC-menetelmä.

1.8.2.2 *Kuolleen ajan t_0 määrittäminen inerteillä aineilla, jotka eivät tartu pylväeseen*

Tämä menetelmä perustuu formamidi-, urea- tai natriumitraattiliuosten injektioimiseen. Määritykset olisi tehtävä vähintään kaksoismäärityksinä.

1.8.3 Retentioaikojen t_R määrittäminen

Vertailuaineet olisi valittava kuten jaksossa 1.3 selostetaan. Ne voidaan injektoida seosstandardina retentioaikojen määrittämiseksi, mikäli on vahvistettu, että toisten vertailuaineiden läsnäolo ei vaikuta yksittäisten vertailuaineiden retentioaikoihin. Kalibrointi olisi tehtävä säännöllisin väliajoin vähintään kahdesti päivässä, jotta pylväiden mahdolliset suorituskyvyn muutokset voidaan selittää. Kalibrointiajot olisi tehtävä mieluiten ennen testiaineen injektioita ja niiden jälkeen, jotta voidaan varmistaa, etteivät retentioajat ole muuttuneet. Testiaineet injektoidaan erikseen mahdollisimman pieninä määrinä (pylvään ylikuormituksen estämiseksi), ja niiden retentioajat määritetään.

Määrittysten luotettavuuden lisäämiseksi olisi tehtävä vähintään kaksoismäärytykset. Yksittäisistä mittauksista lasketut $\log K_{oc}$ -arvot eivät saisi erota toisistaan enemmän kuin 0.25 logaritmiyksikköä.

1.8.4 Arviointi

Kapasiteetikertoimet k' lasketaan valittujen vertailuaineiden kuolleesta ajasta t_0 ja retentioajoista t_R yhtälön 4 avulla (ks. jakso 1.2). Laaditaan kuvaaja, jossa esitetään vertailuaineiden $\log k'$ -arvot erätasapainokokeesta saatujen, liitteen taulukoissa 1 ja 3 esitettyjen vertailuaineita koskevien $\log K_{oc}$ -arvojen funktiona. Testiaineen $\log K_{oc}$ -arvo määritetään sen $\log k'$ -arvon perusteella kyseisen kuvaajan avulla. Jos testiaineen $\log K_{oc}$ osoittautuu todellisten tulosten perusteella olevan kalibrointialueen ulkopuolella, testi olisi toistettava käyttäen sopivampia vertailuaineita.

2. MITTAUSTULOKSET JA TESTISELOSTEET

Testiselosteessa on esitettävä tai selostettava seuraavat asiat:

- testiaineiden ja vertailuaineiden tunnistetiedot ja niiden puhtaus sekä pK_a -arvot tarvittaessa
- laitteet ja toimintaolosuhteet, esim. analyttisen (ja esi-) pylvään tyyppi ja mitat, detektiomenetelmä, liikkuva faasi (ainesten suhteelliset osuudet ja pH), lämpötila-alue mittausten aikana
- kuollut aika ja sen määrittämiseen käytetty menetelmä
- pylvääseen injektoidujen testiaineiden ja vertailuaineiden määrät
- kalibrointiin käytettyjen vertailuaineiden retentioajat
- sovitettua regressiokuvaajaa ($\log k'$ vs $\log K_{oc}$) koskevat tiedot ja itse kuvaaja
- testatun yhdisteen keskimääräinen retentioaika ja estimoitu $d \log K_{oc}$ -arvo
- kromatogrammit.

3. **KIRJALLISUUSVIITTEET**

- 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, 1-67.
- 3) G.G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, 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.
- 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.

LIITE

Taulukko 1

Maa-ainesten ja viemäriletteiden K_{oc} -arvojen ja kartoittavan HPLC-menetelmän perusteella laskettujen arvojen vertailu

aine	CAS-nro	log K_{oc} viemäri- lietteet	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} maa- ainekset	log K_{oc} HPLC	Δ
Atratsiini	1912-24-9	1.66	2.14	0.48	1.81	2.20	0.39
Linuroni	330-55-2	2.43	2.96	0.53	2.59	2.89	0.30
Fentioni	55-38-9	3.75	3.58	0.17	3.31	3.40	0.09
Monuroni	150-68-5	1.46	2.21	0.75	1.99	2.26	0.27
Fenantreeni	85-01-8	4.35	3.72	0.63	4.09	3.52	0.57
Bentsoehappofenyyliesteri	93-99-2	3.26	3.03	0.23	2.87	2.94	0.07
Bentsamidi	55-21-0	1.60	1.00	0.60	1.26	1.25	0.01
4-Nitrobentsamidi	619-80-7	1.52	1.49	0.03	1.93	1.66	0.27
Asetanilidi	103-84-4	1.52	1.53	0.01	1.26	1.69	0.08
Aniliini	62-53-3	1.74	1.47	0.27	2.07	1.64	0.43
2,5-Dikloorianiliini	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.

Taulukko 2

Tulokset 11 laboratorion välisestä vertailusta, jonka tarkoituksena oli parantaa ja validoida HPLC-menetelmä¹

aine	CAS-nro	log K_{oc} [OECD 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[HPLC-method]	
Atratsiini	1912-24-9	1.81	78 ± 16	1.89
Monuroni	150-68-5	1.99	100 ± 8	2.00
Triapentenoli	77608-88-3	2.37	292 ± 58	2.47
Linuroni	330-55-2	2.59	465 ± 62	2.67
Fentioni	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.

Taulukko 3

Kartoittavaan HPLC-menetelmään suositellut vertailuaineet; tiedot perustuvat maa-ainesten adsorptiotuloksiin

Vertailuaine	CAS-nro	erätasapainosta saadut log K _{oc} -arvojen keskiarvot	K _{oc} -tulosten lukumäärä	log S.D.	lähde
Asetanilidi	103-84-4	1.25	4	0.48	a
Fenoli	108-95-2	1.32	4	0.70	a
2-Nitrobentsamidi	610-15-1	1.45	3	0.90	b
N,N-Dimetyyli-bentsamidi	611-74-5	1.52	2	0.45	a
4-Metyyli-bentsamidi	619-55-6	1.78	3	1.76	a
Metyyli-bentsoaatti	93-58-3	1.80	4	1.08	a
Atratsiini	1912-24-9	1.81	3	1.08	c
Isoproturon	34123-59-6	1.86	5	1.53	c
3-Nitrobentsamidi	645-09-0	1.95	3	1.31	b
Aniliini	62-53-3	2.07	4	1.73	a
3,5-Dinitrobentsamidi	121-81-3	2.31	3	1.27	b
Karbendatsiini	10605-21-7	2.35	3	1.37	c
Triadimenoli	55219-65-3	2.40	3	1.85	c
Triatsoksidi	72459-58-6	2.44	3	1.66	c
Triatsofossi	24017-47-8	2.55	3	1.78	c
Linuron	330-55-2	2.59	3	1.97	c
Naftaleeni	91-20-3	2.75	4	2.20	a
Endosulfaani-dioli	2157-19-9	3.02	5	2.29	c
Metiokarbi	2032-65-7	3.10	4	2.39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3.16	4	2.83	a
1,2,3-Triklooribentseeni	87-61-6	3.16	4	1.40	a
γ-HCH	58-89-9	3.23	5	2.94	a
Fentioni	55-38-9	3.31	3	2.49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3.43	4	2.68	a
Pyratsofossi	13457-18-6	3.65	3	2.70	c
α-Endosulfaani	959-98-8	4.09	5	3.74	c
Diklofoppi-metyyli	51338-27-3	4.20	3	3.77	c
Fenantreeni	85-01-8	4.09	4	3.83	a
Basic Blue 41 (seos)	26850-47-5 12270-13-2	4.89	4	4.46	a
DDT	50-29-3	5.63	1	–	b

- /a/ W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
- /b/ B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
- /c/ Data provided by industry.

C.20 LISÄÄNTYMISTESTI VESIKIRPULLA (*DAPHNIA MAGNA*)

1. MENETELMÄ

Tämä lisääntymismyrkkyllisyyden testimenetelmä on toisinto OECD:n testiohjeesta nro 211 (1998).

1.1 JOHDANTO

Testin pääasiallinen tarkoitus on määrittää kemikaalien vaikutus vesikirpun lisääntymistuotokseen.

1.2 MÄÄRITELMÄT JA YKSIKÖT

Emoeläimet: Naarasvesikirput, jotka ovat mukana testin alussa ja joiden lisääntymistuotos määritetään.

Jälkeläiset: Nuoret vesikirput, joita emoeläimet tuottavat testin aikana.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration): Pienin testipitoisuus, jolla aineen havaitaan aiheuttavan tilastollisesti merkittävän vaikutuksen (todennäköisyystasolla $p < 0,05$) lisääntymiseen ja emokuolleisuuteen kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla. Kaikilla LOEC:tä suuremmilla testipitoisuuksilla on kuitenkin oltava vähintään yhtä suuri haittavaikutus kuin LOEC-tasolla havaittu vaikutus. Jos nämä kaksi eivät täyty, on annettava täydellinen selitys siitä, miten LOEC (ja myös NOEC) on valittu.

NOEC (No Observed Effect Concentration): LOEC:tä pienempi testipitoisuus, jolla ei ole kontrolliin verrattuna tietyllä altistusajanjaksolla tilastollisesti merkittävää vaikutusta (todennäköisyystasolla $p < 0,05$).

EC_x: Veteen liuotetun testiaineen pitoisuus, joka aiheuttaa x prosentin laskun vesikirpun lisääntymisessä tietyllä altistusajanjaksolla.

Ominaiskasvu: Populaation kasvu, jossa yhdyntävät lisääntyminen ja ikäspesifinen kuolleisuus (20) (21) (22). Dynaamisessa tasapainossa olevassa populaatiossa ominaiskasvu on nolla. Suureneissa populaatioissa se on positiivinen ja pienenevissä negatiivinen. Negatiivinen arvo johtaa luonnollisesti lopulta populaation häviämiseen.

Osoittamisraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan osoittaa, mutta ei mitata kvantitatiivisesti.

Määrittämisraja: Pienin pitoisuus, joka voidaan mitata kvantitatiivisesti.

Kuolleisuus: Eläin katsotaan kuolleeksi, kun se ei liiku, ts. ei pysty uimaan tai sen raajoissa tai takaruumiissa ei havaita mitään liikettä sen jälkeen kun testiastiaa on ravisteltu varovasti 15 sekuntia. (Jos käytetään muuta määrittelmää, se on ilmoitettava testiselosteessa ja sille on annettava lähdeviite.)

1.3 TESTIMENETELMÄN PERIAATE

Nuoria naarasvesikirppuja (emot), joiden ikä on alle 24 tuntia testin alussa, altistetaan testiaineelle, jota on lisätty veteen useissa pitoisuuksissa. Testin kesto on 21 vuorokautta. Testin lopussa määritetään vielä testin lopussa elossa olevien emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärä. Tämä tarkoittaa sitä, että testin aikana kuolleiden aikuisten tuottamia poikasia ei sisällytetä tulokseen. Emojen lisääntymistuotos voidaan ilmaista muillakin tavoin (esim. elävien jälkeläisten määrä eläintä kohti päivässä siitä päivästä lähtien, jolloin jälkeläisiä havaittiin ensimmäisen kerran), mutta nämä pitäisi ilmoittaa testin lopussa elossa olevien emojen tuottamien elävien jälkeläisten kokonaismäärän lisäksi. Testiaineelle altistettujen eläinten lisääntymistuotosta verrataan kontrolli(e)n tuotokseen LOEC:n määrittämiseksi ja siten myös NOEC:n määrittämiseksi. Tuloksia analysoidaan lisäksi mahdollisuuksien mukaan regressiomenetelmällä sellaisen pitoisuuden arvioimiseksi, joka aiheuttaisi x prosentin laskun lisääntymistuotoksessa (ts. EC_{50} , EC_{20} tai EC_{10}).

Myös emojen eloonjääminen ja ensimmäisten sikiöiden tuottamisen ajankohta on ilmoitettava. Muita testiaineeseen liittyviä, esim. kasvuun (pituus) ja mahdollisesti lisääntymisen ominaisnopeuteen kohdistuvia vaikutuksia voidaan tutkia.

1.4 TESTIAINETTA KOSKEVAT TIEDOT

Vesikirpulla tehdyn välittömän myrkyllisyyden testin tulokset (ks. menetelmä C.2, osa I) pitäisi olla saatavilla. Tuloksesta voi olla hyötyä valittaessa lisääntymistestiin sopivaa testipitoisuusaluetta. Testiaineen vesiliukoisuuden ja höyrynpaineen pitäisi olla tiedossa, ja aineen määrittämiseksi testiliuksissa pitäisi olla käytettävissä luotettava analyttinen menetelmä, jonka avulla voidaan ilmoittaa myös saantoteho ja määritysraja.

Sellaisia tietoja, joista voi olla hyötyä testiolosuhteiden määrittelemisessä, ovat mm. rakennekaava, aineen puhtaus, stabiilisuus valossa, stabiilisuus testiolosuhteissa, pKa, P_{ow} ja helpon biohajoavuuden testin (ks. menetelmä C.4) tulokset.

1.5 TESTIN LUOTETTAVUUS

Jotta testi olisi luotettava, kontrolli(e)n pitäisi täyttää seuraavat kriteerit:

- emojen (naarasvesikirppujen) kuolleisuus on enintään 20 % testin lopussa
- testin lopussa elossa olevan emon tuottamia eläviä jälkeläisiä on keskimäärin vähintään 60.

1.6 TESTIMENETELMÄN KUVAUS

1.6.1 Laitteisto

Astioiden ja muiden laitteiden, jotka joutuvat kosketuksiin testiliuosten kanssa, on oltava kokonaan lasia tai muuta kemiallisesti inerttiä materiaalia. Testiastiat ovat tavallisesti lasisia dekanterilaseja.

Lisäksi tarvitaan joitakin tai kaikkia seuraavista laitteista:

- happimittari (joka on varustettu mikroelektrodilla tai muulla sopivalla laitteella, jolla voidaan mitata liuennut happi pienitilavuuksisissa näytteissä)
- asianmukaiset laitteet lämpötilan säätöön
- pH-mittari
- laitteet veden kovuuden mittamiseen
- laitteet veden orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuuden (TOC) mittaamiseen tai kemiallisen hapenkulutuksen (COD) mittaamiseen
- asianmukaiset laitteet valojärjestelmän ja valon intensiteetin säätöön.

1.6.2 Testiorganismi

Testissä olisi käytettävä *Daphnia magna* Straus -organismia. Muita vesikirppulajeja saa käyttää, jos ne täyttävät asianmukaiset vaatimukset (kontrollien lisääntymistuottavuutta koskevat vaatimukset pitäisi olla ominaisen kyseiselle vesikirppulajille). Jos käytetään muita vesikirppulajeja, niiden täytyy olla selvästi tunnistettuja ja niiden käytön perusteltua.

Kloonin olisi mieluiten tunnistettava genotyypin määrityksellä. Tutkimuksissa (1) on osoitettu, että kloonin A (joka on peräisin IRCHA:sta Ranskasta) (3) lisääntymistuottavuus täyttää jatkuvasti vaatimuksen, jonka mukaan tässä menetelmässä kuvatuissa olosuhteissa tuotto on keskimäärin vähintään 60 jälkeläistä kutakin elävää emoa kohti. Muutkin kloonit ovat kuitenkin hyväksyttäviä, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

Testin alussa eläinten on oltava alle 24 tunnin ikäisiä, eivätkä ne saa olla ensimmäistä sikiösarjaa. Niiden olisi oltava peräisin terveestä varastokannasta (ts. niissä ei saa näkyä merkkejä stressistä kuten korkeaa kuolleisuutta, koiraita ja lepomunia, viivästymistä ensimmäisten sikiöiden tuottamisessa, värihäiriöisiä eläimiä jne.). Varastokannan eläimiä on pidettävä samanlaisissa viljelyoloissa (valo, lämpötila, viljelyneeste, ravinto ja eläinten määrä tilavuusyksikköä kohti) kuin testissä käytettäviä. Jos testissä käytettävä viljelyneeste eroaa vesikirppun viljelyssä normaalisti käytetystä viljelyneesteestä, on hyvä noudattaa käytäntöä, että eläimet totutetaan viljelyoloihin ennen testiä noin kolmen viikon ajan (ts. yhden sukupolven ajan), jotta emojen stressaantuminen vältettäisiin.

1.6.3 Testissä käytettävä viljelyneeste

Testiin suositellaan täysin määriteltyä viljelyneestettä. Siten voidaan välttää sellaisten lisäaineiden (esim. levät, maaperäaite) käyttö, joiden ominaisuuksia ei voida hallita täydellisesti, ja parannetaan siten mahdollisuuksia laboratorioden väliseen vakiointiin. Elendtin M4- (4) ja M7 -viljelyneesteet (ks. Liite 1) on todettu sopiviksi tähän tarkoitukseen. Muitakin viljelyneesteitä (esim. (5) (6)) voidaan käyttää, jos vesikirppuviljelmän osoitetaan täyttävän testiä koskevan validiteettiperusteen.

Jos käytetään viljelyneestettä, jossa on kemiallisesti määrittelemättömiä lisäaineita, lisäaineet on spesifioitava selvästi ja testiselosteessa on annettava tietoa niiden koostumuksesta, erityisesti hiilipitoisuudesta, koska se voi vaikuttaa annettavaan ravintoon. Suositellaan, että orgaanisen lisäaineen varastoalmisteen orgaanisiin yhdisteisiin sitoutuneen hiilen kokonaispitoisuus (TOC) ja/tai kemiallinen hapenkulutus (COD) määritetään ja valmisteen vaikutus testissä käytettävän viljelyneesteen TOC- ja/tai COD-arvoihin arvioidaan. Viljelyneesteen TOC-tason olisi oltava (ennen levien lisäämistä) alle 2 mg/l (7).

Kun testataan metalleja sisältäviä aineita, on tärkeää ottaa huomioon, että testissä käytettävän viljelyneesteen ominaisuudet (esim. kovuus, kelaatiokyky) voivat vaikuttaa testiaineen myrkyllisyyteen. Tästä syystä on toivottavaa käyttää kemiallisesti määriteltyä viljelyneestettä. Tällä hetkellä kuitenkin ainoat kemiallisesti määritellyt viljelyneesteet, joiden tiedetään sopivan *Daphnia magnan* pitkäaikaiseen viljelyyn, ovat Elendtin M4 ja M7. Molemmissa viljelyneesteissä on kelatoivaa ainetta EDTA. On osoitettu (2), että kadmiumin "näennäinen myrkyllisyys" on yleensä pienempi, kun testi tehdään M4- ja M7-viljelyneesteessä kuin nesteessä, joka ei sisällä EDTA:a. M4- ja M7-viljelyneesteitä ei siksi suositella metalleja sisältävien aineiden testaukseen, ja myös muita viljelyneesteitä, joissa on tunnettuja kelatoivia aineita, olisi vältettävä. Metalleja sisältäville aineille voi olla suositeltavaa käyttää jotain muuta viljelyneestettä, esimerkiksi ASTM:n rekonstituoitua kovaa makeaa vettä (7), joka ei sisällä EDTA:a ja johon on lisätty leväaitea (8). Tämä ASTM:n kovan makean veden ja leväaiteen yhdistelmä sopii myös vesikirppun pitkäaikaiseen viljelyyn ja testaukseen (2), vaikka sillä on vielä lievä kelatoiva vaikutus, joka johtuu lisätyn leväaiteen orgaanisista aineista.

Testin alussa ja sen aikana liuennan hapen pitoisuuden olisi oltava yli 3 mg/l. pH:n olisi oltava välillä 6–9, eikä se saisi yleensä vaihdella enemmän kuin 1,5 yksikköä testin aikana. Kovuudeksi suositellaan yli 140 mg/l (ilmaistuna CaCO₃:na). Tällä ja suuremmalla pitoisuudella tehdyissä testeissä on osoitettu validiteettiperusteiden mukaista lisääntymistuottavuutta (9) (10).

1.6.4 Testiliuokset

Halutun pitoiset testiliuokset valmistetaan yleensä laimentamalla varastoliuosta. Varastoliuokset olisi mieluiten tehtävä liuottamalla aine testissä käytettävään viljelyneesteeseen.

Orgaanisia liuottimia tai dispergointiaineita voidaan tarvita joissakin tapauksissa sopivan väkevyisen varastoliuoksen valmistamiseksi, mutta tällaisten aineiden käyttöä olisi vältettävä. Sopivia liuottimia ovat esim. asetoni, etanoli, metanoli, dimetyyliformamidi ja trietyleeniglykoli. Sopivia dispergointiaineita ovat esim. Cremophor RH40, 0,01-prosenttinen metyyliiselluloosa ja HCO-40. Missään tapauksessa testiaineen pitoisuus testiliuoksissa ei saa ylittää aineen liukoisuusrajaa testissä käytettävässä viljelyneesteessä.

Liuottimia käytetään sellaisen varastoliuoksen valmistamiseksi, joka voidaan annostella veteen tarkasti. Edellä mainitut liuottimet eivät ole myrkyllisiä eivätkä lisää aineen vesiliukoisuutta siinä pitoisuudessa, jota liuottimelle suositellaan lopullisessa testissä käytettävässä viljelyneesteessä (ts. $\leq 0,1$ ml/l).

Dispergointiaineet voivat helpottaa tarkkaa annostelua ja dispergointia. Edellä mainitut dispergointiaineet eivät ole myrkyllisiä eivätkä lisää aineen vesiliukoisuutta siinä pitoisuudessa, jota dispergointiaineelle suositellaan lopullisessa testissä käytettävässä viljelyneesteessä (ts. $\leq 0,1$ ml/l).

1.7 TESTIN SUUNNITTELU

Testiaineet jaetaan testiastioihin, joita on tämän jälkeen käsiteltävä satunnaistetusti. Jollei satunnaisteta, saattaa tästä johtua systemaattinen virhe, joka voidaan tulkita pitoisuudesta aiheutuvaksi vaikutukseksi. Erityisesti jos koeastioita käsitellään annostelu- tai pitoisuusjärjestyksessä, saattaa jokin aikaan liittyvä tekijä, kuten työntekijän väsymys tai muu virhe, aiheuttaa voimakkaampia vaikutuksia suuremmilla pitoisuuksilla. Jos lisäksi olosuhteet testin alussa tai ympäristöolosuhteet, kuten sijoituspaikka laboratoriossa, saattavat vaikuttaa testituloksiin, olisi harkittava testin eristämistä.

1.8 TESTIN SUORITUS

1.8.1 Altistumisolosuhteet

1.8.1.1 Testin kesto

Testin kesto on 21 vuorokautta.

1.8.1.2 Vesikirppujen määrä testiastiassa

Emoja pidetään testiastiassa yksi eläin astiaa kohti. Astiaan pannaan 50 – 100 ml viljelyneestettä.

Suurempi tilavuus voi olla joskus tarpeen testiaineen pitoisuuden määrittämiseen käytettävän analyttisen menetelmän vaatimusten vuoksi, vaikka rinnakkaisnäytteet voidaan myös yhdistää kemiallista analyysiä varten. Jos tilavuus on yli 100 ml, vesikirpulle annettavaa annosta on ehkä suurennettava, jotta varmistetaan ravinnon riittävyys ja validiteettiperusteiden noudattaminen. Läpivirtaustesteille voidaan harkita muunlaisia suoritustapoja teknisistä syistä (esimerkiksi neljä 10 vesikirpun ryhmää suuressa testitilavuudessa), mutta kaikki muutokset testin suunnittelussa on kirjattava.

1.8.1.3 *Eläinten lukumäärä*

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä on oltava vähintään 10 yksittäin kasvatettua vesikirppua kutakin testipitoisuutta kohti ja vähintään 10 yksittäin pidettyä vesikirppua kontrollisarjassa.

Läpivirtaustesteissä 40 vesikirppua neljään 10 vesikirpun ryhmään jaettuna on osoittautunut sopivaksi (1). Pienempääkin määrää eläimiä voi käyttää. Suositellaan vähintään 20 vesikirppua pitoisuutta kohti jaettuna kahdeksi tai useammaksi yhtä monta vesikirppua käsittäväksi rinnakkaisnäytteeksi (esim. neljä rinnakkaista, joista kussakin viisi vesikirppua). On huomattava, että jos vesikirppuja kasvatetaan ryhminä, lisääntymistuotosta ei voi ilmaista elävien jälkeläisten kokonaismääränä testin lopussa elossa olevia emoja kohti, jos emoja kuolee. Tällöin lisääntymistuotos olisi ilmaistava elävien jälkeläisten kokonaismääränä testin alussa mukana olevia emoja kohti.

1.8.1.4 *Ruokkiminen*

Puolistaattisissa oloissa tehtävässä testissä vesikirppuja olisi ruokittava mieluiten joka päivä mutta ainakin kolmesti viikossa (ts. silloin kun viljelyneeste vaihdetaan). Jos tästä poiketaan (esim. läpivirtaustesteissä), siitä olisi ilmoitettava.

Testin aikana emojen ruokavalion pitäisi koostua mieluiten seuraavien lajien (yhden tai useamman) elävistä levistä: *Chlorella* sp, *Selenastrum capricornutum* (nykyisin *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) ja *Scenedesmus subspicatus*. Ruokavalion pitäisi perustua siihen orgaanisen hiilen (C) määrään, joka on annettava kullekin emolle. Tutkimuksissa (12) on osoitettu, että annokset 0,1–0,2 mg C/vesikirppu/vrk riittävät vesikirpulle siihen, että jälkeläisiä saadaan riittävä määrä, jotta testin validiteettiperusteet täyttyvät. Ravintoannos voidaan annostella joko vakionopeudella koko testin ajan tai haluttaessa voidaan alussa käyttää alhaisempaa nopeutta, jota lisätään testin aikana emojen kasvun huomioon ottamiseksi. Tällöinkin annoksen on pysyttävä samana suositellulla alueella 0,1–0,2 mg C/vesikirppu/vuorokausi koko testin ajan.

Jos käytetään muita menetelmiä (kuten leväsolujen määrää tai valon absorptiota) vaaditun ravintoannoksen määrittämiseksi esimerkiksi siksi, että hiilipitoisuuden määrittäminen on aikaa vievää, laboratorioden on laadittava omat nomogramminsa, josta saadaan leväviljelmän hiilipitoisuus (ks. Liite 2, ohjeet nomogrammien laatimiseksi). Nomogrammit olisi tarkistettava vähintään kerran vuodessa ja useamminkin, jos levien viljelyolosuhteet muuttuvat. On havaittu että valon absorptio on parempi menetelmä hiilipitoisuuden määrittämiseksi kuin solumäärä (13).

Vesikirpulle olisi annettava ravinnoksi konsentroitua leväsuspeniota, jotta testiastioihin lisätyn leväviljelyneesteen tilavuus olisi mahdollisimman pieni. Leviä voidaan konsentroida sentrifugoimalla, jonka jälkeen ne suspendoidaan uudelleen veteen, deionisoituun veteen tai vesikirpun viljelyneesteseen.

1.8.1.5 *Valo*

16 tuntia valoa, jonka intensiteetti on enintään $15\text{--}20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6 *Lämpötila*

Testissä käytettävän viljelyneesteen lämpötilan on oltava 18–22°C. Lämpötila ei saisi kuitenkaan, jos mahdollista, vaihdella missään testissä enempää kuin 2°C kyseisissä rajoissa (esim. 18–20, 19–21 tai 20–22°C). Lämpötilan seuraamista varten voi olla tarpeen lisätä yksi testiastia.

1.8.1.7 *Ilmastus*

Testiastioita ei saa ilmastaa testin aikana.

1.8.2 Testipitoisuudet

Kokeessa pitäisi olla yleensä vähintään viisi testipitoisuutta geometrisessa sarjassa, eikä kerroin saisi olla suurempi kuin 3,2. Kutakin pitoisuutta kohti olisi käytettävä asianmukaista rinnakkaisnäytteiden määrää. (ks. kohta 1.8.1.3). Jos pitoisuuksien määrä on vähemmän kuin viisi, se on perusteltava. Aineita ei saisi testata niiden liukoisuusrajaa suuremmassa pitoisuudessa.

Pitoisuusalueen valinnassa on otettava huomioon seuraavat seikat:

- i. Jos tarkoitus on määrittää LOEC/NOEC, pienimmän testipitoisuuden on oltava niin pieni, ettei hedelmällisyys tällä pitoisuudella ole merkitsevästi pienempi kuin kontrollilla. Mikäli näin ei ole, testi on toistettava vielä pienemmällä pitoisuudella.
- ii. Jos tarkoitus on määrittää LOEC/NOEC, suurimman testipitoisuuden on oltava niin suuri, että hedelmällisyys tällä pitoisuudella on merkitsevästi pienempi kuin kontrolleilla. Mikäli näin ei ole, testi on toistettava suuremmalla pitoisuudella.
- iii. Jos arvioidaan EC_x lisääntymisvaikutuksille, suositellaan, että käytetään niin suurta määrää pitoisuuksia, että EC_x voidaan määrittää asianmukaisella luotettavuustasolla. Jos arvioidaan EC_{50} lisääntymisvaikutuksille, suositellaan, että suurin testipitoisuus on suurempi kuin kyseinen EC_{50} . Muuten EC_{50} :n luottamusväli on kovin suuri ja voi olla mahdotonta arvioida tyydyttävästi sovitettun mallin asianmukaisuutta, vaikka onkin mahdollista arvioida EC_{50} .
- iv. Testipitoisuuden joukossa ei saisi olla sellaista pitoisuutta, jolla olisi tilastollisesti merkitsevä vaikutus täysikasvuisten eläinten eloonjäämiseen, koska testi ei silloin olisi enää pelkästään lisääntymisestä, vaan yhdistetty lisääntymis- ja kuolleisuustesti, joka vaatisi paljon monimutkaisempaa tilastollista analyysiä.

Aikaisemmat tiedot testiaineen myrkyllisyydestä (esim. välittömän myrkyllisyyden testistä ja/tai alustavista pitoisuuskartoitustesteistä saadut tiedot) auttavat sopivien testipitoisuuksien valitsemisessa.

Jos testiliuosten valmistuksessa käytetään liuottimia tai dispergointiaineita (ks. kohta 1.6.4), niiden lopullinen pitoisuus testiastioissa saisi olla enintään 0,1 ml/l, ja sen olisi oltava sama kaikissa testiastioissa.

1.8.3 Kontrollit

Testisarjan lisäksi on määritettävä yksi viljelynestettä sisältävä kontrollisarja ja tapauksen mukaan yksi kontrollisarja, joka sisältää liuotinta tai dispergointiainetta. Mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen pitoisuuden olisi oltava sama kuin testiainetta sisältävissä testiastioissa. Riittävä määrä rinnakkaisnäytteitä olisi määritettävä (ks. kohta 1.8.1.3).

Yleensä hyvin suoritettussa testissä kontrollinäytteiden emojen tuottamien elävien jälkeläisten määrän keskiarvon vaihtelukerroin saisi olla enintään 25 %, ja tämä olisi ilmoitettava testeille, joissa käytetään yksittäin kasvatettuja eläimiä.

1.8.4 Testissä käytettävän viljelynesteen vaihto

Viljelynesteen vaihtoväli riippuu testiaineen stabiilisuudesta, mutta viljelyneste pitäisi vaihtaa vähintään kolme kertaa viikossa. Jos testiainepitoisuus alustavien testien perusteella (ks. kohta 1.4) ei ole stabiili (ts. ei ole välillä 80–120 % nimellispitoisuudesta tai laskee alle 80 prosentin mitatusta alkupitoisuudesta) pisimmän hyväksytyyn vaihtovälin aikana (ts. 3 vrk), olisi harkittava viljelynesteen vaihtamista useammin tai siirtymistä läpivirtaustestiin.

Kun viljelyneste vaihdetaan puolistaattisessa testissä, valmistetaan toinen sarja testiastioita ja emovesikirpuit siirretään niihin esim. sopivan kokoisella lasipetillä. Vesikirpuit kanssa siirrettävän viljelynesteen tilavuuden pitäisi olla mahdollisimman pieni.

1.8.5 **Havainnot**

Testin aikana tehtyjen havaintojen tulokset olisi kirjattava testilomakkeille (ks. Liite 3 ja 4). Jos on tehtävä muita mittauksia (ks. 1.3 ja 1.8.8), on ehkä tehtävä lisähavaintoja.

1.8.6 **Jälkeläiset**

Kunkin emon tuottamat jälkeläiset olisi mieluiten otettava astiasta ja laskettava päivittäin ensimmäisistä jälkeläisistä lähtien, jotta ne eivät söisi aikuisille tarkoitettua ravintoa. Tässä testissä tarvitsee laskea vain elävät jälkeläiset, mutta kuolleiden munien tai poikasten esiintyminen olisi kirjattava.

1.8.7 **Kuolleisuus**

Emojen kuolleisuus olisi kirjattava mieluiten päivittäin tai ainakin silloin, kun poikaset lasketaan.

1.8.8 **Muut muuttajat**

Vaikka tämän menetelmän pääasiallisena tarkoituksena on lisääntymisvaikutusten arviointi, on mahdollista, että muitakin vaikutuksia esiintyy siinä määrin, että ne voidaan analysoida tilastollisesti. Kasvumittaukset ovat hyvin toivottavia, koska niistä saa mahdollisia subletaaleja vaikutuksia koskevia tietoja, jotka voivat olla hyödyllisempiä kuin pelkästään lisääntymisen määrittäminen. Emokalojen pituuden (ts. pituus ilman pyrstörankaa) mittausta testin lopussa suositellaan. Muita muuttujia, jotka voidaan mitata tai laskea, ovat esim. emon ikä ensimmäisten (ja myöhempien) jälkeläisten syntyessä, jälkeläisten lukumäärä ja koko, ennenaikaisesti syntyneiden jälkeläisten määrä, koiraiden tai lepomunien sekä populaation ominaiskasvunopeus.

1.8.9 **Analyttisten määritysten ja mittausten taajuus**

Happitoisuus, lämpötila, veden kovuus ja pH olisi mitattava vähintään kerran viikossa sekä tuoreesta että vanhasta viljelynesteenestestä, kontroll(i)ista ja testistä, jossa on suurin testiaineen pitoisuus.

Testin aikana testiaineen pitoisuus määritetään säännöllisin väliajoin.

Suosittelaa, että puolistaattisissa testeissä, joissa testiaineen pitoisuuden odotetaan pysyvän ± 20 prosentissa (ts. välillä 80–120 %) nimellispitoisuudesta (ks. kohta 1.4 ja 1.8.4), suurimmat ja pienimmät testissä käytetyt pitoisuudet määritetään tuoreista testiliuoksista ja viljelynestettä vaihdettaessa kerran ensimmäisen testiviikon aikana (ts. määrittäminen olisi tehtävä samasta liuoksesta, kun se on tuore ja kun se vaihdetaan). Nämä määrittäykset olisi tehtävä tämän jälkeen uudelleen vähintään viikon välein.

Testeissä, joissa testiaineen pitoisuuden ei odoteta pysyvän ± 20 prosentissa nimellisarvosta, on välttämätöntä määrittää testipitoisuudet sekä tuoreesta liuoksesta että liuosta vaihdettaessa. Kuitenkin jos mitattu testiaineen alkupitoisuus ei ole ± 20 prosentissa nimellisarvosta, mutta jos on riittävästi näyttöä siitä, että alkupitoisuudet ovat toistettavia ja stabiileja (ts. välillä 80–120 % alkupitoisuudesta), viikolla 2 ja 3 voitaisiin määrittää vain suurin ja pienin testipitoisuus. Joka tapauksessa testiaineen pitoisuus tarvitsee määrittää liuosta vaihdettaessa vain yhdestä rinnakkaisnäytteestä kullekin pitoisuudelle.

Jos kyseessä on läpivirtaustesti, samanlainen näytteenotto-ohjelma on sopiva kuin puolistaattisissa testeissä (vaikka "vanhasta" liuksesta ei tehdä määrittystä). Voi kuitenkin olla suositeltavaa lisätä näytteenottoajankohtia ensimmäisen viikon aikana (esim. kolme määrittysarjaa) sen varmistamiseksi, että testipitoisuudet ovat pysyneet muuttumattomina. Tällaisissa testeissä laimentimen ja testiaineen virtausnopeus on tarkistettava päivittäin.

Jos on näyttöä siitä, että testattavan aineen pitoisuus on pysynyt tyydyttävällä tavalla ± 20 prosentissa nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta koko testin ajan, tulokset voivat perustua nimellispitoisuuksiin tai alkupitoisuuksiin. Jos poikkeama nimellispitoisuudesta tai alkupitoisuudesta on suurempi kuin ± 20 %, tulokset olisi ilmaistava aikapainotettuina keskiarvoina (ks. Liite 5).

2. MÄÄRITYSTULOKSET JA TULOSTEN ILMOITTAMINEN

2.1 TULOSTEN KÄSITTELY

Tämän testin tarkoituksena on määrittää testiaineen vaikutus elävien jälkeläisten kokonaismäärään testin lopussa elossa olevien emojen määrää kohti. Elävien jälkeläisten kokonaismäärä emojen määrää kohti olisi laskettava jokaiselle testiastialle (ts. rinnakkaisnäytteille). Jos jossakin rinnakkaisnäytteessä emo kuolee testin aikana tai osoittautuu koiraaksi, kyseinen rinnakkaisnäyte jätetään testin ulkopuolelle. Analyysi perustuu silloin pienempään määrään rinnakkaisnäytteitä.

Kun selvitetäessä kemikaalin vaikutuksia lisääntymistuotokseen määritetään LOEC ja siitä NOEC, on laskettava kaikkien rinnakkaisnäytteiden keskimääräinen lisääntymistuotos kullekin pitoisuudelle ja painotettu jäännösvakiopoikkeama. Tämä voidaan tehdä varianssianalyysillä (ANOVA). Kunkin pitoisuuden keskiarvoa on tämän jälkeen verrattava kontrollien keskiarvoon käyttämällä sopivaa vertailumenetelmää. Dunnettin tai Williamsin testit voivat olla hyödyllisiä (14)(15)(16)(17). On myös tarkistettava, pitääkö ANOVAN oletamus varianssin homogeenisuudesta paikkansa. Suositellaan, että tämä tehdään graafisesti mieluummin kuin formaalilla merkitsevyydestillä (18); sopiva vaihtoehto on Bartlettin testi. Jos oletus ei pidä paikkaansa, on harkittava tulostietojen muuntamista varianssin tasoittamiseksi ennen ANOVAA tai painotetun ANOVAN tekemistä. ANOVALLA määritetty havaittavan vaikutuksen suuruus (ts. pienin merkitsevä ero) olisi laskettava ja ilmoitettava.

Sellaisen pitoisuuden arvioimiseksi, joka aiheuttaisi 50 prosentin pienenemisen lisääntymistuotoksessa (ts. EC_{50}), tulostietoihin olisi sovitettava jokin sopiva käyrä, kuten logistinen käyrä, käyttämällä jotakin tilastomenetelmää, kuten pienimmän neliösumman menetelmää. Käyrään voitaisiin valita sellaiset muuttujat, että EC_{50} ja sen keskivirhe voidaan määrittää käyrästä suoraan. Tämä helpottaisi suuresti EC_{50} :n luottamusrajojen laskemista. Ellei ole erityisiä syitä käyttää erilaisia luottamusrajoja, kaksipuolinen 95 prosentin raja olisi ilmoitettava. Sovitusmenetelmän pitäisi mielellään olla sellainen, että voidaan arvioida sovituksen onnistumisen (tai sen puutteen) merkitsevyys. Tämä voidaan tehdä graafisesti tai jakamalla jäännösneliösumma sovituksen onnistumista ja puhdasta virhettä koskeviin komponentteihin ja tekemällä merkitsevyydesti sovituksen onnistumiselle. Koska korkeaan hedelmällisyyteen johtavilla käsittelyillä on todennäköisesti suurempi tuotettujen nuorten yksilöiden määrän varianssi kuin alhaiseen hedelmällisyyteen johtavilla käsittelyillä, olisi harkittava havaittujen arvojen painottamista siten, että ne heijastaisivat eri käsittelyryhmien erilaisia variansseja (ks. taustatietoa viitteessä 18).

Lopullisen rengastestin (2) tulostietoja analysoitaessa niihin sovitettiin logistinen käyrä käyttämällä seuraavaa mallia, vaikka muitakin sopivia malleja voi käyttää:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

jossa:

Y: nuorten eläinten kokonaismäärä testin lopussa elossa olevaa aikuista eläintä kohti (laskettu kullekin testiastialle)

x: testiaineen pitoisuus

c : nuorten eläinten oletettu määrä, kun $x = 0$

x_0 : populaation EC_{50} -arvo

b : kulmakertoimen laskemisessa käytetty muuttuja

Tämä malli sopii todennäköisesti moniin tapauksiin, mutta kaikkiin testeihin se ei ehkä sovi. Mallin validiteetti olisi tarkistettava, kuten edellä on mainittu. Joissakin tapauksissa sopiva malli voi olla sellainen, jossa pienet pitoisuudet aiheuttavat huomattavia vaikutuksia(19).

Muita vaikutuksiin liittyviä pitoisuuksia, kuten EC_{10} tai EC_{20} , voidaan myös arvioida, vaikka voi olla parempi käyttää mallissa erilaisia muuttujia kuin EC_{50} :n arvioimiseksi käytettyjä.

2.2 TESTISELOSTE

Testiselosteessa on annettava seuraavat tiedot:

2.2.1 Testiaine

- fysikaalinen olomuoto ja fysikokemialliset ominaisuudet, jos niillä on merkitystä
- kemialliset tunnistetiedot, mukaan lukien puhtaus

2.2.2 Koelajit

- kyseessä oleva klonni (onko genotyyppi määritetty), hankintapaikka tai alkuperä (jos se tunnetaan) sekä käytetyt viljelyolosuhteet. Jos käytetään muuta lajia kuin *Daphnia magna*, se on perusteltava ja ilmoitettava.

2.2.3 Koeolosuhteet:

- käytetty testimenetelmä (esim. puolistaattinen tai läpivirtausmenetelmä, vesikirppujen lukumäärä litrassa kokeen alussa)
- valoisa aika ja valon intensiteetti
- testin suunnittelu (esim. rinnakkaisnäytteiden määrä, emojen määrä rinnakkaisnäytettä kohti)
- käytetty viljelynesteen yksityiskohtaisesti
- mahdollisesti käytetyn orgaanisen aineen koostumus, alkuperä, valmistusmenetelmä, varastovalmisteiden TOC/COD, testissä käytetyn viljelynesteen TOC/COD:n arviointi
- yksityiskohtaiset ruokintaa koskevat tiedot, mukaan lukien määrä (mg C/vesikirppu/vrk) ja esim. rehu(je)n tyyppi, myös mahdollisten levien spesifiset nimet (lajit) ja kanta, jos ne tunnetaan sekä viljelyolosuhteet
- varastoliuosten valmistusmenetelmä ja viljelynesteen vaihtotaajuus (mahdollisen liuottimen tai dispergointiaineen nimi ja pitoisuus on ilmoitettava)

2.2.4

Tulokset:

- mahdollisista alustavista testiaineen stabiilisuutta koskevista kokeista saadut tulokset
- nimelliset testipitoisuudet ja kaikkien analyysien tulokset, joissa on määritetty testiaineen pitoisuus testiastiassa (ks. esimerkiksi annetut tuloslomakkeet, Liite 4); myös menetelmän saantoteho ja määritysraja olisi ilmoitettava
- testiastioissa käytetyn veden laatu (ts. pH, lämpötila ja liuenneen hapen pitoisuus sekä tarvittaessa TOC ja/tai COD ja veden kovuus) (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, Liite 3)
- täydelliset kirjaustiedot kunkin emon elävistä jälkeläisistä (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, Liite 3)
- emojen kuolemantapausten lukumäärä ja päivämäärät (ks. esimerkiksi annettu tuloslomake, Liite 3)
- kontrollihedelmällisyyden vaihtelukerroin (joka perustuu elävien jälkeläisten kokonaismäärään testin lopussa elossa olevaa emoa kohti)
- kuvaaja, josta käy ilmi elävien jälkeläisten kokonaismäärä testin lopussa elossa olevaa emoa kohti (kullekin rinnakkaisnäytteelle) testiaineen pitoisuuden funktiona
- LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) lisääntymiselle; käytettyjen tilastomenetelmien kuvaus; maininta siitä, minkä kokoinen vaikutus voitiin osoittaa; NOEC (No Observed Effect Concentration) lisääntymiselle tarvittaessa; tapauksen mukaan myös LOEC/NOEC emojen kuolleisuudelle olisi ilmoitettava
- tarvittaessa EC_x lisääntymiselle, luottamusvälit, sen laskemiseen käytetyn sovitetun mallin graafinen kuvaaja, annos–vastekäyrän kulmakerroin ja sen keskivirhe
- muut havaitut biologiset vaikutukset tai muut mittaukset: ilmoitetaan kaikki mahdolliset havaitut tai mitatut biologiset vaikutukset (esim. emojen kasvu) sekä kaikki asianmukaiset perustelut
- selitykset testimenetelmästä poikkeamiseen.

3.

LÄHDELUETTELO

- 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. (Forth 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 pp.

- 8) Baird D.J., Soares A.M.V.M., Girling A., Barber J., Bradley M.C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.
- 9) Parkhurst B.R., Forte J.L. and Wright G.P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, 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.
- 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, p 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.

LIITE 1**KEMIALLISESTI MÄÄRITELTYJEN ELENDT M7- JA M4-VILJELYNESTEIDEN VALMISTUS****Totuttaminen Elendt M7- ja M4-viljelyneesteeseen**

Joissakin laboratorioissa on ollut vaikeuksia, kun ne ovat siirtäneet vesikirput suoraan M4- (1) tai M7-viljelyneesteeseen. Siirto onnistuu paremmin totuttamalla vesikirput asteittain uuteen viljelyneesteeseen: ensin siirretään entisestä viljelyneesteestä 30-prosenttiseen, sitten 60-prosenttiseen ja lopulta 100-prosenttiseen Elendt-viljelyneesteeseen. Totuttamisvaiheen pitää mahdollisesti olla jopa kuukauden pituinen.

VALMISTELU**Hivenaineet**

Ensin valmistetaan erilliset varastoliuokset (I) yksittäisistä hivenaineista sopivalla tavalla, esim. deionisoimalla, tislamalla tai käänteisosmoosilla puhdistettuun veteen. Näistä eri varastoliuoksista (I) valmistetaan yksi ainoa varastoliuos (II), jossa on kaikkia hivenaineita (yhdistetty liuos), ts:

Varastoliuokset I (yksi aine)	Veteen lisätty määrä mg/l	Pitoisuus (M4-viljely- neesteessä) -kertainen	Valmistettaessa yhdistettyä varastoliuosta II lisätään veteen seuraavat määrät varastoliuoksia I ml/l	
			M 4	M 7
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	–	–
Sekä Na ₂ EDTA- että FeSO ₄ -liuokset valmistetaan erikseen, yhdistetään ja autoklavoidaan välittömästi. Tuloksena on:				
21 Fe-EDTA-liuos		1 000- kertainen	20,0	5,0

M4- ja M7-viljelyneeste

M4- ja M7-viljelyneesteet valmistetaan käyttäen varastoliuosta II, makroravinteita ja vitamiineja seuraavasti:

	Veteen lisätty määrä mg/l	Pitoisuus (M4-viljely- neesteessä) -kertainen	Viljelyneesteen valmistamiseen tarvittava varastoliuoksen määrä ml/l	
			M 4	M 7
Varastoliuos II yhdistetyt hivenaineet		20	50	50
Makroravinteiden varastoliuos (yksittäisiä aineita)				
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
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos	-	10 000	0,1	0,1
Yhdistetty vitamiinien varastoliuos valmistetaan lisäämällä kaikkia kolmea vitamiinia 1 litraan vettä seuraavasti:				
Tiamiinihydrokloridi	750	10 000	-	-
Syaanikobalamiini (B ₁₂)	10	10 000	-	-
Biotiini	7,5	10 000	-	-

Yhdistetty vitamiinien varastoliuos säilytetään jäädytettynä pienissä erissä. Vitamiinit lisätään viljelyneesteeseen vähän ennen käyttöä.

Huom. Jotta suolat eivät saostuisi lopullista viljelyneesteliuosta valmistettaessa, varastoliuokset lisätään 500–800 ml:aan deionisoitua vettä ja täytetään sitten 1 litraksi.

Huom. M4-viljelynesteen kokoonpanoa koskeva ensimmäinen julkaisuviite on Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

LIITE 2

ORGAANISIIN YHDISTEISIIN SITOUTUNEEN HIILEN KOKONAISMÄÄRÄN (TOC) MÄÄRITYS JA NOMOGRAMMIN LAATIMINEN LEVÄREHUN TOC-PITOISUUDELE

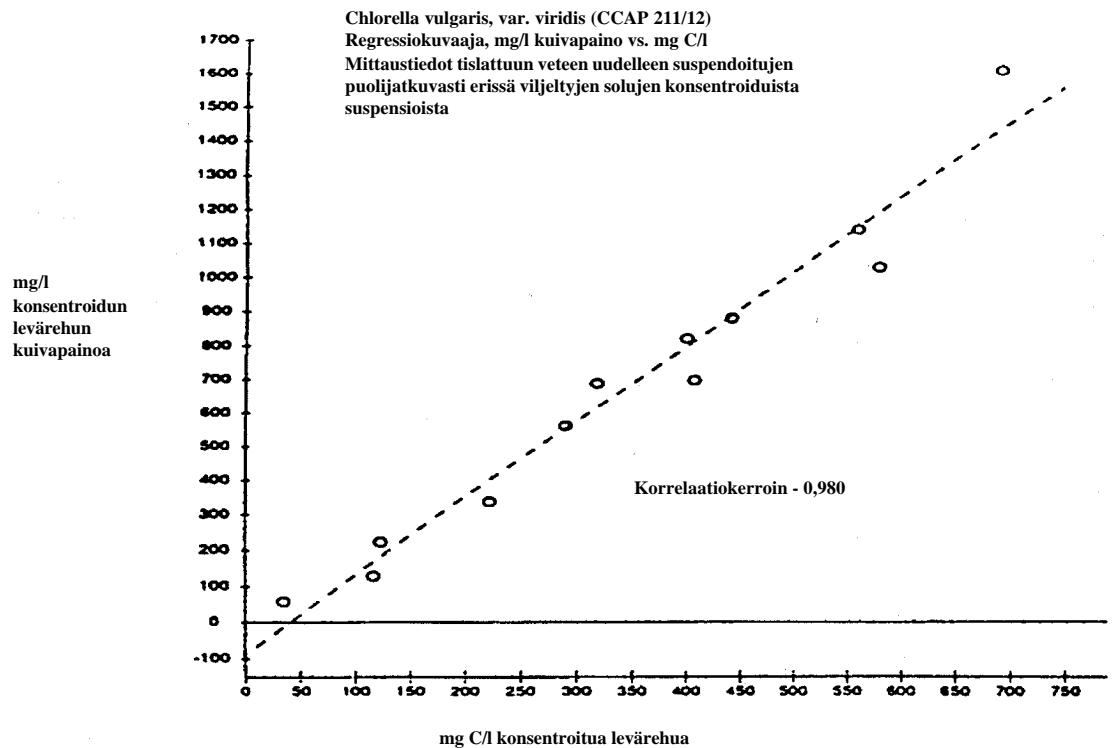
Levärehun hiilipitoisuutta ei tunnetusti mitata suoraan, vaan se määritetään korvaavilla menetelmillä kuten levysolujen määrän tai valon absorptioon perusteella laadittujen nomogrammien avulla.

TOC olisi mitattava mieluummin korkeassa lämpötilassa tapahtuvan oksidaation avulla kuin UV- tai persulfaattimenetelmällä. (ks. The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinants 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

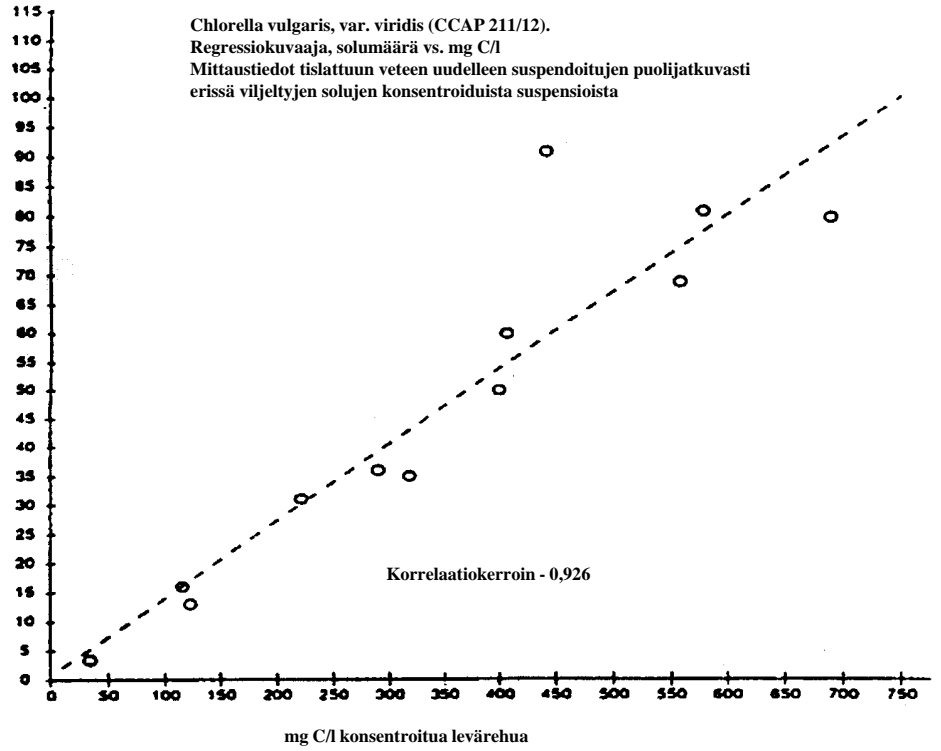
Nomogrammin laatimista varten levät olisi erotettava viljelyneesteestä sentrifugoimalla, jonka jälkeen ne suspendoidaan uudelleen tislattuun veteen. Korvaava muuttuja ja TOC-pitoisuus määritetään kustakin näytteestä (kolme rinnakkaista). Tislattuun veteen perustuvat nollanäytteet määritetään ja niiden TOC-pitoisuus vähennetään levänäytteen TOC-pitoisuudesta.

Nomogrammin olisi oltava lineaarinen tarvittavalla hiilipitoisuusalueella. Jäljempänä annetaan esimerkkejä.

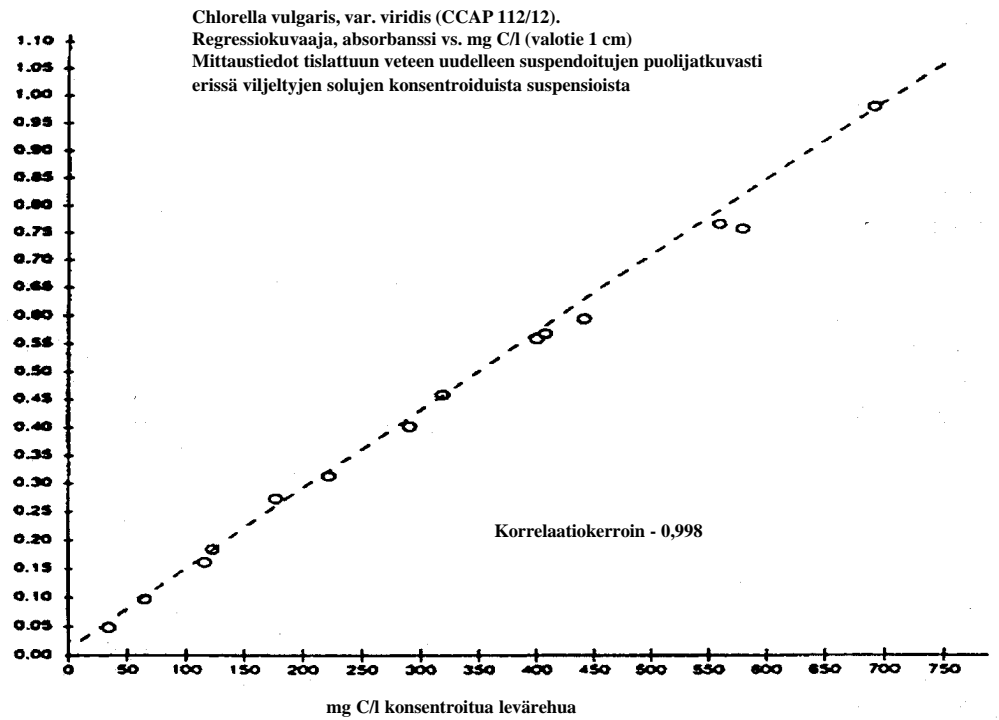
Huom. Näitä nomogrammeja ei saisi käyttää muuntamiseen. Jokaisen laboratorion on laadittava omat nomogrammit.



Konsentroidun
levärehun solujen
määrä/l
(x 10⁸)



Konsentroidun
levärehun 1/10-
laimennoksen
absorbanssi
aallonpituudella
440 nm



LIITE 3

ESIMERKKI LOMAKKEESTA, JOHON KIRJATAAN VILJELYNESTEEN VAIHDOT, FYSIKAALISET JA/TAI KEMIALLISET SEURANTATIEDOT, RUOKKIMINEN,

VESIKIRPUN LISÄÄNTYMINEN JA TÄYSIKASVUISTEN KUOLLEISUUS

Koe nro:	Aloituspvm:	Klooni:	Viljelyneeste										Ravintotyyppi		Testiaine		Nimellispitoisuus								
Päivä	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			
Viljelyneeste vaihto (rasti)																									
pH *																									tuore
																									vanha
O ₂ mg/l *																									tuore
																									vanha
Lämpötila (°C)																									tuore
																									vanha
Ruokkiminen (rasti)																									
Elävien jälkeläisten määrä ‡																									Yhteensä
Astia1																									
2																									
3																									
4																									
5																									
6																									
7																									
8																									
9																									
10																									
																									Yhteensä
Kumulatiivinen aikuisten kuolleisuus																									

* Ilmoitettava, mitä astiaa käytettiin kokeeseen.

‡ Täysikasvuisten eläinten kuolleisuus kirjataan merkinnällä 'M' asianomaiseen ruutuun.

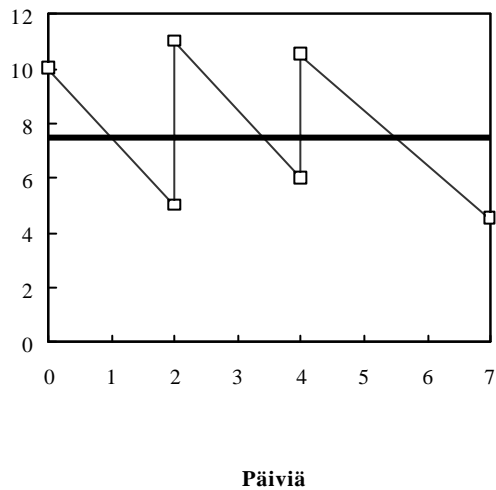
† Abortoituneet jälkeläiset kirjataan merkinnällä 'A' asianomaiseen ruutuun.

LIITE 5

AIKAPAINOTETUN KESKIARVON LASKEMINEN

Aikapainotettu keskiarvo

Koska testiaineen pitoisuus voi laskea viljelynesteen vaihtojen välillä, on harkittava, mikä pitoisuus olisi valittava edustamaan sitä pitoisuusaluetta, jossa emovesikirppu on elänyt. Valinnan pitäisi perustua sekä biologisiin että tilastollisiin näkökohtiin. Jos esimerkiksi oletetaan, että lisääntymiseen vaikuttaa lähinnä huippupitoisuus, olisi käytettävä suurinta pitoisuutta. Jos taas oletetaan, että myrkyllisen aineen kerääntynyt tai pitkän aikavälin vaikutus on tärkeämpi, keskipitoisuus sopii paremmin. Silloin käytettäväksi sopiva asianmukainen keskiarvo on aikapainotettu keskipitoisuus, koska siinä otetaan huomioon hetkellisten pitoisuuksien vaihtelu ajan funktiona.



Kuva 1: Esimerkki aikapainotetusta keskiarvosta

Kuvassa 1 on (yksinkertaistettu) esimerkki testistä, joka kestää 7 päivää ja jossa viljelyneeste vaihdetaan päivinä 0, 2 ja 4.

- Ohut sahaviiva kuvaa pitoisuutta eri ajankohtina. Pitoisuuden laskun oletetaan noudattavan eksponentiaalista hajoamisprosessia.
- Kuusi kuvaajaan merkittyä pistettä edustavat havaittuja pitoisuuksia, jotka on mitattu kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa.
- Paksu yhtenäinen viiva esittää aikapainotetun keskiarvon sijaintia.

Aikapainotettu keskiarvo lasketaan siten, että aikapainotetun keskiarvon kuvaajan alle jäävä pinta-ala on yhtä suuri kuin pitoisuuskäyrän alle jäävä pinta-ala. Edellä olevaa esimerkkiä varten tehty laskutoimitus kuvataan taulukossa 1.

Taulukko 1: Aikapainotetun keskiarvon laskeminen

Vaihto nro	Päiviä	Conc 0	Conc 1	Ln(Conc 0)	Ln(Conc 1)	Pinta-ala
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
Päivien kokonaismäärä :					7	
					Kokonaispinta-ala	50,091
					Aikapainotettu keskiarvo	7,156

Päiviä on vaihtojen välissä olevien päivien määrä

Conc 0 on kunkin vaihtoperiodin alussa mitattu pitoisuus

Conc 1 n kunkin vaihtoperiodin lopussa mitattu pitoisuus

Ln(Concs 0) on Conc 0:n luonnonlogaritmi

Ln(Conc 1) on Conc 1:n luonnonlogaritmi

Pinta-ala on kutakin vaihtoperiodia vastaavan eksponentiaalisen käyrän alle jäävä pinta-ala

$$Pinta-ala = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times päiviä$$

Aikapainotettu keskiarvo on kokonaispinta-ala jaettuna päivien kokonaismäärällä.

Vesikirpun lisääntymisestä varten taulukon on tietysti katettava 21 päivää.

On selvää, että kun havaintoja tehdään vain kunkin vaihtoperiodin alussa ja lopussa, ei voida olla varmoja siitä, että hajoaminen on todella eksponentiaalista. Erilaisesta käyrästä olisi seurauksena erilainen *pinta-ala*. Eksponentiaalinen hajoamisprosessi ei kuitenkaan ole epätodennäköinen, ja sitä kuvaava käyrä on todennäköisesti paras, jota voidaan käyttää, kun muuta tietoa ei ole.

On kuitenkin esitettävä varoitus siltä varalta, että kemiallisessa määrittämisessä ei havaita kyseistä ainetta lainkaan vaihtoperiodin lopussa. Ellei voida arvioida, kuinka nopeasti aine on hävinnyt liuoksesta, on mahdotonta saada todenmukaista pinta-alaa käyrän alle, ja myös mahdotonta määrittää järkevää aikapainotettua keskiarvoa.